



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Efecto de tamoxifen, propionato de testosterona y coumestrol en la expresión de los receptores estrogénicos α y β en el hipotálamo de ratas Wistar, como una posible alternativa en el control reproductivo en fauna nociva.

TESIS

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

PRESENTA:

JOSÉ ALFREDO PERALTA JUÁREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. JUAN JOSÉ PÉREZ RIVERO CRUZ Y CELIS

**DEPTO. DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM**

COMITÉ TUTORAL

Dr. MARIO PÉREZ MARTÍNEZ

DEPTO. DE FISIOLÓGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

Dra. MARCELA VERGARA ONOFRE

DEPTO. DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL UAM-X

CIUDAD UNIVERSITARIA Cd. Mx. OCTUBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi papá Alfredo Peralta Cortes por siempre guiarme con su ejemplo por el camino de la responsabilidad, la humildad y la dedicación, lo que me ha hecho ser una persona centrada y con deseo de superación constante, afrontando las adversidades con buena cara y resolviéndolas de la mejor manera.

A la mujer que me dio la vida Ma. Del Roció Juárez de la Brena, por siempre acompañarme en los momentos difíciles, felices y siempre brindarme su amor incondicional.

A mis hermanas Pames y Andi por siempre tener su apoyo, amor, alegrías y sobre todo de brindarme su tiempo para que realizara esta tesis.

A Cesar González por formar parte de esta familia y brindarme su apoyo.

Al angelito de esta familia Lena (Marcianita) por llenar de amor y bendición a toda la familia.

A Gilda e Iván, sin su apoyo no me hubiese amplificado.

Sobre todo a Miry que me ha acompañado en esta gran aventura, por su apoyo incondicional en todo momento y porque continuaremos por el camino que hemos iniciado, el cual no dudo estará lleno de muchas alegrías y éxitos compartidos; te agradezco de todo corazón.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis por hacerme parte de su equipo de trabajo, guiarme en mi formación académica, creer en mí para el desarrollo de este proyecto y brindarme su amistad.

A los Integrantes de mi comité tutorial, Dra. Marcela Vergara Onofre y Dr. Mario Pérez Martínez por su apoyo y asesoría en todo momento.

Dr. Álvaro Aguilar Setién por brindarme su apoyo con el uso del laboratorio, sin el cual no hubiera podido terminar mi formación.

Dra. Mónica Salas y al Dr. Guillermo por brindarme su tiempo, guiarme, enseñarme y tenerme paciencia en el laboratorio.

Dr. Raúl Silva por apoyarme para la obtención de los resultados.

Maestra Martha García por su apoyo en las horas de laboratorio.

Dra. Patricia Miranda Castro por su apoyo en proporcionar el quitosán, necesario para la realización de esta tesis.

A CONACYT por otorgarme la beca para formarme como Maestro en Ciencias.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme acceder al programa de excelencia de Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por otorgarme las facilidades en el uso de animales de laboratorio.

UPEAL-Bioterio a la Dra. Ivonne M. Heuze de Icaza y Dr. Heriberto Quintana por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo.

A las compañeras de laboratorio Cirani, Anahi, y Mariem por brindarme su tiempo y conocimientos.

A Mariana y Eli por hacer gran equipo de trabajo.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	4
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
GLOSARIO	10
INTRODUCCIÓN	12
CICLO ESTRAL DE LA RATA.....	13
GESTACIÓN Y PARTO	14
FASES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	15
Diferenciación sexual cromosómica o genética.....	15
Gen SRY	15
Diferenciación sexual gonadal.....	16
Diferenciación sexual genital	16
Diferenciación sexual hipotalámica.....	17
Período crítico	17
Citocromo P450 aromatasa (CYP19)	18
RECEPTORES NUCLEARES	18
Receptores estrogénicos	18
Estructura del receptor estrogénico	19
Mecanismos genómicos del receptor estrogénico.....	20
Mecanismos no genómicos del receptor estrogénico	20
SUBSTANCIAS UTILIZADAS	20
Mecanismo de acción de los SERMs.....	20
Tamoxifen	21
Metabolismo del Tamoxifen.....	21
Propionato de testosterona.....	22
Mecanismo de Acción de la Testosterona	23
Fitoestrógenos	23
Coumestrol	24

QUITINA Y QUITOSÁN	25
Propiedades físico químicas	25
JUSTIFICACIÓN	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
ANIMALES	29
Ética.	29
Obtención de reproductores.....	29
Citologías Vaginales.	29
Animales.	31
TRATAMIENTO.	31
Eutanasia.	33
Obtención de los Hipotálamos.....	33
ANÁLISIS DE MUESTRAS.	34
Extracción del RNA.	34
Cuantificación del RNA.	35
Electroforesis de RNA.....	35
RT-PCR.....	36
PCR punto final.	37
Electroforesis de PCR punto final.	37
PCR Tiempo Real.....	37
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	39
RESULTADOS.....	40
Citología vaginal exfoliativa.	40
Expresión de los RE α y β	44
DISCUSIÓN.	50
Quitosán.	50
Coumestrol.....	51
Tamoxifen.....	52
Propionato de testosterona.	53
CONCLUSIÓN.....	55
ANEXOS.	57

BIBLIOGRAFÍA.....64

RESUMEN

Los estrógenos en la etapa pre y postnatal en la rata tienen un papel de importancia en la diferenciación sexual del hipotálamo. Con el uso de disruptores endocrinos como el coumestrol o moduladores selectivos del receptor para estrógenos como el tamoxifen o el uso de andrógenos como el propionato de testosterona en la etapa crítica de la diferenciación sexual hipotalámica de ratas y ratones, se altera la expresión de los receptores estrogénicos α y β . Por otra parte el quitosán un polisacárido obtenido a partir de la desacetilación de la quitina está siendo utilizado como vehículo para la administración de fármacos destacándose sus propiedades antioxidantes, antibacteriales y antifúngicas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión relativa de los receptores estrogénicos α y β en los hipotálamos de las crías (6 y 48 horas de nacidas) de ratas Wistar hembras tratadas por vía subcutánea el día 17 de su gestación con 200 μ l de quitosán (grupo 1), 200 μ l de quitosán con 800 μ g de coumestrol (grupo 2), 200 μ l de quitosán con 1.2 mg de propionato de testosterona (grupo 3), 200 μ l de quitosán con 8 mg de tamoxifen (grupo 4), control intacto (grupo 5).

La expresión de los receptores para estrógenos α y β en los machos de 6 horas de nacidos, se incrementaron 2.32 y 66.76 veces respectivamente en el hipotálamo de los animales tratados del grupo 1 respecto al control intacto, con respecto a los animales del grupo 2 para el receptor α aumentó 0.36 y para el receptor β se incrementó 20.48 veces más respecto a su control intacto. En el caso de los animales tratados del grupo 3, en la expresión de los receptores para estrógenos, no se encontró cambio en el receptor α , por lo contrario se detectó un incremento de 10.93 veces respecto a los animales intactos para el receptor β . Lo que respecta al grupo 4 la expresión relativa del receptor para estrógenos α no se encontró cambio, siendo para el receptor β un incremento de 9.3 veces respecto al control intacto.

Para la expresión de los receptores para estrógenos en los machos de 48 horas de nacidos, no se encontró incremento para el receptor α , para el receptor β se encontró un incremento de 0.74 veces en el hipotálamo de los animales tratados del grupo 1 respecto al control intacto, con respecto a los animales tratados del grupo 2 para el receptor α se incrementó 0.39 veces, y para el receptor β disminuyó 0.16 veces. En el caso de los animales tratados del grupo 3, en la expresión de los receptores para estrógenos, se incrementó la expresión en 1.85 y 1.90 veces para los receptores α y β respectivamente.

La expresión de los receptores para estrógenos en las hembras de 6 horas de nacidas, se observó disminución de 0.48 veces para los receptores α y un incremento de 5.28 veces en los receptores β en el hipotálamo de los animales del grupo 1 respecto al control intacto, por su parte en los animales del grupo 2 para el receptor α se encontró disminución de 0.66 veces en la expresión e incrementó para el receptor β 3.97 veces respecto a su control. En el caso de los animales del grupo 3, en la expresión de los receptores para estrógenos se encontró disminución en la expresión del receptor α de 0.31, por lo contrario se detectó un incremento de 12.15 veces respecto a los animales intactos para el receptor β . Lo que respecta al grupo 4 la expresión relativa del receptor para estrógenos α se encontró una disminución de 0.44 veces, incrementándose para el receptor β en una vez respecto al control.

La expresión de los receptores para estrógenos en las hembras de 48 horas de nacidas, se observó una disminución de 0.4 veces para los receptores α y un incremento de 0.6 veces en los receptores β en el hipotálamo de los animales del grupo 1 respecto al control intacto, por su parte en los animales del grupo 2 para el receptor α y β se encontró disminución de 0.5 y 0.48 veces respectivamente en la expresión respecto a su control. En el caso de los animales grupo 3, en la expresión de los receptores para estrógenos se encontró incremento en la expresión del receptor α de 0.17, por lo contrario se detectó una disminución de 0.17 veces respecto a los animales intactos para el receptor β .

Se concluye que cada tratamiento presentó diferente grado de expresión relativa en el RNAm de ambos receptores estrogénicos, siendo el grupo 1, el tratado con quitosán, donde se encontró mayor expresión relativa de el RE β . La acción biológica de los estrógenos es mediada a través de los RE α y β , los cuales actúan como factores de transcripción, estos pueden ser activados por diferentes sustancias y ejercer distintos efectos los cuales dependen del tipo de tejido y las características del ligando. Es necesario seguir evaluando los efectos de estos tratamientos en las crías a largo plazo, para identificar sus efectos en las diferentes etapas de su desarrollo hipotalámico y valorar como repercuten estos en la vida adulta para determinar su utilidad como una alternativa para el control reproductivo de animales transmisores de enfermedad.

Palabras Clave: Quitosán, Tamoxifen, Propionato de testosterona, Coumestrol, Receptores Estrogénicos α y β .

Abstract

In the pre and postnatal stage in the rat, the estrogens have an important role of in the sexual differentiation of the hypothalamus.

With the use of endocrine disruptors such as coumestrol or selective estrogen receptor modulators such tamoxifen or the use of androgens as testosterone propionate in the critical stage of hypothalamic sexual differentiation of rats and mice, it's alters the expression of estrogen receptors α and β .

On the other hand, chitosan a polysaccharide obtained from the deacetylation of chitin, is being used as a vehicle for the administration of drugs highlighting its antioxidant, antibacterial and antifungal properties.

The objective of this study was to evaluate the relative expression of estrogen receptors α and β in the hypothalamus of the new-born rats (6 and 48 hours) of Wistar female rats treated subcutaneously on day 17 of their gestation with 200 μ l of Chitosan (group 1) , 200 μ l of Chitosan with 800 μ g of Coumestrol (Group 2), 200 μ l of Chitosan with 1.2 mg of testosterone propionate (Group 3), 200 μ l of chitosan with 8 mg of tamoxifen (group 4), intact control (group 5).

The expression of α and β estrogen receptors for males of 6 hours of birth, these increased 2.32 and 66.76 times respectively in the hypothalamus of the group 1 animals with respect to intact control. With respect to the group 2 animals for the α receptor increased 0.36 and for the β receptor these increased 20.48 times with respect to intact control. In the case of the animals of Group 3, the expression of the estrogen receptor, no change was found for the α receptor, otherwise, an increase of 10.93 times with respect to intact animals for the β receptor was detected. As regards group 4, the relative expression of the receptor for estrogens α was not found change, being for the receptor β an increase of 9.3 times with respect to the control intact. For the expression of the estrogen receptors in males of 48 hours of birth, no increase was found for the α receptor, for the β receptor found an increase of 0.74 times in the hypothalamus of the group 1 animals with respect to intact control, with respect to the group 2 animals the α receptor was increased in 0.39 times, for the β receptor decrease 0.16 times. In the case of the group 3 animals, the expression of estrogen receptors was increased by 1.85 and 1.90 times for α and β receptors respectively.

The expression of estrogen receptors in the females of 6 hours of birth, observed a decrease of 0.48 times for the α receptors and an increase of 5.28 times in the β receptors in the hypothalamus of the animals of the group 1 with respect to the intact control, for its part in the animals of the group 2 for the α receptor was found decrease of 0.66 times the relative expression and increase for the β receptor 3.97 times with respect to its control. In the case of the of group 3 animals, the expression of the estrogen receptors was found a decrease in the expression of the α receptor of 0.31, otherwise, it was detected an increase of 12.15 times with respect to the intact animals for the β receptor. Regarding group 4, the relative expression of the α receptor found a decrease in 0.44 times, increase for the β receptor in once with respect to the control. The expression of the estrogen receptors in females of 48 hours of birth, it was observed a decrease of 0.4 times for α receptors and an increase of 0.6 times in β receptor in the hypothalamus of group 1 animals with respect to intact control, for its part in the animals of the group 2 for the α and β receptors was found decrease 0.5 and 0.48 times respectively of the expression with respect to its control. In the case of the group 3 animals, the expression of the receptors for estrogens was found the increase in the expression of the α receptor of 0.17, otherwise, it is detected a decrease of 0.17 times with respect to the animals intact for the β receptor.

In conclusion, each treatment presented a different degree of relative expression in the RNAm of both estrogen receptors, being group 1, the treaty with chitosan, where greater relative expression of the RE β was found.

The biological action of estrogens are mediated through the α and β receptors, which act as transcription factors, these can be activated by different substances and exert varied effects which depend on the type of tissue affected and the characteristics of the ligand.

It is necessary to continue to assess the effects of these treatments in the offspring in the long term, to identify its effects at different stages of their hypothalamic development and how they affect the adult life to determine their usefulness as an alternative for the reproductive control of disease transmitters animals.

Keywords: Chitosan, Tamoxifen, Testosterone Propionate, Coumestrol, Estrogen Receptors α and β .

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos para la citología vaginal exfoliativa.

Tabla 2. Tratamientos hembras gestantes.

Tabla 3. Tiempos de eutanasia.

Tabla 4. Integridad del RNA.

Tabla 5. Genes, secuencias de los primers e identificación en el NCBI.

Tabla 6. Medias \pm desviación estándar de las estirpes celulares.

Tabla 7. Prueba Exacta de Fisher de los estados del ciclo estral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patrón esquemático del ciclo estral de 4 días en la rata.

Figura 2. Receptor estrogénico α y β .

Figura 3. Mecanismo de acción molecular de los estrógenos.

Figura 4. Tipos celulares en el ciclo estral de la rata.

Figura 5. Administración del tratamiento bajo anestesia con isoflorano y oxígeno.

Figura 6. Porcentaje de estirpes celulares del epitelio de la vagina.

Figura 7. Gel de agarosa de la PCR punto final.

Figura 8. Gel de agarosa integridad del mRNA de cada tratamiento.

Figura 9. Expresión relativa de los RE α y β en los hipotálamos de machos de 6 horas de nacidos.

Figura 10. Expresión relativa de los RE α y β en los hipotálamos de machos de 48 horas de nacidos.

Figura 11. Expresión relativa de los RE α y β de los hipotálamos de las hembras de 6 horas de nacidas.

Figura 12. Expresión relativa de los RE α y β de los hipotálamos de las hembras de 48 horas de nacidas.

Figura 13. Se muestran las medias \pm DE de los machos de 6 horas de las Cq de cada grupo y cada tratamiento.

Figura 14. Se muestran las medias \pm DE de los machos de 48 horas de las Cq de cada grupo y cada tratamiento.

Figura 15. Se muestran las medias \pm DE de los hembras de 6 horas de las Cq de cada grupo y cada tratamiento.

Figura 16. Se muestran las medias \pm DE de los hembras de 48 horas de las Cq de cada grupo y cada tratamiento.

GLOSARIO

ARC	Núcleo Arcuato
ArKO	Aromatasa knockout
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular
C-Terminal	Carboxilo terminal
cDNA	Ácido desoxirrinonucleico complementario
Cou	Coumestrol
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleicos trifosfato
E	Estrógenos
E2	Estradiol
ERE	Elemento de respuesta al estrógeno
FGF-9	Factor de crecimiento fibroblasto 9 (fibroblast growth factor 9)
FN	Fauna Nociva
HBD	Dominio de unión a la hormona
HRE	Elementos de respuesta a hormonas
LBD	Región de unión al ligando
LH	Hormona Luteinizante
MAPK	Protein quinasa activador de mitógenos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MIH	Hormona Inhibidora de los Conductos de Müller
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OCT-4	Factor de transcripción de unión o- 4
P450 AROM	Enzima p450 aromatasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
POA	Área preóptica del hipotálamo
PT	Propionato de Testosterona
RE	Receptores estrogénicos
REα	Receptor estrogénico alfa

REβ	Receptor estrogénico beta
RNA	Ácido ribonucleico
RNs	Receptores nucleares
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa
SDN-POA	Núcleo dimórfico sexual de la región preóptica
SERMs	Moduladores Selectivos de los RE
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SNC	Sistema Nervioso Central
SOX	SRY-like Box
SOX-9	Factor de transcripción 9
SRY	Región determinante sexual del cromosoma Y
T	Testosterona
TAF-1	Dominio de activación transcripcional 1
TAF-2	Dominio de activación transcripcional 2
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
Tx	Tamoxifen
WT-1	Gen asociado al tumor de Wilms
Wild-type	Animal natural sin cambios genéticos

INTRODUCCIÓN

La presencia de fauna nociva (FN) representa un riesgo para la salud pública y animal por ser portadores de enfermedades, las cuales más del 60% tienen potencial zoonótico (OIE, 1992). El término fauna nociva tiene un sentido claramente antropocéntrico, ya que evolutivamente y ecológicamente ninguna especie puede ser nociva para la propia naturaleza. Este tipo de fauna ha surgido con la urbanización, la agricultura y en general con todo tipo de alteraciones antropogénicas.

Los animales que pueden clasificarse como fauna nociva son perros y gatos en situación de calle, ratas, ratones, cucarachas, moscas, mosquitos, alacranes, hormigas, avispa, algunos murciélagos y moluscos terrestres (Cruz-Reyes, 2009). Debido a esto es necesario evitar que proliferen, afectando la salud pública y animal (Cruz-Reyes, 2009).

Uno de los principales métodos de control de FN es el letal, sin embargo ha demostrado ser poco eficiente debido a que su impacto es a corto plazo, ya que la recuperación de las poblaciones de animales sujetos a control es rápida, por lo que es necesario desarrollar otras alternativas de control poblacional no letal que permita mantener poblaciones de animales estables a través del control de su reproducción.

La conducta reproductiva es sexualmente dimórfica, es decir, tanto los machos como las hembras se desarrollan y comportan de manera típica, además desde el punto de vista endocrino son modelos altamente complejos.

A nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) también existe dimorfismo sexual, este se lleva a cabo en las funciones cerebrales controlando una serie de sistemas importantes para la regulación del proceso reproductivo (Vergara, 2004).

En el SNC de machos y hembras existen diferencias estructurales y funcionales, que involucran la cantidad de neuronas, su morfología e interconexiones, las cuales han sido asociadas con cambios en la fisiología cerebral y el desarrollo cognitivo y conductual (Herrera *et al.*, 2005).

CICLO ESTRAL DE LA RATA

Los ciclos del estro en la rata se caracterizan por cambios morfológicos en los ovarios, el útero y la vagina que se producen durante diferentes fases denominadas proestro, estro, metaestro y el diestro (Paccola *et al.*, 2013; Goldman *et al.*, 2007). (Figura 4)

El proestro se identifica por la presencia de células epiteliales nucleadas que presentan una apariencia granular, este puede durar 1 día.

El estro se caracteriza por la presencia de células cornificadas (queratinizadas) o células redondas con bordes dentados, esta etapa puede durar 1 día en ciclos de 4 días o 2 días en ciclos de 5 días, la ovulación se produce desde el comienzo de proestro al final del estro (Marcondes *et al.*, 2002).

El metaestro es un período que se ha utilizado para describir un período de transición durante la primera parte del diestro (diestro I) donde se caracteriza la presencia de leucocitos y escasas células epiteliales corneadas y redondas, en el frotis vaginal puede ser exclusivo de leucocitos. El diestro II se caracteriza por la presencia de algunos grupos pequeños de células epiteliales pequeñas y grandes (Goldman *et al.*, 2007; Paccola *et al.*, 2013).

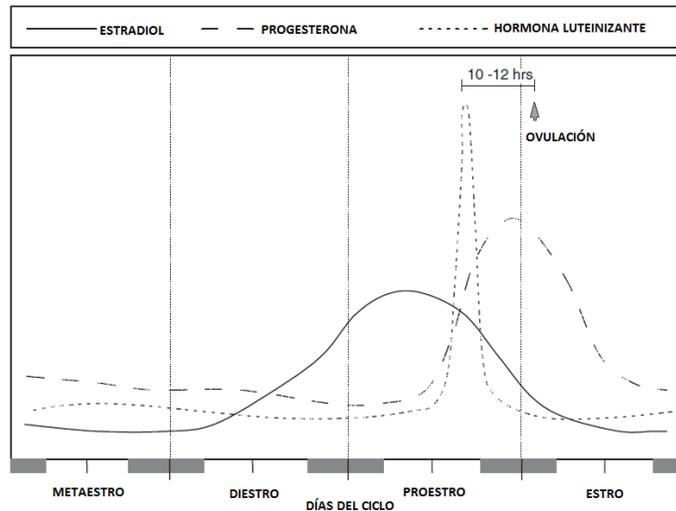


Figura 1. Patrón esquemático del ciclo estral de 4 días en la rata que representa las concentraciones séricas de estradiol y progesterona al tiempo que se relacionan con el aumento de la hormona luteinizante (LH). La ovulación ocurrirá durante las primeras horas del estro, aproximadamente 10-12 horas después del aumento de la LH (Goldman *et al*, 2007).

GESTACIÓN Y PARTO

La gestación es un proceso interactivo en donde la resultante es el desarrollo y nacimiento de uno o más miembros de la misma especie. Se requieren de cuatro eventos para que esto suceda, ovulación, fertilización de ovocito, implantación de blastocitos y formación del cuerpo lúteo para mantener la gestación (Terkel, 1988).

En el primer tercio de la gestación en la rata el cuerpo lúteo es activado y mantenido por efecto de la prolactina, la cual se le denomina la principal hormona luteotrófica durante los primeros 7 días de gestación. La hormona luteinizante juega un papel importante como hormona luteotrófica en la segunda mitad de la gestación para el mantenimiento del cuerpo lúteo, a partir del día 12 en adelante los requerimientos luteotrófica cambian debido a que la hipófisis no es capaz de mantener la secreción de progesterona, por lo tanto el cuerpo lúteo depende del lactógeno placentario hasta el comienzo del parto (Lam y Rothchild, 1977).

El proceso inicial del parto desencadena una serie de procesos fisiológicos por los cuales el útero expulsa sus productos de concepción. Este proceso está separado por distintas etapas: la etapa uno es la preparación, el cual se refiere al tiempo necesario para la presentación del feto en el canal materno y a la dilatación del cérvix, y la segunda etapa es la expulsión del

feto la cual se genera por contracciones uterinas de gran intensidad, presión abdominal, expulsión de membranas e involución uterina (Galina y Valencia., 2006).

FASES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Diferenciación sexual cromosómica o genética

En los mamíferos placentados, el establecimiento del sexo cromosómico ocurre en el momento de la fertilización, las hembras poseen una constitución cromosómica XX, mientras que los machos XY, dado que la determinación sexual ocurre al momento de la unión de los dos pronúcleos del espermatozoide y del ovocito para formar el núcleo del cigoto (Díaz y Merchant, 2008), justo en ese momento el patrón predeterminado de expresión génica dará como resultado el desarrollo de uno de los dos sexos, la cual por default el patrón predeterminado en mamíferos es de hembra, de esta manera en los machos se redirige hacia el patrón macho, debido a la presencia del gen SRY en el cromosoma Y (Camerino *et al.*, 2006).

Gen SRY

El gen SRY (Sex-determining Region of Y chromosome, por sus siglas en inglés), se expresa solamente en la gónada en formación de los embriones macho, en particular en las células precursoras de las células de Sertoli que codifican una proteína de la familia SOX (SRY-like Box) que son proteínas que tienen un dominio de unión al DNA y actúan como factores de transcripción. La proteína SRY estimula la expresión (transcripción) de otro gen emparentado, denominado SOX-9 que a su vez actúa como un factor de transcripción que activa la expresión de otros genes, como el FGF-9 (fibroblast growth factor 9). Los productos de los genes SOX-9 y FGF-9 inician cascadas de expresión génica que provocan que las células somáticas de la gónada indiferenciada (cresta genital) se diferencien en células de Leydig y células de Sertoli, lo que finalmente resulta en la formación de un testículo. Por otra parte en el cromosoma X se encuentran otros genes denominados WNT4 (Wingless-integration factor 4) y RSPO1 (Respondin-1) los que inician una cascada de expresión génica que provoca la diferenciación de las células somáticas de la gónada indiferenciada hacia células de la teca y células de la granulosa, por lo tanto el embrión macho expresa SOX-9 e

inhibe la expresión de WNT4 y RSPO1 y por ende no hay formación de un ovario (Camerino *et al.*, 2006).

Diferenciación sexual gonadal

En todos los embriones se forman inicialmente gónadas indiferenciada (con el potencial de formar ovarios o testículos) a partir de la invasión de las crestas gonadales por las células germinales primordiales, que migran desde su sitio de origen en el epiblasto (cerca del sitio donde el saco vitelino se une al intestino primitivo). La migración de las células germinales primordiales ocurre de manera temprana en el desarrollo embrionario y al llegar a la gónada proliferan y se organizan con las células somáticas de la cresta genital para ir formando la gónada. Para esta remodelación y la formación adecuada de la gónada se expresan varios genes, como OCT-4 (que aparentemente mantiene la totipotencialidad de la gónada), así como SF-1 (Factor esteroideogénico 1) y WT-1 (gen asociado al tumor de Wilms). Estos dos últimos estimulan la proliferación celular y el establecimiento de cordones sexuales. En esta etapa inicial todos estos genes se expresan tanto en el cromosoma XX como en el XY, por lo que la gónada en formación aún mantiene la capacidad de diferenciarse hacia testículo o hacia ovario (Salame *et al.*, 2008).

Diferenciación sexual genital

La testosterona secretada por los testículos del feto en desarrollo actúa sobre los conductos de Wolff o mesonéfricos los cuales estimulan el desarrollo para formar los conductos deferentes, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias masculinas (próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales (Galina *et al.*, 2006). Al mismo tiempo los testículos producen una glicoproteína llamada Hormona Inhibidora de los Conductos de Müller (MIH), que como su nombre lo indica, inhibe el desarrollo de los conductos de Müller o paramesonéfricos, provocando su regresión, lo que impide el desarrollo de los oviductos, útero, cérvix y porción anterior de la vagina. La MIH es una glicoproteína de la familia de los factores de crecimiento transformante β (TGF β). El gen de MIH posee sitios de unión para la proteína de SOX-9 y de SF-1, por lo que la presencia simultánea de ambos es necesaria para que se secrete MIH y lleve a cabo su función inhibitoria de los conductos de Müller en el embrión macho (en esta etapa tanto la gónada de embriones machos como la de embriones hembra expresan SF-1, pero solo la del macho expresa SOX-9, por lo que solo esta produce

MIH). En cambio, en la gónada del embrión hembra no sólo se expresan cantidades mínimas de SOX-9, sino que también se produce DAX-1, que antagoniza tanto a SOX-9 como a SF-1, lo que impide la producción de MIH y resulta en el desarrollo de los conductos de Müller hasta formar los oviductos, útero, cérvix y porción anterior de la vagina (Salame *et al.*, 2008).

Diferenciación sexual hipotalámica

La diferenciación sexual del cerebro es una serie de procesos mediante los cuales los esteroides gonadales actúan durante un período sensible en el sustrato neural indiferenciado lo que causa alteraciones permanentes, este proceso de la diferenciación es la conversión de la testosterona (T) testicular generando estrógenos (E) dentro de las neuronas. La mayoría de las áreas dimórficas sexuales del cerebro contienen niveles sustanciales de dos proteínas P450 aromatasa (CYP19) y de receptores estrogénicos RE.

Los E son secuestrados por la α -fetoproteína en la circulación periférica del feto y esta α -fetoproteína tiene muy poca afinidad por los andrógenos, permitiendo que la T del testículo atraviese la barrera hematoencefálica y se aromatice dentro del cerebro (Krebs-Kraft y McCarthy, 2011), lo que ha demostrado la formación local de E durante el desarrollo cerebral así como sus consecuencias sobre la diferenciación del cerebro, la regulación de los efectos de gonadotropinas y el comportamiento sexual (Montelli *et al.*, 2012).

Período crítico

El período crítico también puede ser pensado como una ventana limitada de desarrollo en el que un evento puede ocurrir debido a una mayor sensibilidad a un estímulo ambiental, el cual puede ser endógeno o exógeno. Durante los últimos días de gestación al día 18 en la rata, los testículos del macho en desarrollo comienzan a producir cantidades significativas de T. Este tiempo de exposición a T es necesaria para inducir un cerebro fenotípicamente del macho y la formación de las características sexuales secundarias (Krebs-Kraft y McCarthy, 2011).

Citocromo P450 aromatasa (CYP19)

La enzima aromatasa (P450 arom) cataliza la conversión de T en E y juega un papel importante en la regulación de los efectos hormonales en las diferentes áreas del cerebro donde los estrógenos pueden ejercer su acción (Montelli *et al.*, 2012), como el desarrollo del sistema estrogénico local del SNC, la P450 arom influye en la diferenciación sexual de las estructuras neurales (aumenta el crecimiento de neuritas y el establecimiento de circuitos neuronales) y modula funciones neuroendocrinas/reproductivas así como el comportamiento sexual (Lephart, 1996).

RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares (RNs) pertenecen a una superfamilia relacionada con factores transcripcionales, los cuales regulan la acción de las hormonas liposolubles (Thornton y De Salle, 2000), tales como tiroxina, ácido retinoico, vitamina D, esteroides sexuales y adrenales, los cuales atraviesan la pared celular uniéndose específicamente a dichos receptores. La localización puede variar en función del tipo de hormona, pudiéndose encontrar en el citoplasma, en el núcleo o divididos entre los dos. La unión del ligando, provoca un cambio conformacional del receptor, activando o inhibiendo la expresión génica (Terán *et al.*, 2005).

Los RNs se caracterizan en base a su bien conservada estructura basada en dominios. La arquitectura canónica de un RN consta de cinco regiones. Las regiones más conservadas son las de unión al DNA (DBD, región C) y la de unión al ligando (LBD, región E) y la menos conservada son los dominios A, B, D y F (Owen y Zelent, 200).

Receptores estrogénicos

Como miembros de la superfamilia de receptores nucleares, los receptores estrogénicos (RE) tienen estructura modular (Lecomte *et al.*, 2017). Se han identificado las isoformas α (RE α) y β (RE β), que se distinguen por presentar diferencias en su secuencia de aminoácidos. Estos receptores presentan 96% de homología de sus aminoácidos constituyentes, aunque no es una regla aplicable a todas las regiones del receptor, ya que la región de unión al DNA (DBD) es la que más similitud presenta, mientras que la región de unión al ligando (LBD) sólo presenta un 53% de similitud (Pérez-Rivero *et al.*, 2007; Weihua *et al.*, 2003). Los RE son receptores

nucleares que modulan la transcripción por su unión específica a secuencias del genoma, así como a co-represores y co-activadores, para regular la acción del complejo RNA polimerasa. Los efectos moduladores de los RE sobre la transcripción se llevan a cabo en una serie secuencial de eventos (Pérez-Rivero *et al.*, 2005).

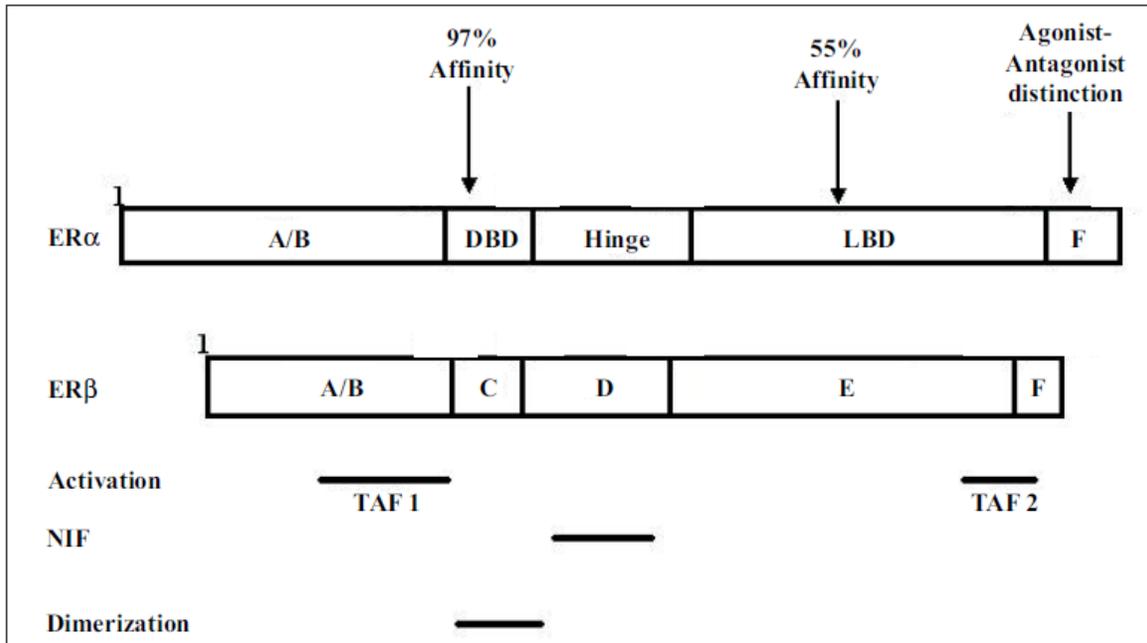


Figura 2. Receptor estrogénico α y β . (Pérez-Rivero *et al.*, 2005)

Estructura del receptor estrogénico

La estructura funcional del RE es la que le permite actuar como un transductor de la señal hormonal, ya que ésta contiene varias regiones específicas como el dominio de activación transcripcional 1 (TAF-1), el dominio de unión a DNA (DBD), el dominio de activación transcripcional 2 (TAF-2), y el dominio de unión a la hormona (HBD). Esta estructura funcional es la que le permite al RE unirse a la hormona y sufrir un cambio conformacional espacial que posibilita la formación de homodímeros (RE α -Rea o RE β -Reb) o heterodímeros (RE α -RE β) (Barrón-González *et al.*, 2001). Se forma el complejo hormona-receptor el cual se une directamente a las secuencias consenso en el DNA, que le permite al mismo tiempo disociarse de un complejo co-represor y unirse a un complejo co-activador, lo cual le confiere la actividad de transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a los estrógenos

(ERE). Por el contrario, en ausencia de estrógenos, los RE se asocian con los co-represores que inhiben la actividad de transcripción (Lenis *et al.*, 2010; Pérez-Rivero *et al.*, 2005).

Mecanismos genómicos del receptor estrogénico

Una vez en el interior de las células, los estrógenos se unen a sus receptores específicos activándolos, disociándose de ellos las proteínas de estrés, lo que provoca la dimerización del receptor y un cambio conformacional, siendo este transportado a través del poro o canal hacia el núcleo, donde interacciona con los Elemento de Respuesta a los Estrógenos (ERE) en el ADN (Figura 3) (Terán *et al.*, 2005).

Mecanismos no genómicos del receptor estrogénico

Las hormonas esteroides inducen efectos que no necesitan de la actividad transcripcional del receptor, como la activación del adenilato ciclasa, de la tirosine-quinasa de las MAPK, PI3K; la producción de segundos mensajeros y el aumento de calcio intracelular. Estos efectos ocurren en un corto tiempo para ser mediados por la síntesis de ARN y formación de proteínas son denominados efectos no genómicos, finalmente activan otros factores de transcripción nuclear, a estos efectos se le denomina señalización iniciada por esteroides en membrana o MISS (Bottino y Lanari, 2010).

SUBSTANCIAS UTILIZADAS

Mecanismo de acción de los SERMs

El efecto de los Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs por sus siglas en inglés) es bloqueando por inhibición competitiva la función de los RE (α , β), pues se unen a ellos con similar afinidad que los E, disocian las proteínas chaperonas, producen dimerización del receptor, sin embargo no se crea la superficie AF-2 ni la formación de las proteínas correguladoras requeridas para la activación transcripcional del ERE. El efecto agonista de los SERMs se explica porque activan la vía alternativa del ERE AP-1 que, promueven y activan genes diana por un mecanismo no claro, pero que requiere la presencia constante de la función AF-1 en el dominio A/B, así como de proteínas correguladoras (Despaigne, 2001).

Tamoxifen

Pertenece al grupo de los SERMs el cual tiene efectos estrogénicos y antiestrogénico, dependiendo del órgano involucrado (Motrich *et al.*, 2007), se ha utilizado ampliamente para el tratamiento paliativo del cáncer de mama avanzado desde su introducción a principios de 1970 y en la última década, se ha utilizado como tratamiento adyuvante en la enfermedad en estadio temprano (Muthusamy *et al.*, 1994).

El tamoxifen se une a los REs intracelulares, induciendo un cambio conformacional en el receptor, lo que resulta un bloqueo o cambio en la expresión de genes dependientes de E (Irrarrázaval, 2011). La prolongada unión del tamoxifen a la cromatina nuclear genera una reducción en la actividad de la DNA polimerasa. Después de la aromatización de andrógenos testiculares a E, el tamoxifen impide que se forme el complejo receptor-estrógenos, por ocupar los receptores estrogénicos intracelulares, de esta manera los estrógenos no interactúan en las neuronas que conforman el núcleo dimórfico sexual de la región preóptica (SDN-POA). El efecto inhibitorio del tamoxifen en la vida postnatal sobre el desarrollo y diferenciación del SDN-POA en ratas macho, no solo actúa impidiendo la aromatización de los andrógenos testiculares a estrógenos, sino también a la subsecuente interacción de estos estrógenos con el material nuclear (Döhler, 1984).

Metabolismo del Tamoxifen

El tamoxifen es primariamente convertido en dos metabolitos distintos: N-desmetil-TAM y 4-hidroxi-TAM. Cualquiera de los dos tiene capacidad de convertirse en 4-hidroxi-N-desmetil-TAM. El 4-hidroxi-TAM es considerado el principal metabolito activo de tamoxifen debido a su alta afinidad por los receptores estrogénicos y por tener de 30 a 100 veces mayor afinidad que el propio tamoxifen (Jordan *et al.*, 1977; Clarke *et al.*, 2003).

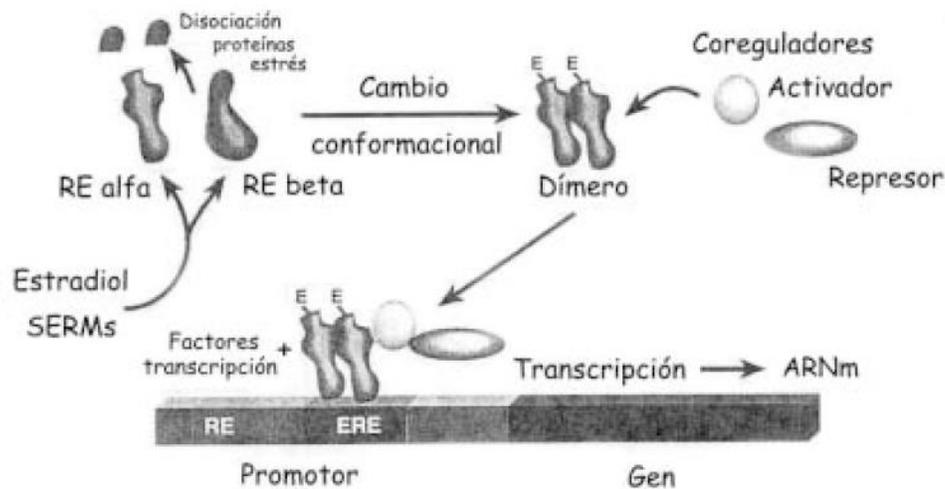


Figura 3. Mecanismo de acción molecular de los estrógenos. RE: receptor estrogénico; ERE: elemento de respuesta a estrógenos; ARNm: ácido ribonucleico mensajero; SERMs: moduladores selectivos del receptor estrogénico (Terán *et al.*, 2005).

Propionato de testosterona

El Propionato de testosterona (PT), se hidroliza rápidamente en testosterona, la cual es metabolizada a los esteroides 17-ceto a través de dos vías diferentes. Los principales metabolitos activos son el estradiol y la dihidrotestosterona (DHT). La testosterona es una hormona esteroide del grupo de andrógenos, secretada principalmente desde los testículos, siendo la hormona sexual de los machos y un esteroide anabólico. En las hembras, se produce en los ovarios, glándulas suprarrenales y por la conversión de androstenediona en la periferia (Vela *et al.*, 2009).

El tratamiento prenatal o postnatal con testosterona produce una disminución de las respuestas lordóticas en las ratas, así como la presencia de conducta sexual parecida al macho en las hembras aunque el tratamiento prenatal es más eficaz que el tratamiento postnatal de testosterona en la supresión del comportamiento de lordosis, sin embargo la combinación de tratamientos prenatal/postnatal, es más eficaz (Juárez *et al.*, 1995).

Mecanismo de Acción de la Testosterona

Los efectos de la testosterona (T) en los seres humanos y otros vertebrados se producen por medio de dos mecanismos principales: por la activación del receptor de andrógenos (directamente o como DHT), y mediante la conversión a estradiol y la activación de los receptores de estrógeno. La T libre es transportada en el citoplasma de las células del tejido diana, donde se puede unir al receptor de andrógenos, o puede reducirse a 5- α DHT por la enzima 5- α -reductasa citoplasmática. La DHT se une al mismo receptor de andrógenos incluso más fuertemente que T, de manera que su potencia androgénica es de aproximadamente 2.5 veces más que la T. El T-receptor o complejo DHT-receptor experimenta un cambio estructural que permite que se mueva en el núcleo celular y se unen directamente a secuencias específicas de nucleótidos del DNA cromosómico. Las áreas de unión se denominan elementos de respuesta a hormonas (HRE), e influyen en la actividad transcripcional de ciertos genes, produciendo los efectos androgénicos (Vela *et al.*, 2009).

Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos vegetales naturales no esteroideos (Jacob *et al.*, 2013) que son estructural y funcionalmente similares a los estrógenos, ejercen su efecto estrogénico en el SNC y en el sistema reproductivo de machos y hembras (Mostrom y Evans, 2012). Químicamente los fitoestrógenos pertenecen a varias familias de compuestos, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides, los isoflavonoides (Genisteina), los coumestanos (coumestrol), los lignanos y los estilbenos (Ze-hua *et al.*, 2010; Pérez Rivero, *et al.*, 2007), los cuales tienen efectos en la reproducción. La importancia de los fitoestrógenos radica principalmente en que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos, ya que ejercen sus efectos tanto en machos como en hembras, en tejidos donde existen RE (Lenis *et al.*, 2010; Ososkis y Kennelly, 2003; Whitten *et al.*, 2002). Se ha reportado con la administración de coumestrol a diferentes dosis se observa alteraciones en la concentración de espermatozoides, así como en el comportamiento sexual de perros machos (Pérez Rivero *et al.*, 2009)

Coumestrol

El Coumestrol (Cou) es un fitoestrógeno de la familia de los coumestranos, se encuentran en plantas como la alfalfa (*Medicago sativa*), altera el aparato reproductor tanto en hembras como en machos de bovinos, ovinos, perros y en algunos animales silvestres identificados como fauna nociva como es el caso del vampiro común (*Desmodus rotundus*) donde se han reportado alteraciones como folículos hemorrágicos, úteros turgentes, retención placentaria y cambios en la histoarquitectura de los testículos, disminución de la libido en los machos entre otros (Pérez-Rivero *et al.*, 2013; Pérez-Rivero *et al.*, 2009). El Cou se une a receptores estrogénicos beta (RE β) con mayor afinidad que incluso el 17 β estradiol, el cual tiene un efecto agonista y antagonista dependiendo de la dosis (Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

Lenis *et al.*, (2010) reporto que en bovinos machos que ingieren pastura que contiene Cou, ocasiona metaplasia glandular y epitelial, tanto en la próstata como en las glándulas bulbo-uretrales. En otro estudio con ratas Wistar machos de dos días de nacidos reportan que con la administración de 4mg/kg de Cou durante 16 días por vía subcutánea se observó disminución del lumen de los túbulos seminíferos e incremento del índice apoptótico de células germinales (Atanassova *et al.*, 2000).

Por otra parte con la administración de 100 μ g de Cou en ratones hembra de 1 a 5 días de nacidos produce cambios en los ovarios como es la presencia de folículos hemorrágicos y folículos poli ovulares (Burroughs, 1995). Los ratones hembra prepúberes de la cepa Swiss Webster que han sido alimentados durante cinco días con 20 g de alimento que contenga intencionalmente 90 mg/kg de Cou, presentaron edema uterino (Galeyetal, 1993).

Se ha demostrado que el tratamiento con Cou en perros durante cuatro semanas tiene un efecto oligospermico y teratospermico lo que indica que potencialmente el uso de Cou podría servir de base para el desarrollo de nuevas estrategias para el control de poblaciones, como un producto que se administre y que interfiera con la respuesta sexual del macho y disminuya el conteo de espermatozoides eyaculados. (Pérez-Rivero *et al.*, 2009). Lo reportado anteriormente se ha administrado por vía oral, es necesario evaluarlo por otras vías de aplicación como la parenteral, donde nos permita reducir el manejo de los animales y que sea con una sola aplicación.

QUITINA Y QUITOSÁN

La quitina presenta similitud con la de la celulosa, la diferencia entre ellas se encuentra en el carbono 2 que contiene un grupo hidroxilo en la celulosa y un grupo acetamida en la quitina. La quitina poli [β (1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos], es el componente orgánico más abundante en la estructura esquelética de muchas de las variedades que conforman el grupo de los invertebrados como el caparazón de crustáceos tales como cangrejos, camarones, langostas o se puede encontrar en algunos microorganismo como levaduras y hongos (Sánchez *et al.*, 2007; Miranda y Lizárraga, 2012). El quitosán poli [β (1-4)-2-amido-2-desoxi-D-glucopiranos], es un polisacárido derivado de la desacetilación de la quitina (Miranda y Lizárraga, 2012).

Propiedades físico químicas

Sus componentes son unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina (Vivek *et al.*, 2015), Es una poliamina lineal con un número de grupos amino que están fácilmente disponibles para la reacción química y la formación de sales con ácidos. Las características importantes de quitosán son su peso molecular, la viscosidad, el grado de desacetilación (40-98%) (Singla y Chawla, 2001). El quitosán tiene una alta densidad de carga, se adhiere a las superficies cargadas negativamente y con un pKa de aproximadamente 6.5 en los grupos amina. El quitosán es insoluble a pH neutro pero soluble y cargado positivamente a pH ácido (Singla y Chawla, 2001; Vivek *et al.*, 2013). El quitosán es biodegradable, biocompatible, no produce respuesta del sistema inmune y no es tóxico (Sánchez *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

El empleo de moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) en el periodo perinatal como el tamoxifen, en ratas machos de una hora de nacidos y sacrificados 3 h. después, el patrón de expresión génica de los receptores estrogénicos es muy similar al de las hembras, lo cual sugiere que el tratamiento feminiza el hipotálamo del macho y resalta la importancia del estradiol en el proceso de diferenciación sexual del hipotálamo. Por otra parte el uso de esteroides como el propionato de testosterona en hembras genera un aumento en el desarrollo dendrítico dentro de los núcleos sexuales del área preóptica similar a la de los machos. (Herrera, et al., 2005). Con el uso de disruptores endocrinos como el coumestrol el cual se une a los receptores estrógeno alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$) produciendo un efecto agonista o antagonista dependiente de la dosis, aunado a que el coumestrol tiene afinidad al sitio activo de la enzima citocromo p450 aromatasas, interfiriendo con la transformación de la testosterona en estrógenos aromatizados (Hong et al., 2007). Su empleo muestra un panorama alentador para ser utilizado en la inducción de alteraciones de tipo reproductivo, las cuales pueden ser aprovechadas para el control de poblaciones de animales adultos catalogados como fauna nociva (FN) (Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los animales catalogados como fauna nociva representan riesgos por ser transmisores de enfermedad o que generan cuantiosas pérdidas económicas para la industria alimenticia, se han desarrollado estrategias para su control ya sean letales o no letales, el problema de los métodos letales es que generan nichos ecológicos vacíos los cuales se pueden repoblar con alguna otra especie o con la misma las cuales pueden ser portadoras de nuevas enfermedades. De ahí la importancia de valorar nuevos métodos de control de tipo reproductivo que sean poco invasivos, y que produzcan esterilidad a largo plazo, para mantener el nicho ecológico ocupado y que la población se mantenga estable con tendencia a la disminución.

HIPÓTESIS

La administración de tamoxifen, propionato de testosterona y coumestrol con un termogel de quitosán al día 17 de la gestación en ratas Wistar, afectan la expresión de los receptores estrogénicos α y β en el hipotálamo de las crías.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tamoxifen, propionato de testosterona y coumestrol en la expresión de los receptores estrogénicos α y β en el hipotálamo de ratas Wistar, como una posible alternativa de control reproductivo en fauna nociva.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Administrar el termogel quitosán con tamoxifen, propionato de testosterona y coumestrol y evaluar su efecto en el patrón de exfoliación del epitelio vaginal.
2. Aplicar termogel de quitosán por vía subcutánea en ratas hembras al día 17 de su gestación y evaluar su efecto en la expresión de los receptores estrogénicos α y β en el hipotálamo de neonatos de 6 y 48 horas de nacidas.
3. Administrar tamoxifen con un termogel de quitosán por vía subcutánea en ratas hembras al día 17 de su gestación y evaluar su efecto en la expresión de los receptores estrogénicos α y β en las crías, a las 6 horas de nacidas.
4. Administrar propionato de testosterona con un termogel de quitosán por vía subcutánea en ratas hembras al día 17 de su gestación y evaluar su efecto en la expresión de los receptores estrogénicos α y β en las crías, a las 6 y 48 horas de nacidas.
5. Administrar coumestrol con un termogel de quitosán por vía subcutánea en ratas hembras al día 17 de su gestación y evaluar su efecto en la expresión de los receptores estrogénicos α y β en las crías, a las 6 y 48 horas de nacidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

Ética.

El presente protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (CICUAL-UAM-X) con el número 128 fechado el día 22 de enero de 2015.

Obtención de reproductores.

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar hembras y machos adultos así como sus respectivas crías, todos los animales fueron criados y alojados en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, bajo las condiciones marcadas en la NOM-062-ZOO-1999, que incluyen condiciones constantes de luz-oscuridad (12 hrs de luz-12 hrs de oscuridad), temperatura $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad controlada, 11 a 15 cambios de aire por hora, sanitización programada, agua y alimento *ad libitum*.

Citologías Vaginales.

Se utilizaron 16 hembras las cuales fueron divididas en 4 grupos como se muestra en la tabla 1.

A todos los animales se les realizó citología vaginal exfoliativa (Figura 4), a cada una de ellas durante 3 ciclos estrales según lo descrito por Goldman *et al.*, (2007) para verificar su normalidad endócrino-reproductiva, una vez observada a cada grupo se le administró un tratamiento diferente el cual se muestra en la tabla 1.

Una vez administrados los tratamientos se les realizaron de nueva cuenta citologías vaginales durante tres semanas. Se contaron 100 células en cada una de las laminillas utilizando un microscopio Optisum utilizando el objetivo 40x, se obtuvo la proporción de cada estirpe celular.

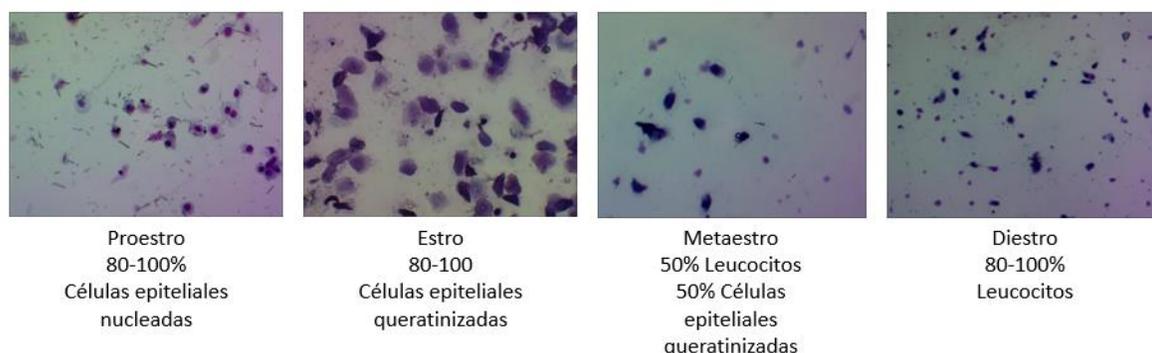


Figura 4. Tipos celulares en el ciclo estral de la rata.

Tabla 1. Citología vaginal exfoliativa		
Hembras	Control positivo quitosán (n=5)	200µl de quitosán
	Tratadas 1 (Tx) (n=3)	8 mg de tamoxifen en 200µl de quitosán
	Tratadas 2 (PT) (n=3)	1.2 mg de propionato de testosterona en 200 µl de quitosán
	Tratadas 3 (COU) (n=5)	800 µg de coumestrol en 200 µl de quitosán

Para obtener el control del ciclo estral en cada una se les realizó citologías vaginales tres semanas antes de la aplicación del tratamiento.

Animales.

Machos.

Se utilizaron 5 machos mayores de 90 días de edad, con fertilidad probada, con peso mayor a 300 gramos, los cuales fueron evaluados en su capacidad reproductiva mediante la observación de su conducta copulatoria, la presencia del tapón seminal en la hembra después de la cópula y su capacidad para producir gestación.

Hembras.

Se seleccionaron 20 ratas hembras de 60 días de edad, con peso aproximado de 200 gramos, a las cuales se les realizó la determinación de la regularidad del ciclo estral mediante citología vaginal diaria durante un mínimo de tres ciclos.

Las ratas cuyo ciclo estral presentaron características normales se colocaron en presencia de machos para permitir una primera gestación. La primera camada no se utilizó, ya que sirvió de referencia para demostrar la capacidad reproductiva de las ratas seleccionadas, así se realizó una segunda selección de acuerdo al comportamiento maternal observado.

De acuerdo a estas observaciones se seleccionaron 15 ratas con ciclo estral normal, con camadas normales, con comportamiento maternal adecuado y se gestaron. Se dividieron en cinco grupos de tres ratas hembras cada uno y al día 17 de gestación se administró el tratamiento como se muestra en la tabla 2.

Como el principal objetivo es estudiar a las crías en tiempos muy cercanos al nacimiento, se requirió un control riguroso del tiempo en que ocurre este evento, por lo que se llevó el control del tiempo de la fecundación y se realizó vigilancia constante de las madres, sobre todo al final de la gestación para anotar la hora exacta en que ocurrieron los partos.

TRATAMIENTO.

Se administró por vía subcutánea, el procedimiento para la aplicación del tratamiento, se realizó bajo anestesia general la cuál fue a base de isoflurano 3% y oxígeno, se realizó la antisepsia de la región dorsal mediante rasurado con maquina de la marca Oster® y una cuchilla del número 40, lavado con jabón quirúrgico a base de benzalconio de la marca Antibenzil® y la aplicación final de alcohol étílico al 70%.

Se administró el tratamiento con jeringas de 1 ml y aguja del número 21 en la zona dorsal. Una vez realizada la inyección, la parte afectada del animal se cubrió con vaselina (figura 5), las hembras se regresaron a su alojamiento individual y se continuó con el manejo de rutina y vigilancia constante hasta el momento del parto.

Se determinó que el momento del parto sera la hora cero y se sacrificarán las crías a diferentes tiempos, como se muestra en la tabla 3.



Figura 5. Administración del tratamiento bajo anestesia con isoflurano y oxígeno

Tabla 2. Tratamientos hembras gestantes		
Hembras	Control negativo	Sin tratamiento
	Quitósán (Qui) (n=3)	200µl de quitósán
	Tratadas 1 (Tx) (n=3)	8 mg de tamoxifen en 200µl de quitósán
	Tratadas 2 (PT) (n=3)	1.2 mg de propionato de testosterona en 200 µl de quitósán
	Trata 3 (COU) (n=3)	800 µg de coumestrol en 200 µl de quitósán

Cinco grupos (n=3) Tratamiento que se les administró a las hembras al día 17 de su gestación.

Tabla 3. Tiempos de eutanasia						
		Hembras crías		Mahos crías		Total
Grupo		6 horas	48 horas	6 horas	48 horas	
HEMBRAS TRATADAS	Control Negativo N=2	2	2	2	2	8
	(Qui) N=2	2	2	2	2	8
	Tratadas 1 (Tx) N=2	2	x	2	x	4
	Tratadas 2 (PT) N=2	2	2	2	2	8
	Tratada 3 (Cou) N=2	2	2	2	2	8
	Total	10	10	10	10	40

* (Qui) Quitosán, (Tx) Tamoxifen, (PT) Propionato de testosterona, (Cou) Coumestrol,

Eutanasia.

Este se realizó en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Obtención de los Hipotálamos.

La extracción de los hipotálamos se realizó utilizando una navaja de bisturí para escindir la piel del cráneo a nivel del agujero del foramen magnum, después con unas pinzas hemostáticas, a través de la estructura anteriormente señalada, se fractura el cráneo desde la región occipital hacia la región frontal, el cerebro se disecó y colocó sobre su superficie dorsal a 4°C. Después se irrigó brevemente con agua destilada fría, para quitar la sangre

contaminante, posterior a esto se realizaron los siguientes cortes (Vangala, 1973; Herrera, *et al.*, 2013).

Corte Anterior	Límite Anterior del Quiasma Óptico
Corte Posterior	Cuerpos Mamilares
Corte Lateral	Surcos Hipotalámicos Laterales
Corte Superior	Comisura Anterior

Una vez extraídos los hipotálamos se pesaron y se almacenaron a -70°C , hasta el momento de usarse.

ANÁLISIS DE MUESTRAS.

Extracción del RNA.

La extracción de RNA se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del reactivo TriPure Isolation Reagent, Roche No. Cat. 11 667 265 001, de la siguiente manera:

Homogenización o lisis celular.

Los hipotálamos se les agregó 0.5 ml de TriPure por cada >50 mg de tejido aislados, se homogenizó individualmente utilizando para esto un homogenizador vidrio teflón tipo Potter-Elvehjem unido a un motor eléctrico (20 golpes)

Fase de separación.

Las muestras homogenizadas se incubaron por 5 minutos entre 15 a 25°C para permitir una disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Después, se le agregó $100\ \mu\text{l}$ de cloroformo, los tubos se agitaron en un vortex por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente (aprox. 25°C) durante 5 minutos. Finalmente se centrifugaron las muestras a $12,000\ \times\ \text{g}$ por 15 minutos a 4°C .

Precipitación.

Una vez conseguida la fase de separación, se removió la fase acuosa que es la que contiene el RNA total y se transfirió a otro tubo de 1.5ml. Se precipitó con 250 µl de isopropanol y se agitó en vortex por 15 segundos, después se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos, para finalmente centrifugar a 12 000 x g por 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante, conservando solo el pellet de RNA.

Lavado.

Para eliminar las sales residuales, el pellet de RNA se lavó con 500 µl de etanol al 75 % con agua bidestilada, se mezcló en un agitador vortex y se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Por decantación se eliminó el líquido residual. Se dejó secar durante 10 minutos bajo una campana de flujo laminar horizontal modelo CFLH-90 de la marca NOVATECH. Finalmente el pellet se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNasa y se dividió en 3 viales de 10 µl cada uno.

Cuantificación del RNA.

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Epoch de la marca BioTek. Se depositaron 2 µl de cada muestra de RNA por duplicado sobre la placa de micro-volúmenes Take3, realizando lecturas en absorbancias de 260 y 280 nm.

Electroforesis de RNA.

Para corroborar el grado de pureza del RNA se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 5% en un campo eléctrico a 80 Volts con 400 mA durante 60 minutos, se usó como agente intercalante Gel Red® y como buffer de corrida Tris, ácido acético, EDTA (TAE) al 1%. Una vez terminada la corrida, el gel de agarosa se visualizó en un fotodocumentador de la marca UVITEC, mediante el cual pueden observarse las bases apiladas de RNA exhibiendo una fluorescencia bajo luz ultravioleta. La integridad del RNA se revisó mediante el tamaño de las bandas donde se observará su presencia (ver tabla 4), (ver figura 8).

Tabla 4. Integridad del RNA		
RNA	RNA	Tamaño de la banda
RNA ribosomal (unidad)	28S	5 kB
	18S	2kB
	5S	0.3kB
RNA de transferencia	ARNt	0.1kB

RT-PCR.

Primera Fase.

Se seleccionaron los RNAs que presentaron una relación 260/280nm entre 1.8-2.0, y que presentaron un patrón electroforético para los RNAs ribosomales acorde a la tabla 4. Posteriormente se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de RNA total empleando hexámeros al azar con el Kit ImPromII-Reverse Transcription Sistem de PROMEGA No. Cat. A3800. Se utilizó random primer hasta 5 µg y agua libre de nucleasa en volumen final de 5µl., se incubó durante 5 minutos a 70°C. y se redujó la emperatura a 4°C.

Segunda fase: Se preparó el mix de retrotranscriptasa, utilizando buffer de reacción Improm-11 5x 4µl, MgCl₂ 25 mM 2.4µl, dNTP mix 10mM 1µl, inhibidor de ribonucleasas 20u, la enzima de transcripción reversa Improm-II 1µl y agua libre de nucleasa para obtener un volumen de 15µl, se mezcló con los tubos de 5µl de la primera fase y se obtuvo un volumen final de 20µl.

Fase de alineación.

Se utilizó a una temperatura de 25°C. durante 5 minutos.

Fase de extención.

A una temperatura de 42°C. durante 60 minutos.

Para inactivar la enzima Improm-II se incubó a 70°C. por 15 minutos, se cuantificó el cDNA y se congeló hasta su uso.

PCR punto final.

Se realizó la PCR punto final del cDNA de las muestras control para estandarizar las condiciones de alineación, para amplificar el gen constitutivo (HPRT) con un amplicon de 110 pares de bases y para los genes de RE α y β con un amplicon de 344 y 261 pares de bases respectivamente. Se utilizó el kit Taq PCRx DNA Polymerase, con el número de catálogo 11508-017, de Invitrogen®, siguiendo las intrucciones recomendadas del fabricante. Para cada vial de 0.2 ml se agregó 2 μ l de 10x buffer PCR, 0.4 μ l de dNTP 10 mM, 0.6 μ l $MgCl_2$, 2 μ l de primer forward, 2 μ l del primer reverse (ver tabla 4), 1 μ l del templado, 0.1 μ l de Taq DNA polymerase y agua cuanto baste para un volumen final de 20 μ l.

Electroforesis de PCR punto final.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la PCR punto final, para corroborar el tamaño de cada amplicon, con un campo eléctrico a 80 Volts con 400 mA durante 60 minutos, se usó como agente intercalante Gel Red® y como buffer de corrida Tris, acético, EDTA (TAE) al 1%. Una vez terminada la corrida, el gel de agarosa se visualizó en un fotodocumentador UVITEC, mediante el cual pueden observarse las bases apiladas de cDNA exhibiendo fluorescencia bajo la luz ultravioleta (ver figura 7).

PCR Tiempo Real.

La Q-PCR se realizó en un equipo Roche LightCycler 1.5 utilizando diseños específicos para los genes mostrados en la tabla (5). Así como el Kit LightCycler® FastStart Essential DNA Green Master , No. de Cat. No.06402712001, se realizó a partir de 1 μ l de cDNA, primers 10 pM (0.5 μ l), en un volumen total de 10 μ l de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el kit, para los genes de HPRT y RE α y β , la preincubación fue a 95°C. durante 10 minutos, los tres pasos de amplificación fueron: incubación 95°C , 10 segundos, la alineación fue de (52°C. HPRT, 60°C RE α y β) 10 segundos, 72°C. por 10 segundos, para la fase de disociación fue de 95°C. por 10 segundos, 65°C. 60 segundos y 97° C. por 1 segundo y la fase de enfriamiento fue de 37°C durante 30 segundos. Se realizaron 45 ciclos de PCR.

Tabla 5. Genes, secuencias de los primers e identificación en el NCBI

Símbolo oficial	Primer Secuencia	Nombre del gen	Cromosoma	Localización	GeneID
REα	F- 5' AAT TCT GAC AAT CGA CGC CAG-3' R- 5'GTG CTT CAA CAT TCT CCC TCC TC-3'	<i>Rattus norvegicus</i> estrogen receptor 1 (Esr1)	1	1q11	24890
REβ	5'-TTC CCG GCA GCA CCA GTA ACC-3' 5'-TCC CTC TTT GCG TTT GGA CTA-3'	<i>Rattus norvegicus</i> estrogen receptor 2 (Esr2)	6	6q24	25149
HPRT	F-5' TTG CTG ACCT GCT GGA TTA C-3' R-5' CTG ACC AAG GAA AGC AAA GT-3'	<i>Rattus novergicus</i> Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferasa (HPRT)	X	q37	103689983
β Actina	F-5' AAG GCC AAC CGT GAA AAG R-5' GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAG	Actb actin, beta [<i>Rattus norvegicus</i>]	12	12p11	81822

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los datos obtenidos, se registraron en una matriz del programa Excel.

Para la citología vaginal exfoliativa se realizó un análisis univariado para obtener la media \pm desviación estándar, se realizó prueba de normalidad con Kolmogorov-Smirnov al no ser normales se realizó un análisis no paramétrico con la prueba de Mann-Whitney. También se obtuvieron las proporciones de cada una de los tipos celulares en cada tratamiento, se analizaron con tablas de contingencia, Odds ratio, al que se le calculó su intervalo de confianza al 95 % (IC95) y la prueba exacta de Fischer para los distintos estadios del ciclo estral que presentó cada grupo.

Se realizó prueba de Mann Whitney para analizar cual de los tratamientos es diferente, siendo un factor el grupo de animales, (Hipotálamos: H) (HC, HTx, HPT HCOU,) y otro los tiempos de eutanasia (6 y 48 hrs de edad) de los animales. Todas las muestras se desarrollaron por duplicado, se sumaron las dos relaciones de cada muestra y se calcularon las respectivas medias \pm su desviación estándar.

Para evaluar la expresión de los genes, se utilizó las medias de cada cq de la prueba de PCR TR, se normalizó con el gen constitutivo HPRT con la fórmula doble delta (Pfaffl., 2004) y se obtuvo la diferencia en la expresión relativa de cada tratamiento.

Para la comparación múltiple se realizó prueba de Tukey con un α $p < 0.05$ para los genes.

RESULTADOS.

Citología vaginal exfoliativa.

Con la administración de Qui se observó que la etapa del ciclo estral detectada con más frecuencia fue el proestro (Odds ratio 2.25: IC9:1.43-4.34) $p < 0.05$ (Prueba exacta de Fischer).

De igual manera con la administración de Tx, se observó mayor frecuencia de animales en proestro (Odds ratio 2.78: IC9:1.07-7.22) $p < 0.05$ (Prueba exacta de Fischer).

En lo que respecta al tratamiento con Cou, las ratas fueron detectadas de manera frecuente en estro (Odds ratio 2.98: IC9:1.53-5.79) $p < 0.05$ (Prueba exacta de Fischer).

Tabla 6. Citología vaginal exfoliativa

	Pre tratadas	Post tratadas	Tendencia	Pre tratadas	Post tratadas	Tendencia	Pre tratadas	Post tratadas	Tendencia
	Células Nucleada			Células Superficiales			Leucocitos		
Quitosán (n=5)	38.36 ± 3.42	48.11 ± 3.23*	↑	41.43 ± 3.44	48.95 ± 3.17	↑	20.08 ± 3.41	2.92 ± 1.21 *	↓
Tamoxifen (n=3)	48.18 ± 4.08	61.36 ± 5.26*	↑	36.25 ± 4.73	27.94 ± 4.79	↓	20.76 ± 3.76	19.16 ± 3.99	↓
P. Testosterona (n=3)	41.81 ± 4.72	33.22 ± 4.21	↓	42.93 ± 5.50	47.61 ± 5.98	↑	15.25 ± 3.20	19.16 ± 3.99	↑
Coumestrol (n=5)	34.32 ± 3.18	42.55 ± 3.31*	↑	48.39 ± 3.55	55.77 ± 3.2	↑	17.29 ± 2.87	1.61 ± 0.43*	↓

Media ± desviación estándar de cada grupo tratado.

(*) Diferencias significativas U Mann-Whitney ($p < 0.05$)

↑ ↓ Tendencia de cada tipo celular.

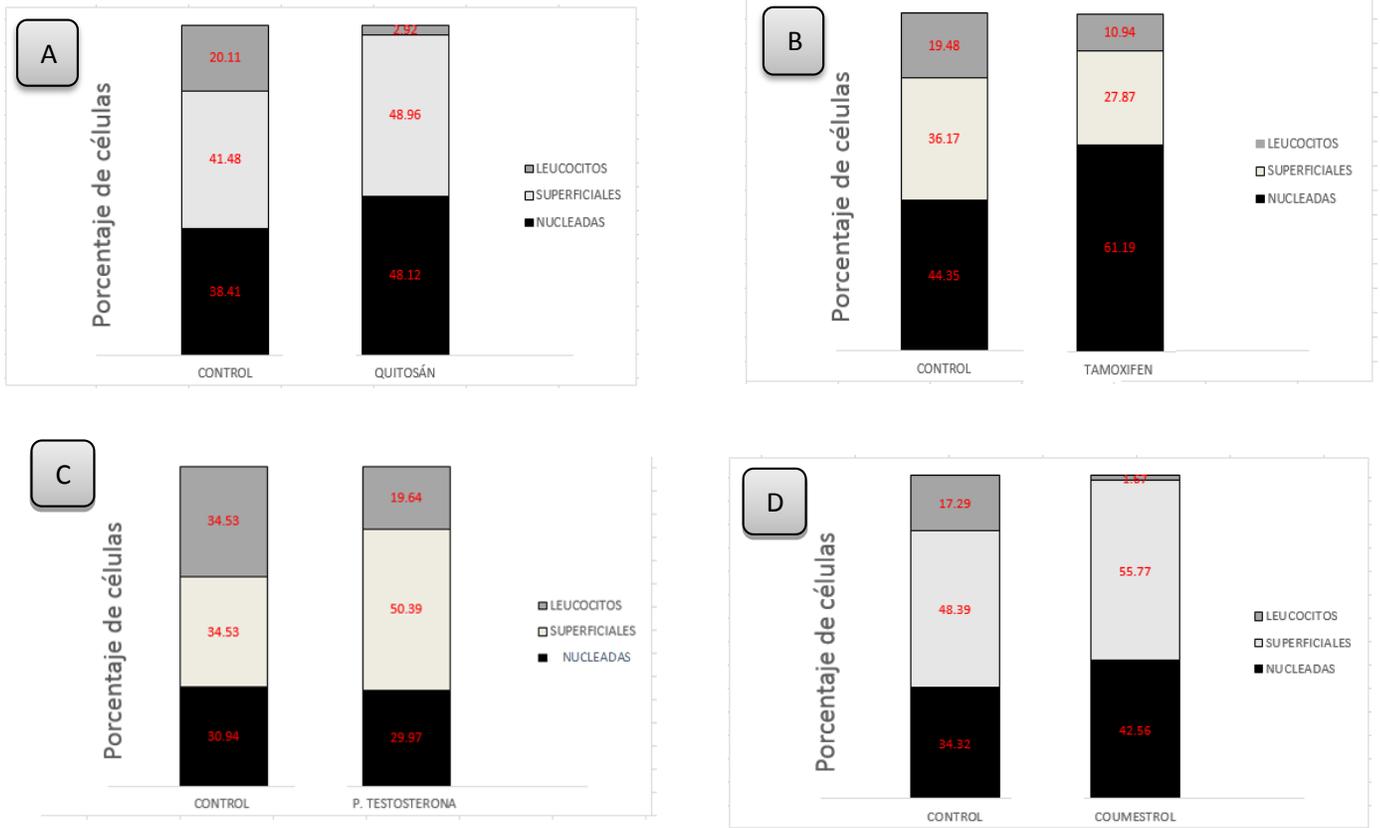


Figura 6. Se observa en cada una de las gráficas el porcentaje de cada tipo celular del epitelio de la vagina, A: grupo de quitosán (n=5), B: grupo con tamoxifen (n=3), C: grupo con propionato de testosterona (n=3), D: grupo con coumestrol (n=5).

Tabla 7. Prueba Exacta de Fisher y Odds Ratio del estadio del ciclo estral de cada grupo

Quitosán (proestro)

Tamoxifen (proestro)

SIN QUITOSÁN

SIN TAMOXIFEN

QUITOSÁN		SI	NO	TOTAL
	SI	43	28	71
	NO	32	47	79
	TOTAL	75	75	150

TAMOXIFEN		SI	NO	TOTAL
	SI	22	13	35
	NO	14	23	37
	TOTAL	36	36	72

	Estimado	Mínimo	Máximo
Odds Ratio	2.2556	1.1723	4.34
Exacto de Fisher	p<	0.0009100	*

	Estimado	Mínimo	Máximo
Odds Ratio	2.7802	1.0701	7.2231
Exacto de Fisher	p<	0.029256	*

Coumestrol (estro)

P. Testosterona (proestro)

SIN COUMESTROL

SIN P TESTOSTERONA

COUMESTROL		SI	NO	TOTAL
	SI	47	27	74
	NO	28	48	76
	TOTAL	75	75	150

P. TESTOSTERONA		SI	NO	TOTAL
	SI	6	10	16
	NO	30	26	56
	TOTAL	36	36	72

	Estimado	Mínimo	Máximo
Odds Ratio	2.9841	1.5358	5.7984
Exacto de Fisher	p<	0.00091002	*

	Estimado	Mínimo	Máximo
Odds Ratio	0.5200	0.1663	1.6264
Exacto de Fisher	p<	0.197854	

Se analizó la razón de probabilidad (Odds Ratio) y prueba exacta de Fisher para conocer cual de los estadios del ciclo estral de las ratas adultas se presentó con mayor frecuencia con cada tratamiento, donde el Quitosán y el Quitosán-Tamoxifen presentaron mayor frecuencia de proestro, para el Quitosán-Coumestrol presentó estro con mayor frecuencia y Quitosán-P. de Testosterona no presentó cambios.

(*) Diferencia Significativa $p < 0.05$



Figura 7. Se observa el gel de agarosa de la PCR punto final de β actina para corroborar que las muestras control de 6 horas y 48 horas de 4 machos y 4 hembras presentaron un amplicon de 210 pares de bases, el cual es el requerido. Hembra (H), Macho (M), Peso molecular 100 pb (PM) y Control (CO).

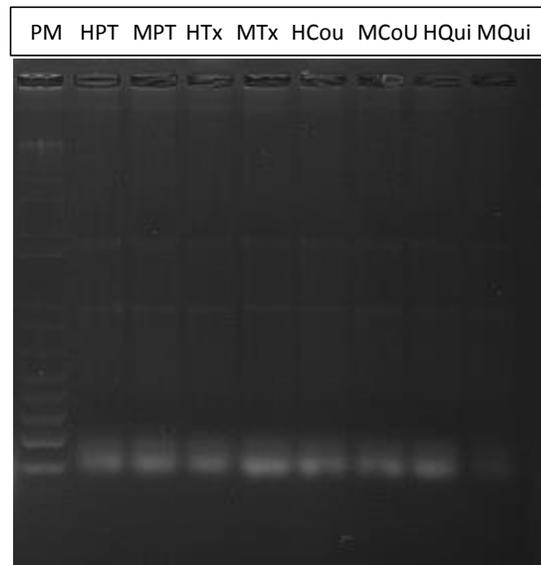


Figura 8. La integridad del mRNA de las crías hembras y machos de 6 horas de nacidas de cada tratamiento.

Expresión de los RE α y β .

Con relación a la expresión del RNAm de los receptores estrogénicos en el hipotálamo de los machos de 6 horas de nacidos, se observó que administrando termogel Qui aumentó 66.76 veces más en el RE β y 3.35 veces más en el RE α respecto al basal. En el tratamiento de Cou el RE β aumentó 20.48 y el RE α 1.36, para el tratamiento de PT el RE β aumentó 10.93 y 0.12 el RE α y el tratamiento de Tx el RE β incrementó 9.30 y el RE α 1.081 como se muestra en la Figura 9.

En los machos de 48 horas con la administración del termogel Qui se observó la expresión de RNAm de RE β aumentó 1.74 y RE α disminuyó 0.8 respecto al basal, el tratamiento de Cou el RE β disminuyó 0.16 y el RE α 0.39, el tratamiento de PT el RE β aumentó 1.90 y el RE α 1.85 (Figura 10).

La expresión de RNAm de los receptores estrogénicos de las hembras de 6 horas de nacidas, con la administración del termogel Qui aumentó para los RE β en 5.28 y para los RE α disminuyó 0.38. Con el tratamiento de Cou la expresión de RNAm de los RE β aumentó 3.97, disminuyendo 0.66 para el RE α . Con el tratamiento de PT el RE β aumentó 12.15 y 0.69 el RE α y el tratamiento de Tx el RE β incrementó 1.0 y el RE α 0.44 (Figura 11).

En cuanto a las hembras de 48 horas la administración del termogel Qui el RE β aumentó 0.60 y el RE α disminuyó 0.4, el tratamiento de Cou el RE β disminuyó 0.48 y 0.50 para el RE α , el tratamiento de PT el RE β disminuyó 0.17 e incrementó 0.17 el RE α (Figura 12).

En lo que respecta al RE β , la media \pm DE de las determinaciones del ciclo del umbral (Cq) de la prueba de PCR-TR en la crías machos de 6 horas se observó un incremento significativo respecto al basal, al comparar con los diferentes tratamientos, Qui 28.67 ± 0.27 , Cou 27.05 ± 0.31 , PT 25.68 ± 0.28 , Tx 25.98 ± 0.78 y el control de 24.52 ± 0.18 , todos los tratamientos presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 13).

Para el RE α el tratamiento de Qui fue de 25.64 ± 0.39 , el tratamiento de Cou 24.88 ± 0.38 , el tratamiento de PT 24.08 ± 0.46 , para el Tx 24.54 ± 0.75 y el control 26.37 ± 0.61 , los tratamientos de Cou, PT y Tx presentaron diferencias ($p < 0.05$) (Figura 13). Los machos de

48 horas en el RE β en el tratamiento de Qui 27.02 ± 0.29 , Cou 26.61 ± 0.42 , PT 27.86 ± 0.9 , y el control fue de 26.54 ± 0.23 , solo el tratamiento de PT presenta cambio significativo ($p < 0.05$). Para el RE α el Qui fue de 23.97 ± 0.55 , Cou $25.18 \pm 0.1.57$, PT $27.7 \pm 0.1.21$ y el control 24.4 ± 0.14 (Figura 14). En cuanto a las hembras de 6 horas el RE β no presenta diferencias respecto a los tratamientos donde el Qui fue de 26.96 ± 0.19 , Cou 27.53 ± 0.36 , PT 27.9 ± 0.89 , Tx 26.45 ± 0.26 y el control 25.75 ± 0.39 . Para el RE α el Qui fue de 24.04 ± 0.22 , Cou de 24.43 ± 1.12 , PT 24.05 ± 0.16 , Tx 25.01 ± 0.89 y el control 27.75 ± 0.39 donde el Qui y Pt disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) (Figura 15). Las hembras de 48 horas el RE β el Qui tuvo 27.81 ± 0.57 , Cou 27.05 ± 0.22 , PT 26.81 ± 0.8 y el control 29.99 ± 0.62 . Para el RE α el Qui fue de 23.97 ± 0.66 , el Cou 24.6 ± 1 , PT 24.88 ± 0.43 y el control de 24.56 ± 0.25 (Figura 16), ninguno de los dos receptores tuvieron diferencias.

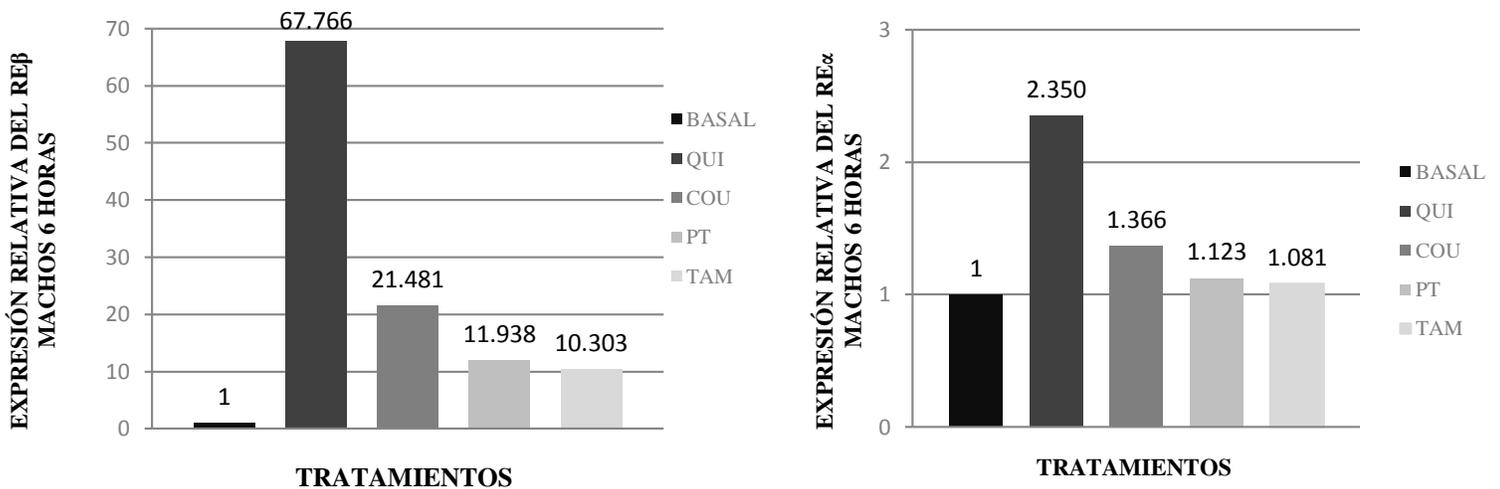


Figura 9. Se muestra la expresión relativa de los RE α y β en los hipotálamos de machos de 6 horas de nacidos.

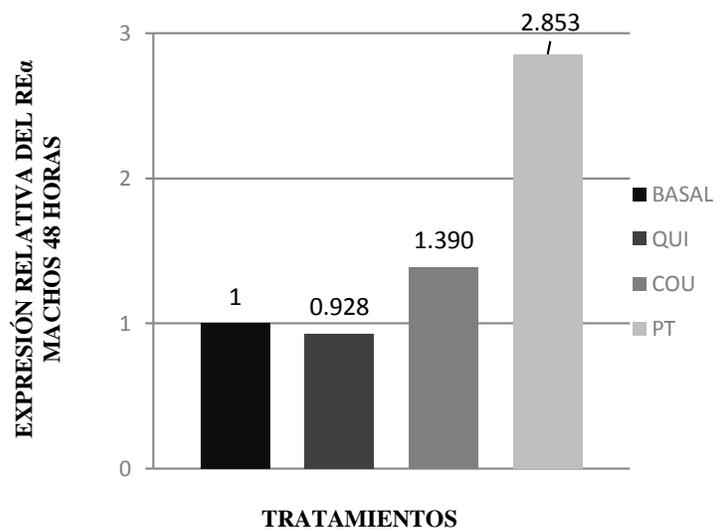
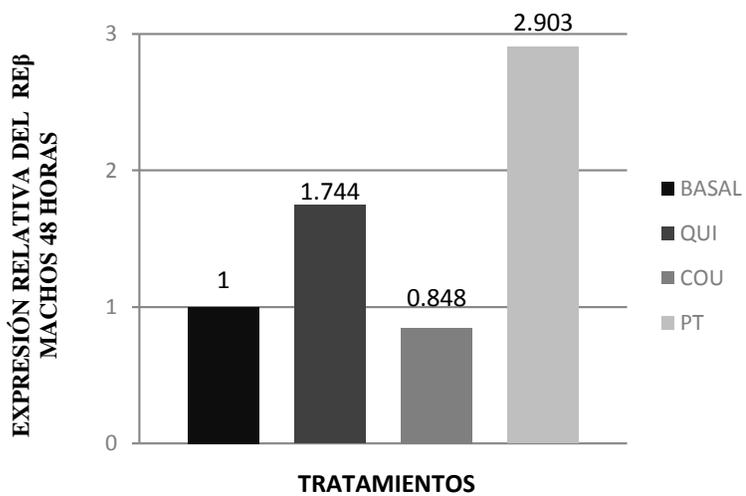


Figura 10. Se muestra la expresión relativa de los RE α y β de los hipotálamos de machos de 48 horas de nacidos.

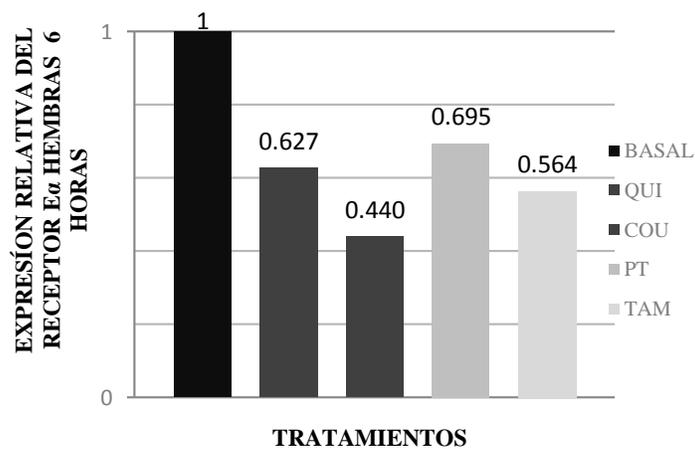
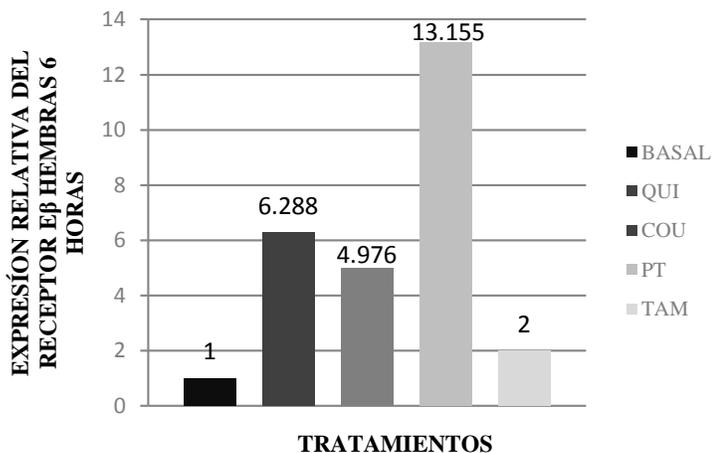


Figura 11. Se muestra la expresión relativa de los RE α y β de los hipotálamos de las hembras de 6 horas de nacidas.

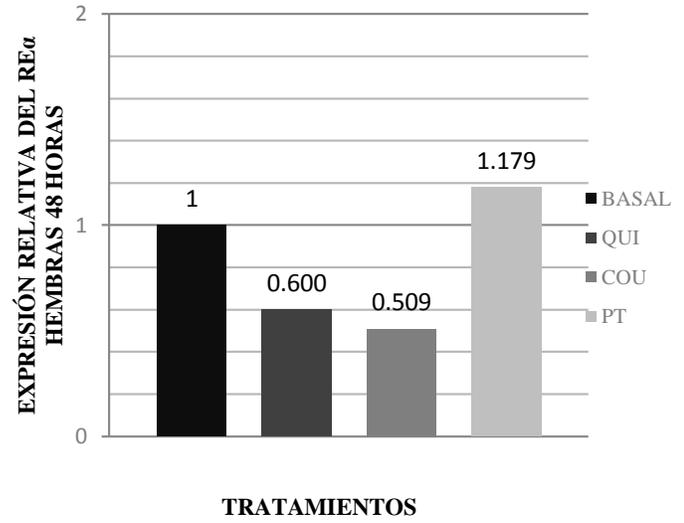
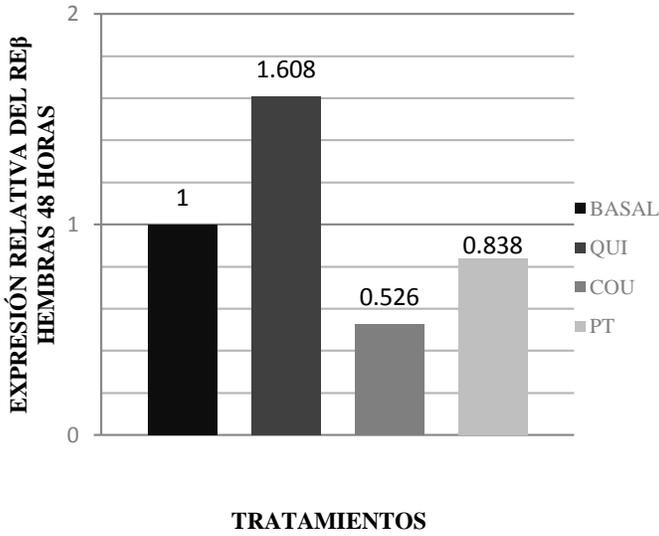


Figura 12. Se muestra la expresión relativa de los RE α y β de los hipotálamos de las hembras de 48 horas de nacidas.

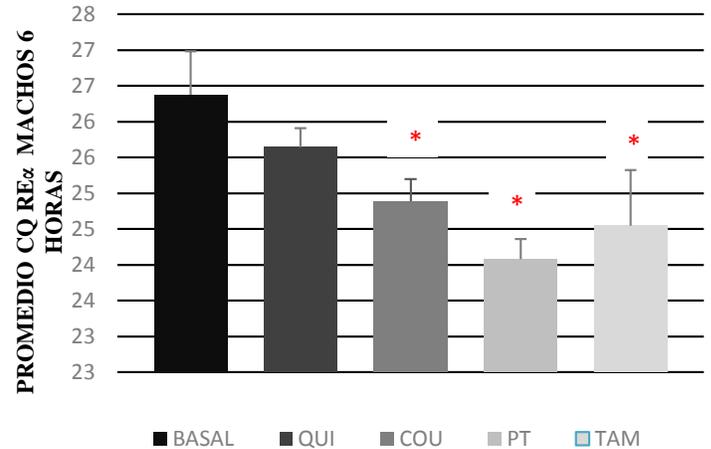
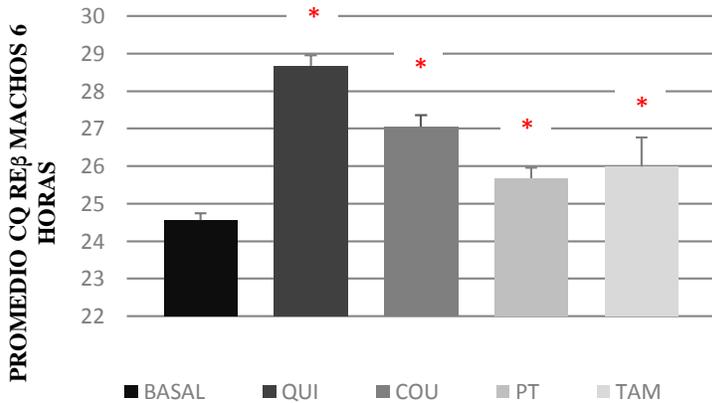


Figura 13. Se muestran las medias \pm DE del ciclo del umbral (C_q), de la prueba de PCR en tiempo real de las crías machos de 6 horas de nacidos en los RE α y β en hipotálamo, de cada tratamiento. (QUI) Quitosán, (COU) Coumestrol, (PT) Propionato de testosterona (* $p < 0.05$)

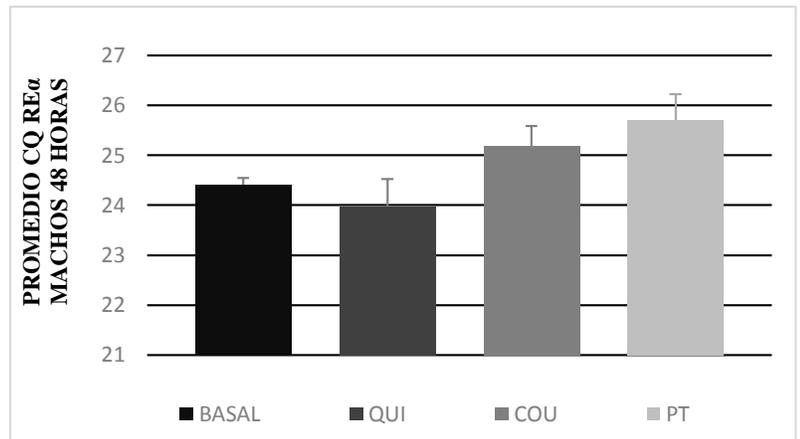
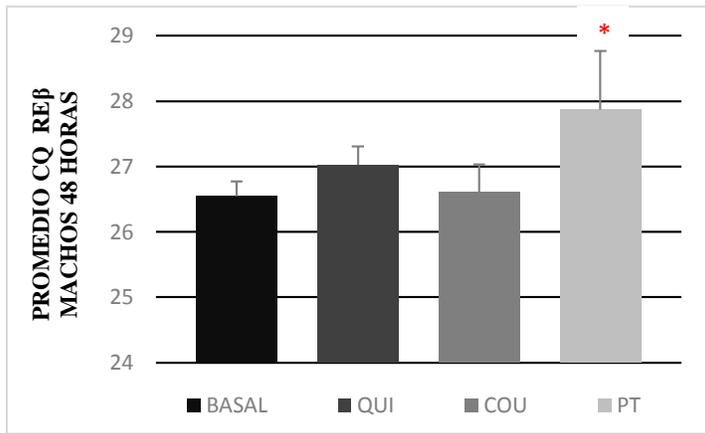


Figura 14. Se muestra las medias \pm DE del ciclo del umbral (Cq), de la prueba de PCR en tiempo real de las crías machos de 48 horas de nacidos en los RE α y β en hipotálamo, de cada tratamiento (QUI) Quitosán, (COU) Coumestrol, (PT) Propionato de testosterona.

(*) $p < 0.05$

RE α no presentaron diferencias significativas

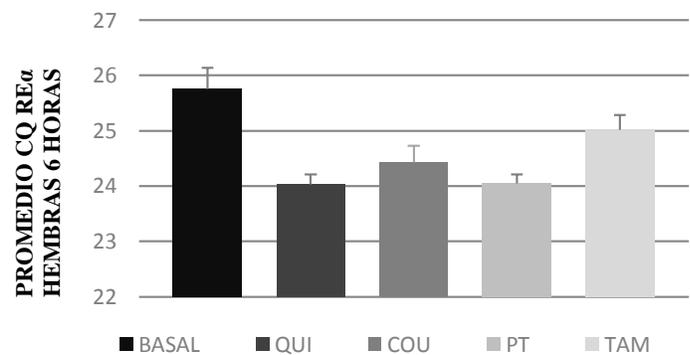
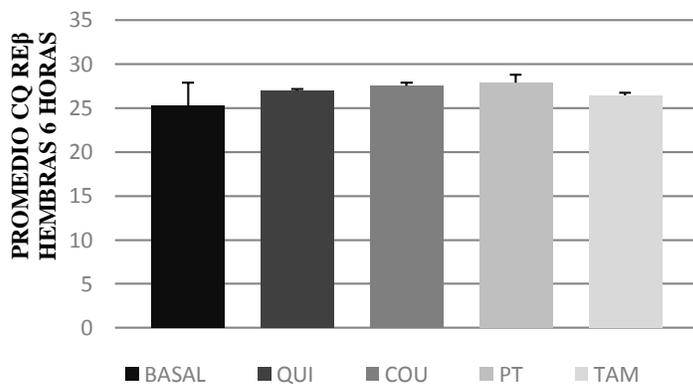


Figura 15. Se muestra las Medias \pm DE del ciclo del umbral (Cq), de la prueba de PCR en tiempo real de las crías hembras de 6 horas de nacidas en los RE α y β en hipotálamo, de cada tratamiento (QUI) Quitosán, (COU) Coumestrol, (PT) Propionato de testosterona, donde ambos receptores no presentan diferencia significativa respecto a los a las Cq de los animales intactos.

(*) $p < 0.05$

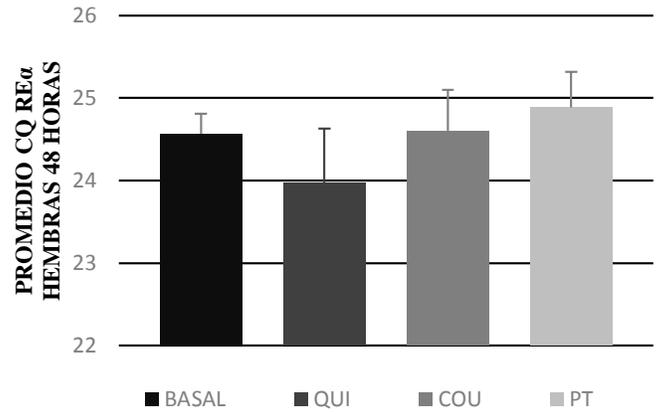
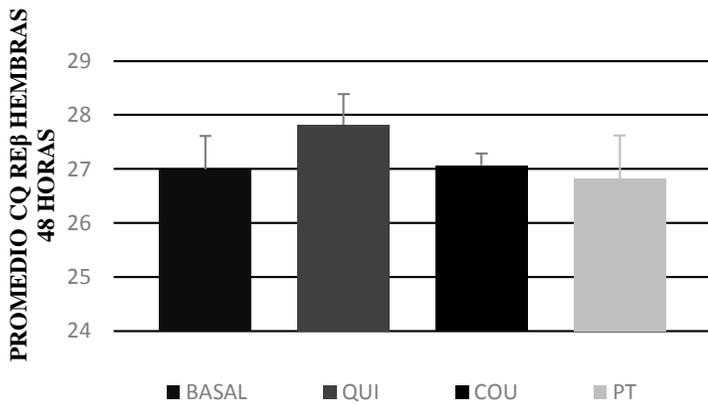


Figura 16. Figura 15. Se muestra las Medias \pm DE del ciclo del umbral (Cq), de la prueba de PCR en tiempo real de las crías hembras de 48 horas de nacidas en los RE α y β en hipotálamo, de cada tratamiento (QUI) Quitosán, (COU) Coumestrol, (PT) Propionato de testosterona, donde ambos receptores no presentan diferencia significativa respecto a las Cq de los animales intactos.

DISCUSIÓN.

Las hormonas sexuales (estradiol, testosterona) de origen gonadal principalmente juegan un papel importante en el desarrollo del cerebro y en el proceso de desfeminización/masculinización de los diferentes núcleos sexuales del hipotálamo (Brock *et al.*, 2015). En conjunto los resultados obtenidos del presente estudio muestran que con la administración de diferentes agentes como el coumestrol, el tamoxifen, el propionato de testosterona, asociados con un termogel de quitosán y administrados por vía subcutánea en ratas hembras con regularidad estral inducen cambios en el ciclo estral y cuando se administran el día 17 de la gestación, se observan diferentes cambios en la expresión de los RE a nivel hipotalámico durante la etapa crítica de la diferenciación sexual en las crías de las ratas tratadas de la siguiente manera.

Quitosán.

En el epitelio vaginal de las ratas, se observa un posible efecto estrogénico caracterizado por presencia de células nucleadas y superficiales, lo que concuerda de manera general con lo reportado por Rather *et al.*, (2013), quién al administrar 2 mg de Qui en *Cyprinus carpio*, observó un aumento en los niveles de la LH en el crecimiento folicular y en la secreción de E2.

Por otra parte la utilización de Qui en ratas machos con dietas altas en grasas y administrándoles quitosán se observó disminución en el peso corporal y en la concentración de lipoproteínas de baja densidad (Zhang *et al.*, 2012), aunado a un efecto reductor del colesterol a nivel plasmático en ratas alimentadas con dietas altas en grasa (Guangfei, 2007). Lo que puede estar sucediendo es que el colesterol entre en la vía esteroideogénica sirviendo como sustrato para el incremento de la síntesis de hormonas sexuales, lo que puede explicar en parte el efecto estrogénico observado en las citologías vaginales.

Coumestrol.

La mayor frecuencia de hembras que se encontraron en estro con la administración de Cou, coinciden con lo reportado por Galey *et al.*, (1993), referente a la presencia de edema uterino en ratones hembras prepúberes de la cepa Swiss Webster alimentadas durante cinco días con 20g de alimento que contenga intencionalmente 90 mg kg⁻¹ de Cou.

Por otra parte, la administración de 100 µg de Cou en ratones hembra de 1 a 5 días de nacidos produce folículos hemorrágicos y folículos poliovulares (Burroughs, 1995).

En ratas Sprague- Dawley se encontró que el Cou se une con afinidad similar al estradiol a los ER presentes en el útero y vagina (Branham *et al.*, 2000).

De manera regular, los REs en el hipotálamo tienen una expresión alta, mostrando distribuciones específicas en cada región (Takagi *et al.*, 2005), en el presente estudio en el hipotálamo de los machos y de las hembras de 6 horas de nacidos con el tratamiento de Qui-Cou se observó el incremento en la expresión del ARNm de los REβ, lo que sugiere que se presenta un efecto antiestrogénico sobre el REβ, lo que coincide con lo reportado por Patisaul *et al.*, (1999) quien administró 100 mg de Cou en ratas ovariectomizadas adultas durante una semana, donde se observó el aumento en la expresión de RNAm del REβ. Debido a que el proceso de masculinización depende de estrógenos y a que la acción de estos es bloqueada por el Cou induciendo un efecto antiestrogénico el cual puede interferir con la diferenciación del POA, Jacob (2001) se puede atribuir que en los animales tratados con Cou se observe el incremento de los ARNm de REα y β (6 horas) en los machos y en las hembras, estando disminuidos a las 48 horas.

Takagi *et al.*, (2005) reporta que con la administración de una dieta que contiene 1000 ppm de genisteína a partir del día 3 de gestación hasta el día 10 postnatal la expresión de los RE α,β en el hipotálamo en las crías no se alteraron en los machos ni en las hembras, situación que contrasta con lo reportado por (Jacob *et al.*, (2001) quien menciona que el Cou estimula la expresión del RNAm REβ en el PVN.

También se ha visto que los REβ están implicados en procesos fundamentales de adaptaciones cardiovasculares durante el desarrollo y proliferación celular como es el caso en el lecho vascular uterino, por lo que presentan un importante papel en reacciones angiogénicas uterinas de largo plazo mediadas por los REα y/o REβ (Pastore *et al.*, 2015).

Tamoxifen.

En el presente trabajo, las citologías vaginales se encontró mayor frecuencia de hembras en proestro, efecto esperado al administrar este fármaco, debido a que el Tx puede tener un efecto estrogénico o antiestrogénico dependiendo del tejido blanco, por ejemplo en el útero ejerce un efecto estrogénico (Bermejo-Aycart *et al.*, 2006; Sezgin, 1999). En un estudio con mujeres menopáusicas el 87% de ellas que recibieron Tx mostraron citologías vaginales con efecto estrogénico, comparados con el 20.9% de mujeres menopausicas pertenecientes al grupo control que no tomaron Tx (Bermejo-Aycart *et al.*, 2006).

El Tx estimula la producción hipotalámica de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Sezgin, 1999), o bien induce la expresión de receptores de progesterona en los gonadotropos de la hipófisis, dando como resultado el incremento en la secreción de LH (Sánchez-Criado *et al.*, 2006), efectos que pueden repercutir en la ovulación o en la formación de quistes foliculares.

En el presente trabajo la combinación Qui-Tx aumentó la expresión de los mARN RE β en los machos y hembras (6 horas), para el ARNm RE α en los machos incrementó (6 horas) y en las hembras disminuyó. Döhler *et al.*, (1985) menciona que con la administración de Tx durante la etapa prenatal se bloquea la unión del estradiol con sus receptores a nivel hipotalámico, lo que es corroborado por Treeck *et al.*, (2010), quien menciona que el Tx es antagonista de los estrógenos en distintos tejidos, por lo que la expresión de los RE β se incrementa cuando se realizan tratamientos con Tx.

Por otra parte Vancutsem y Roessler, (1997) mencionan que con el tratamiento con Tx se producen alteraciones en el tracto reproductivo como hipogonadismo, criptorquidismos, azoospermia además, a su vez, Döhler, (1991) reportó cambios en el comportamiento en las ratas machos.

De manera adicional, con la administración de 0.4 mg/kg de Tx durante los primeros 5 días de vida a ratones se observó que disminuye la expresión de Kiss 1 ARNm y reduce la densidad neuronal en el núcleo arcuato (ARC) y en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) del hipotálamo (Parandin *et al.*, 2017). Cao y Patisaul, (2011) demostraron que las expresión de RE α en el ARC Y AVPV es mas extensiva que el RE β durante el período neonatal en ratas.

Además se ha visto, que el tamoxifen actúa como modulador de los receptores estrogénicos en las células en proliferación, como es el caso de células tumorales, evitando su activación ante la presencia de estrógenos y con ello el crecimiento y proliferación de estas células.

Además regula a estos receptores, los cuales intervienen en la activación y regulación de ERK5, la cual es una proteína quinasa encargada de la regulación de la capacidad de comunicación de las señales del exterior de la célula al interior del núcleo (Wrobel *et al.*, 2016).

Además, el bloqueo del receptor de estrógenos con inhibidores frena el transporte de ERK5 al núcleo, por lo que podría haber una relación entre aquellas rutas moleculares implicadas en el transporte de factores desde el citoplasma al núcleo (y viceversa) y con ello modifica la respuesta de las células para la formación de núcleos hipotalámicos, que podrían estar regulando la actividad neuroendocrina en la etapa de activación (Wrobel *et al.*, 2016).

Propionato de testosterona.

Con la administración de PT en las hembras adultas, se observó en la citología vaginal una tendencia al aumento de las células superficiales y los leucocitos, lo que corresponde a estro y metaestro, esto es debido a que el PT se hidroliza a T y este se metaboliza en DTH o se aromatiza a E, los cuales ejercen un efecto proliferativo en el epitelio de la vagina (Vela *et al.*, 2009). Sin embargo Marcondes *et al.*, (2015) menciona que con el tratamiento de PT causa anovulación y quistes lúteos.

A nivel hipotalámico los efectos de la testosterona en la etapa neonatal dependen de su conversión a estradiol por la enzima aromatasa (Gorski, 1993), el cual es el encargado de su masculinización, y gracias a esto los machos presentan su comportamiento típico, como lo son la agresividad y el comportamiento sexual como la monta, la intromisión y la eyaculación (Herrera *et al.*, 2005). Con la administración de PT a una edad temprana se producen cambios en las estructuras del cerebro, debido a que este es altamente dimorfo, se ha observado que en las crías hembras se presentan características masculinas, como lo son el incremento de la distancia ano-genital y cuando estas llegan a la edad adulta no presentan apertura del orificio

vaginal y en cambio se observa un comportamiento de monta muy similar al del macho (Bayless *et al.*, 2013; Palacios *et al.*, 2012).

En este trabajo se encontró un aumento de la expresión del RNAm de los RE α y β y en las hembras el RE β aumentó su expresión a las 6 horas, disminuyendo a las 48 horas. El RE α disminuyó a las 6 horas, incrementándose a las 48 horas.

Brock *et al.*, (2015), observó que la expresión del RE α al día 19 del desarrollo embrionario, no indujo cambios en su expresión en distintas áreas del hipotálamo entre machos y hembras wild-type, sin embargo con animales ArKO a la misma edad se observó que en el núcleo AVPV obtuvo mayor expresión RE α - inmunoreactivos que en animales wild-type. Sin embargo se observó en las hembras en los días 5 y 25 posnatales que la expresión de los RE α aumentó comparado con los machos.

Además hay que tener en cuenta, que de manera fisiológica, la expresión de los REs durante la etapa embrionaria en las hembras puede ser dudosa, debido a que no tiene función ovárica hasta el día 7 de vida y que el efecto de las feto α proteínas impide que los estrógenos ingresen al cerebro del embrión hembra (Brock *et al.*, 2015) .

A diferencia de la hembra, en el macho la actividad de la enzima aromatasa da como resultado el aumento de los niveles de los estrógenos locales y se masculinice el cerebro (Brock *et al.*, 2015), por esta razón la administración de PT establece el aumento en la actividad de la enzima aromatasa así como el incremento de los niveles de estrógenos en el cerebro de las hembras causando cambios estructurales en los distintos núcleos del hipotálamo y observar alteraciones en el comportamiento de las hembras (Bayless *et al.*, 2013) lo que puede explicar el incremento de RNAm de los RE α y β .

CONCLUSIÓN.

La administración de quitosán a hembras en etapa reproductiva, alteró la epitelización celular de la vagina presentando proestro continuo.

La administración de quitosán más tamoxifen el epitelio celular de la vagina de las ratas se mantuvo en proestro.

Las hembras del grupo de quitosán más coumestrol presentaron citologías vaginales con presencia de células anucleadas, lo cual las mantuvo en estro.

Las crías de 6 horas de nacidos en el grupo de quitosán, la expresión relativa de los receptores para estrógenos α se incrementó y para el β incrementó considerablemente en los machos, sin embargo en las hembras los REs α disminuyeron y los REs β aumentaron respecto a los animales intactos.

En las crías de 6 horas de nacidos en el grupo de quitosán más propionato de testsoterona la expresión relativa que se obtuvo de los receptores para estrógenos α no tuvo cambios sin embargo los REs β aumentó considerablemente en los machos y en las hembras los REs α disminuyó y los REs β aumentaron esto respecto a los animales intactos.

La expresión relativa de los REs α de los machos de 6 horas de nacidos en el grupo de quitosán más tamoxifen no cambio respecto a los animales intacos, sin embargo para los REs β incrementaron la expresión relativa con respecto a los animales intactos.

Las crías de 6 horas de nacidos en el grupo de quitosán más coumestrol la expresión relativa que se obtuvo de los receptores para estrógenos α incremento 0.36 sin embargo la expresión de los REs β aumentaron su expresión 20 veces más y en las hembras ambos REs α y β disminuyeron respecto a los animales intactos.

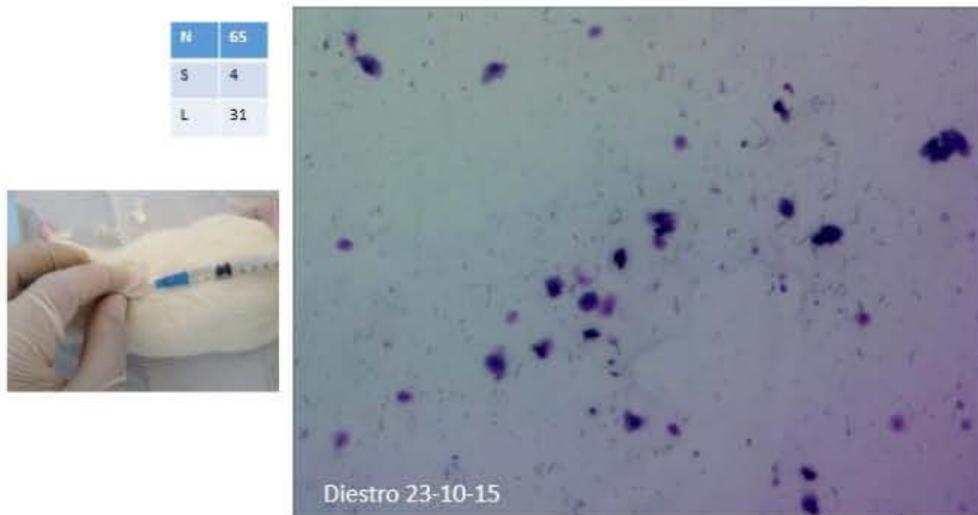
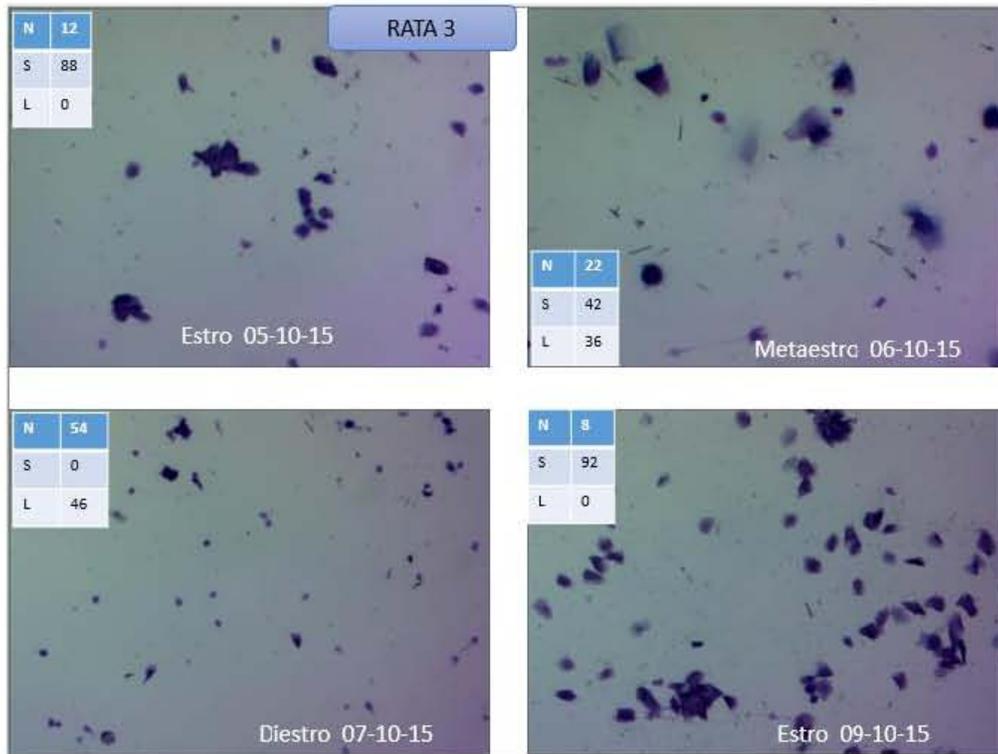
La expresión relativa de los REs α de los machos de 48 horas de nacidos en el grupo de quitosán disminuyó aunque no fue representativa respecto a los animales intacos, aunque no así para los REs β los cuales se incrementó la expresión relativa esto respecto a los animales

intactos. Para las hembras la expresión relativa de los REs α disminuyó y los REs β aumentaron esto respecto a los animales intactos.

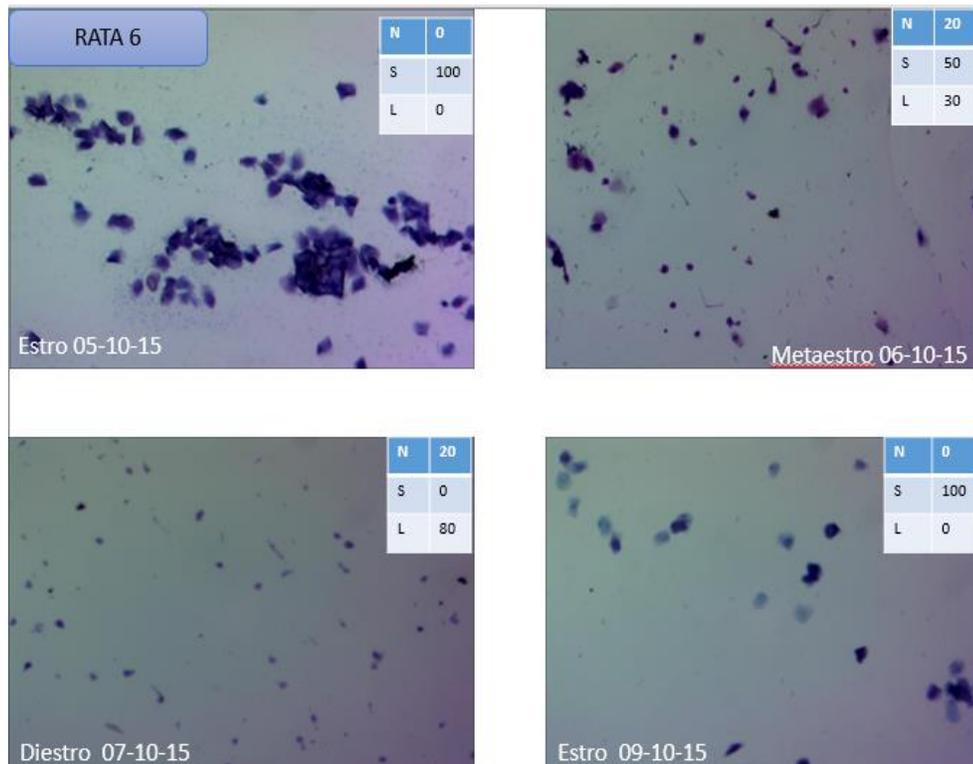
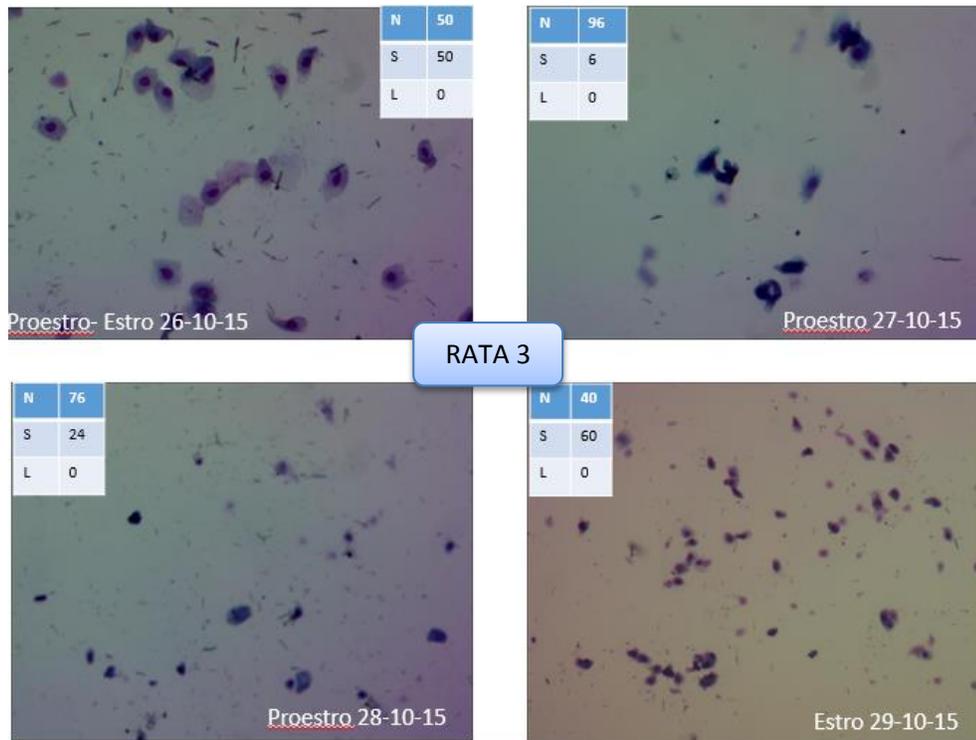
Las crías de 48 horas de nacidos en el grupo de quitosán más propionato de testosterona la expresión relativa de los REs α incrementó y para los REs β disminuyó en los machos y en las hembras los REs α disminuyeron, aumentando los REs β esto respecto a los animales intactos.

Las crías de 48 horas de nacidos en el grupo de quitosán más coumestrol la expresión relativa que se obtuvo de los receptores para estrógenos α incrementó 0.36 sin embargo la expresión de los REs β disminuyó y en las hembras ambos REs α y β disminuyeron respecto a los animales intactos.

ANEXOS.



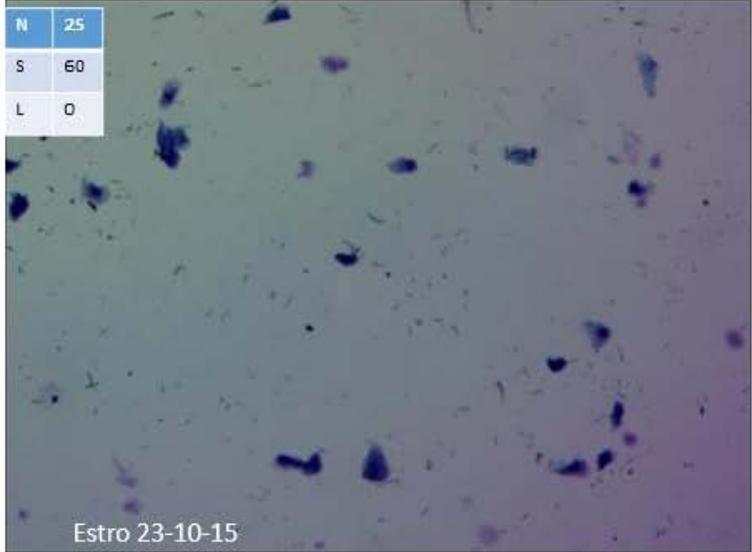
Aplicación del termogel quitosán sin tratamiento



RATA 6

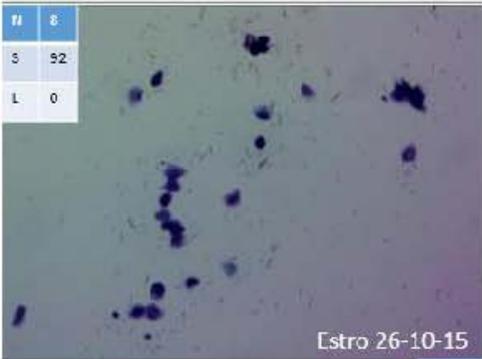
IMPLANTE DE QUITOSAN +
COUMESTROL

N	25
S	60
L	0



Estro 23-10-15

N	8
S	92
L	0



Estro 26-10-15

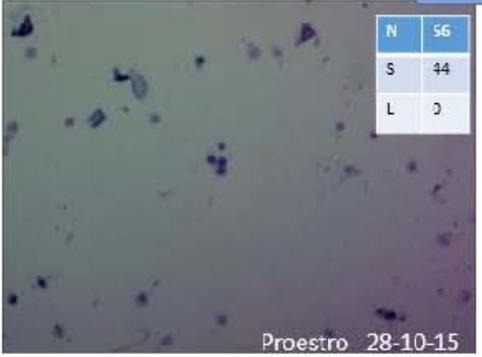
N	13
S	33
L	34



Metaestro 27-10-15

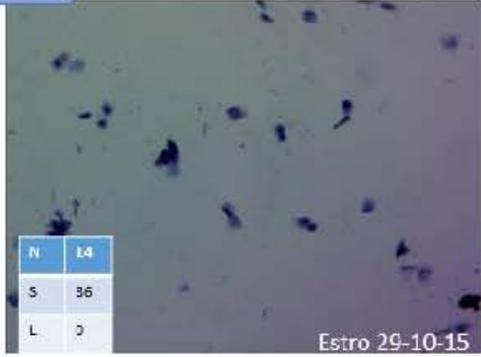
RAIA 6

N	56
S	44
L	0

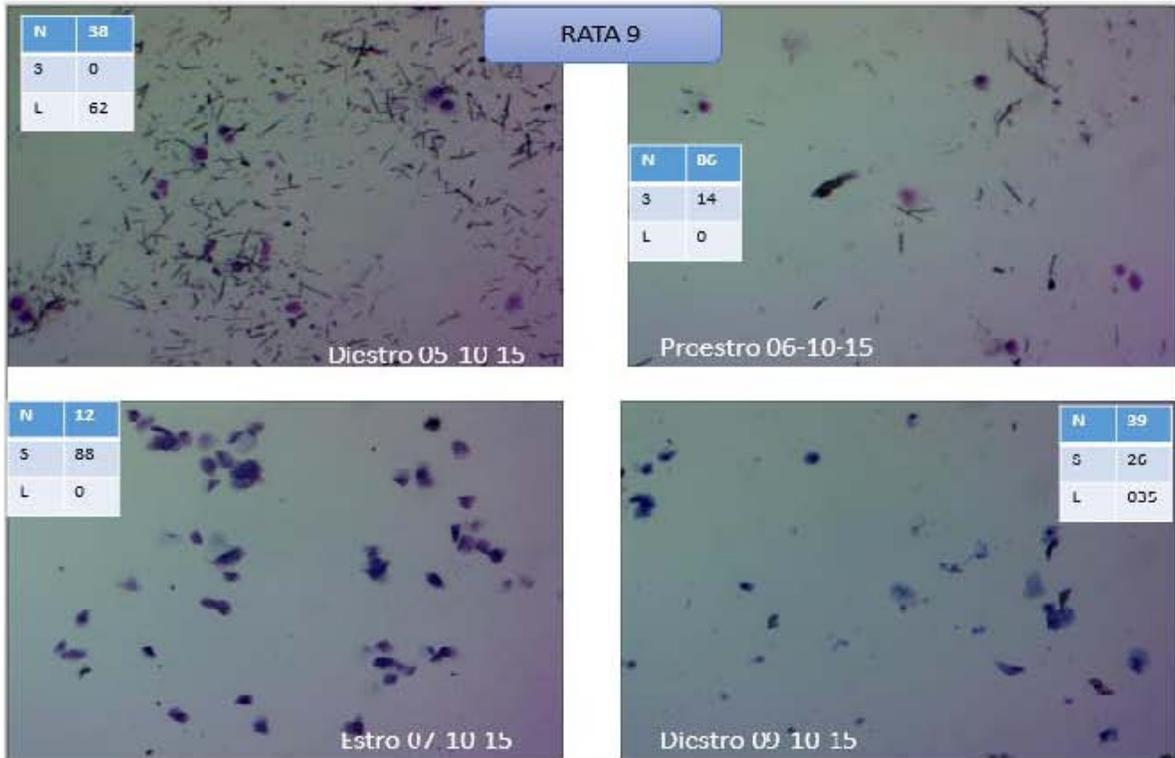


Proestro 28-10-15

N	14
S	36
L	0

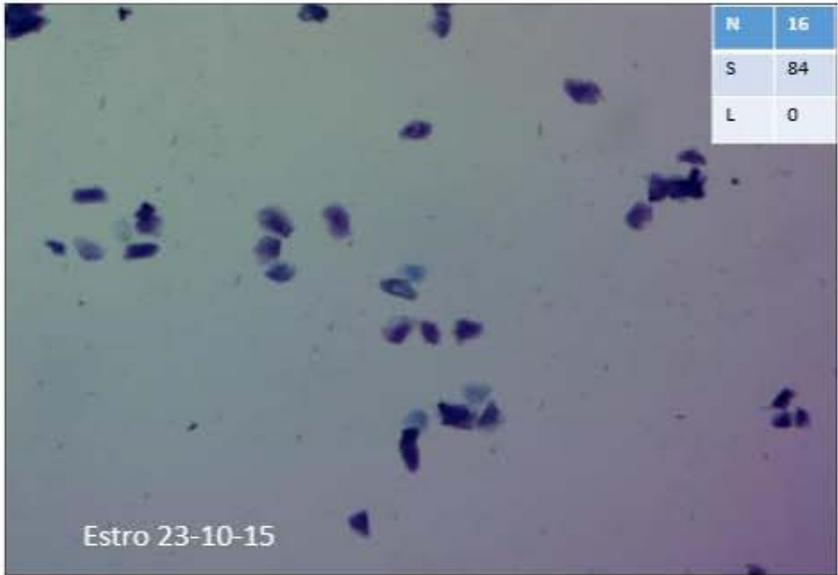


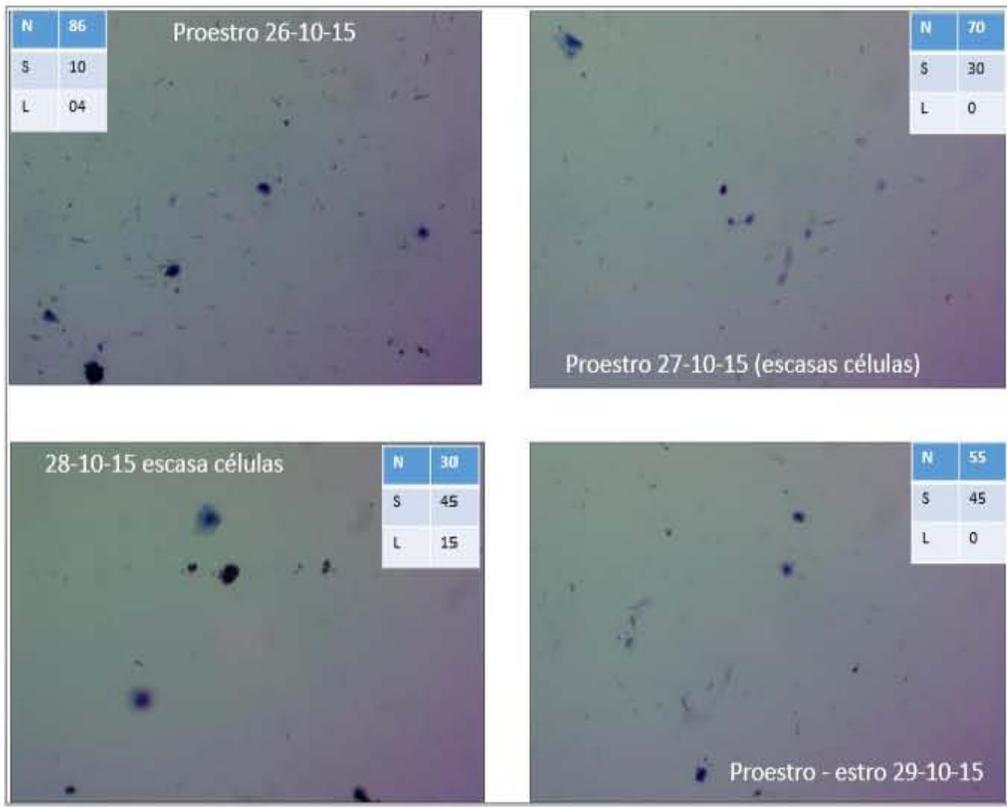
Estro 29-10-15



RATA 9

IMPLANTE DE QUITOSAN + TAMOXIFEN

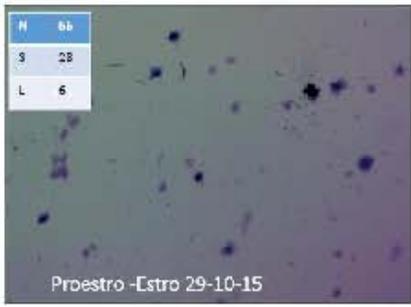
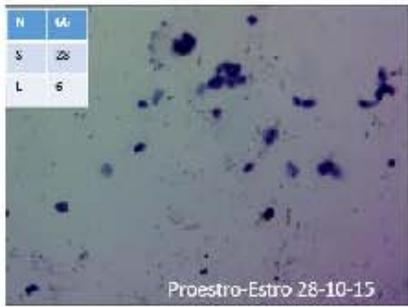
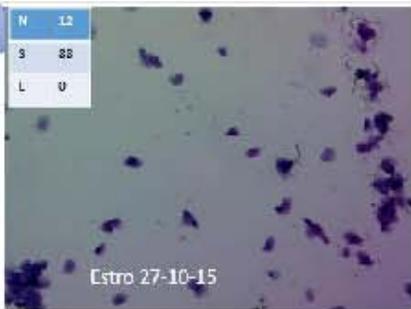
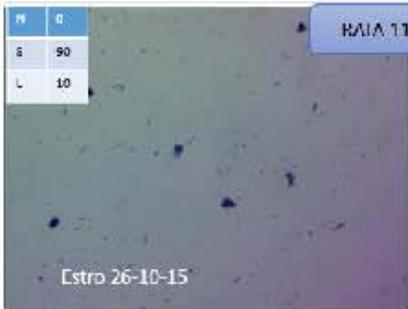
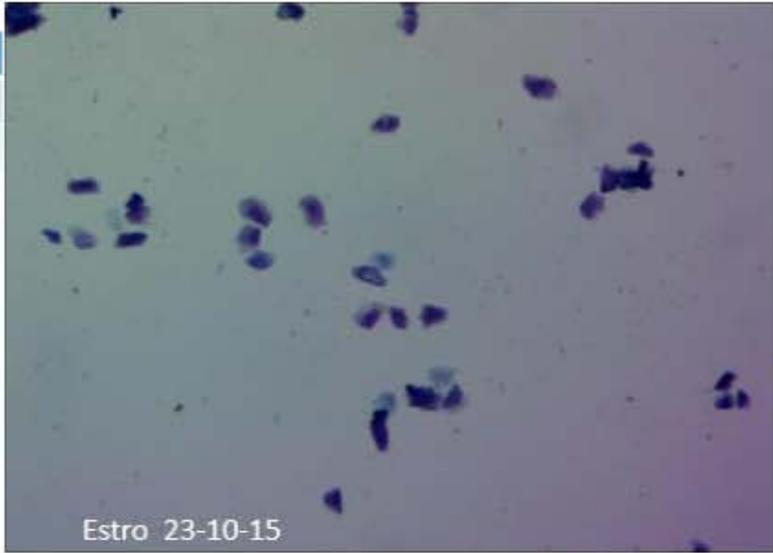


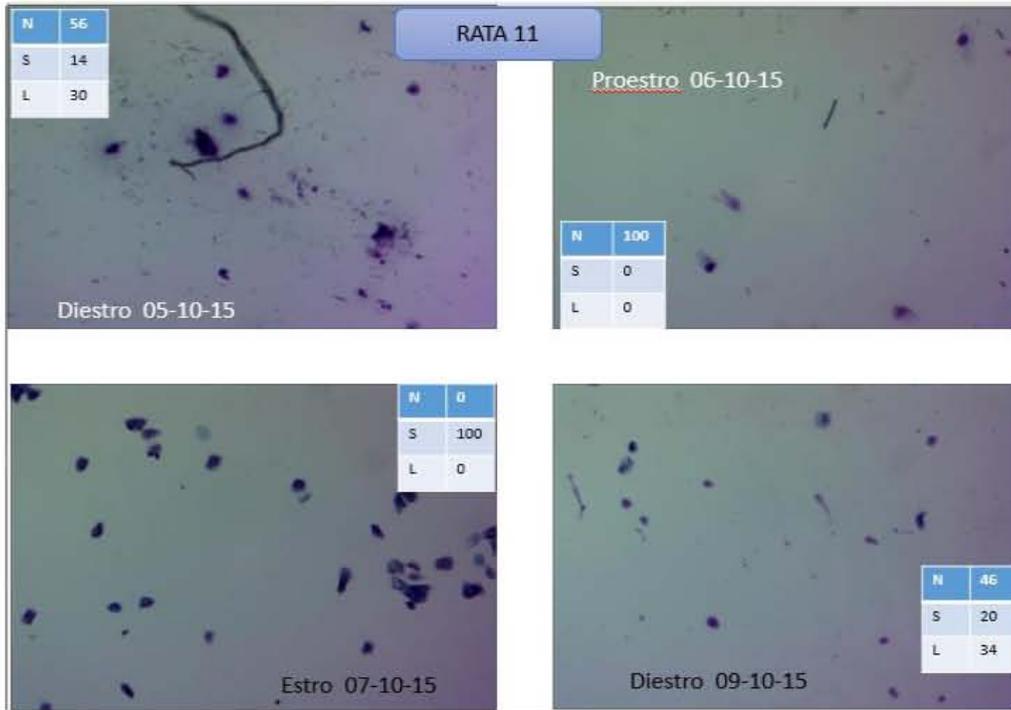


RATA 11

IMPLANTE DE QUITOSAN +
PROPIONATO DE
TESTOSTERONA

N	40
S	60
L	0





BIBLIOGRAFÍA

- Atanassova, N., C. McKinnell, K. Turner, M. Walker, S. Fisher, M. Morley, 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141:3898-3907.
- Barrón-González A., Arias-Martínez J., Castro-Romero Ivone. 2001., *Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas.*, salud pública de México, 43: 577-584.
- Bayless D. W., Darling J. S., Jill M. D., 2013. Mechanisms by which neonatal testosterone exposure mediates sex differences in impulsivity in prepubertal rats., *Hormones and Behavior.*, 64: 764–769.
- Bermejo- Aycart J.I Iniesta-Pérez S., Rendon- Martin T. San Frutos Llorente L., 2006., *Efectos del tamoxifeno en el epitelio vaginal y los ovarios / Tamoxifen effects on vaginal epithelium and ovaries.*, Pro obstet., 48: 66-71.
- Branham, W.S., S.L. Dial, C.L. Moland, B.S. Hass, R.M. Blair, H. Fang, et al. 2000. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *J. Nutr.* 132:658-664.
- Brock O., De Mees C. and Bakker J. 2015. Hypothalamic Expression of Oestrogen Receptor a and Androgen Receptor is Sex-, Age- and Region-Dependent in Mice., *Journal of Neuroendocrinology.*, 27: 264–276., doi: 10.1111/jne.12258.
- Bottino M. C., Lanari C., 2010 Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos., *Medicina.*, 70: 173-184.
- Burroughs, CD. (1995). Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally with coumestrol. *Exp. Biol. Med.* 208:78-81.
- Camerino Giovanna, Parma Pietro, Radi Orietta and Valentini Stella., 2006., *Sex determination and sex reversal.*, *Current Opinion in Genetics & Development.*, 16:289–29.
- Cao, J., and Patisaul, H. B. 2011. Sexually dimorphic expression of hypothalamic oestrogen receptors a and b and Kiss1 in neonatal male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 519: 2954–2977. doi:10.1002/CNE.226.
- Cruz-Reyes, A. 2009 Capitulo en libro: Fauna feral nociva y zoonosis. In: Lot, A. y Cano-Santan Z. manejo. Universidad Nacional Autónoma de México pp 453-461.
- Despaigne N. D. 2001. Moduladores selectivos del receptor estrogénico. Su utilidad en la mujer menopáusica., *Rev Cubana Endocrinol.*, 12: 124-127.

- Díaz Hernández, Verónica y Merchant Larios Horacio., 2008., Bases moleculares de la determinación sexual en mamíferos., *Ciencia Ergo.*, 15: 287-296.
- Dohler K. D. 1991 The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitter on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *International Review of Cytology.*, 131: 1.57
- Dohler , K. D., Hines M, coquelin A, Davis, F, Shryne J. E. and 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.
- Galina Carlos y Valencia Javier., 2006., Reproducción de los animales domésticos ., Limusa., 2a. ed., 11-25.
- Galey, D., E. Mendez, E. Whitehead, M. Holstege, H. Plimlee, and B. Johnson. 1993. Estrogenic activity in forages: diagnostic use of the classical mouse uterine bioassay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:603-608.
- Goldman J.M., Murr A.S., Cooper R.L. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 80:84-97.
- Gorski, R.A., 1993. Estradiol acts via the estrogen receptor in the sexual differentiation of the rat brain, but what does this complex do? *Endocrinology.*, 133: 431–432.
- Herrera G. H., Vergara O. M., Rosado-García A., Rosales T. A., 2005. Diferenciación sexual en el sistema nervioso central., *Veterinaria México*, 36: 339-360.
- Irrazábal M.E., 2011. Antagonism of tamoxifen and antidepressants among women with breast cancer., *Rev Med Chile.*, 139: 89-99.
- Jacob, A.D., Temple, L.J., Patisaul B.H., Young J.L., Rissman F.E., 2001. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α ., *Biología Médica.*, 226: 301-306.
- Jiali Zhanga, Wei Zhanga, Bangoura, Mamadoubaa., Wenshui Xia., 2012. A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats., *International Journal of Biological Macromolecules.* 51: 504–508.
- Juárez J., Corsi-Cabrera M., Del Rio-Portilla I. 1995. Effects of prenatal testosterone treatment on sex differences in the EEG activity of the rat., *Brain Research.* 694: 21-28.
- Krebs-Kraft Desiree L. and McCarthy Margaret M., 2011., Sexual Differentiation of the Mammalian Brain., *Hormones and Reproduction of Vertebrates.*, 5:1-24.

- Lam P. C. y Rothchild. 1977., The influence of luteinizing hormone (LH) prolactin and the uterus on the development of a dependency o LH in the control of the progesterone secretion in the pseudopregnant rat., *Endocrinology.*, 101: 1503-1516.
- Lecomte S., Lelong M., Bourguine G., Efstathiou T., Saligaut C., Pakdel F. 2017. Assessment of the potential activity of major dietary compounds as selective estrogen receptor modulators in two distinct cell models for proliferation and differentiation., *Toxicology and Applied Pharmacology.*, doi: 10.1016/j.taap.2017.04.005.
- Lenis Sanin Y.Y., Gutiérrez Gómez M. T., Tarazona Morales A. M., 2010., Phytoestrogen effects on animals reproduction., *Rev. Nal.Agr.*, 63:5555-5565.
- Lephart Edwin D., 1996., A review of brain aromatase cytochrome P450., *Brain Research Reviews* 22:1-26.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. and Tanno, A. P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, 62: 609-614.
- Marcondes Rodrigo R., Carvalho Kátia C., Duarte Daniele C., Garcia Natália , Amaral Vinícius C., Simões Manuel J., Lo Turco Edson G., Soares Jr José M., Baracat Edmund C., Maciel Gustavo A. R., 2015. Differences in neonatal exposure to estradiol or testosterone on ovarian function and hormonal levels., *General and Comparative Endocrinology* 212: 28–33.
- McGarvey, C., Cates, P.N. Brooks, A. Swanson, I.R. Milligan, W. Coen., 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 142:1202-1208.
- Miranda S, Lizárraga E. Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application. In: *The Complex World of Polysaccharides.* (Karunaratne D. N. ed.), InTech Publisher, Croatia. 2012,1-44. DOI: org/10.5772/51200.
- Montellia, S. Peruffoa A., Zambenedettib P., Rossipalc E., Giacomellod M., Zattae P., Cozzia B., 2012., Expression of aromatase P450AROM in the human fetal and early postnatal cerebral cortex., *brain research* 1475:11–18.
- Mostrom M. and Evans T. J., 2012. Phytoestrogens., *Veterinary Toxicology*, Edited by Ramesh C. Gupta., 1012-1028.
- Motrich D. Ruben, Ponce Andres and Rivero E. Virginia., 2007. Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat., *Fertility and Sterility* 88: 452-461.
- Muthusamy Thangaraju, Kalyanam Kumar, Rengasamy Gandhirajan and Panchanatham Sachdanandam., 1994., Effect of Tamoxifen on Plasma Lipids and Lipoproteins in Postmenopausal Women with Breast Cancer., *Cancer* 73: 659-663.

- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- OIE. 1992. Organización de los Servicios de salud pública veterinaria en América Latina y el Caribe., *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 11: 117-146.
- Ososoki L. A. y Kennelly J. E., 2003., Phytoestrogen: a Review of the present state of Research., *Phytother. Res.* 17:845–869.
- Owen G. Zelent A. 2000. Originis and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 809-827.
- Paccola C.C., Resende C.G., Stumpp T., Miraglia S.M., Cipriano I. 2013. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim. Reprod.* 10: 677-683.
- Palacios O., Zaitseva G., Juárez J., 2012. Efecto de la exposición prenatal a testosterona sobre el peso del bazo y la concentración de esplenocitos en ratas hembras y machos., *Scientia-CUCBA.*, 14: 13-19.
- Patisaul H. B., Whitten P. L., Young L. J. 1999. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17 β -estradiol and the phytoestrogen, coumestrol., *Molecular Brain Research* 67: 165–171.
- Parandin R., Behnam-Rassouli M. and Mahdavi-Shahri N. 2017. Oestrogenic action of neonatal tamoxifen on the hypothalamus and reproductive system in female mice., *Reproduction, Fertility and Development.*, 29: 1012–1020.
- Pérez-Rivero J.J.; Aguilar-Setien, A.; Villa, G.A. y Serrano, H. 2005. Detección de receptores estrogénicos beta (ERB) en testículo de *Desmodus rotundus* mediante el uso de coumestrol. *Veterinaria México.* 36: 469-474.
- Pérez-Rivero J., Aguilar-Setián A., Martínez-Maya., Pérez-Martínez., Serrano H., 2007., Los Fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de los animales domésticos., *Agricultura Técnica (Chile).*, 67 (3) 325-331.
- Pérez-Rivero j, Aguilar-Setián A., Martínez-Maya J., Pérez-Martínez M. and Serrano H., 2007., A review phytoestrogens consumption and their effects in different organs and systems of domestic animals., *Agricultura Técnica (CHILE)* 67:325-331.
- Pérez-Rivero J.J.; Martínez, M.J.J.; Pérez, M.M.; Aguilar-Setien, A. y Serrano, H. 2009. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral. *Veterinaria México.*, 40:9-16.
- Perez-Rivero J.J., Perez Martínez M., Aguilar Setián A., 2013., Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicle treated with coumestrol by oral route., *Journal of applied Animal Research* 42: 208-2012.

- Pérez-Rivero J.J. Agular-Setien A. Villa-Godoy A. Serrano H., 2005., Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroideas: Receptor estrogénico., *Vet. Mex.* 36: 437-452.
- Pfaffl W. M., 2004. Quantification strategies in real-time PCR., *S.A. Bustin.*, 3: 87-112.
- Quaresma E.R., Capella M.C., Capell E.J., de Araujo E.J. 1999. Comparación entre los parámetros seminales de las ratas y la fertilidad. *Rev. de Cir. Infantil* 9: 25-29.
- Rather MA, Sharma R, Gupta S, Ferosekhan S, Ramya VL., 2013. Chitosan-Nanoconjugated Hormone Nanoparticles for Sustained Surge of Gonadotropins and Enhanced Reproductive Output in Female Fish. *PLoS ONE* 8: e57094. doi:10.1371/journal.pone.0057094.
- Rouzaud, F.; Martin, J.; Gallet, P. F., 200., A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (MC1R). *Gen. Sel. Evol.*, 32: 511-520.
- Sánchez B.A., Sibaja B M., Vega-Baudrit J., Madrigal C. S. 2007., Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomedicas., *Rev. Iberam. Polim.*, 8; 241-267.
- Sánchez-Criado J., Garrido-Gracia C., Bellido C., Aguilar R., Guelmes P., Abreu P., Alonso R., Barranco I., Millán Y. and Martín de las Mulas J. 2006., Oestradiol-17 β inhibits tamoxifen-induced LHRH self-priming blocking hormone-dependent and ligand independent activation of the gonadotrope progesterone receptor in the rat., *Journal of Endocrinology.*, 190:73–84.
- Salame M. A., Méndez de la Cruz F., Aguirre L. G. y Serrano H., 2008., Disrupción endocrina de la diferenciación sexual., *ContactoS* 70:43–49.
- Serrano H.; Gómez, O.J.L; Mendieta, E.; Salama, A.; García, S.M.D. 2010. Estrategias de control de la población canina. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ.*, 8: 21-31.
- Serrano G., Pérez, R.J.J., Martínez, M.J.J., Aguilar, S.A., Pérez, M.M. y García, S.M., 2008., Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuroendocrinology.*, 29: 977-980.
- Singla A. K. and Chawla M., 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects an update. *Pharmacy and Pharmacology.* 53: 1047–1067.
- Sezgin M Ismail., 1999., Gynaecological effects of tamoxifen., *Clinical Pathology.*, 52:83-88.

- Takagi H., Shibutani M.T, Lee K., Masutomi N., Fujita H., Inoue K., Mitsumori K., Hirose M., 2005. Impact of maternal dietary exposure to endocrine-acting chemicals on progesterone receptor expression in microdissected hypothalamic medial preoptic areas of rat offspring., *Toxicology and Applied Pharmacology* 208: 127 – 136.
- Terán J. D., Alejandro D., Garrán T., 2005. Nuevos aspectos bioquímicos y moleculares de la acción de los estrógenos., *Ginecol Obstet Mex.*, 73: 436-42.
- Thornton J. De Salle R., 2000. A new method to localize and test the significance of incongruence: detection domain shuffling in nuclear receptor superfamily. *Systematic Biology*. 49: 183-201.
- Treeck, O., Lattrich, C., Springwald, A., and Ortmann, O. 2010. Oestrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 120: 557–565. doi:10.1007/S10549-009-0413-2.
- USDHEW, U,S Department of Health, Education and Welfare. 1969. Pictorial Keys to arthropods, reptiles, birds and mammals of public health significance. Public Health Service Publication No. 1955. Washington.
- Vancutsem P.M. y Roessler M. R., 1997. Neonatal treatment with tamoxifen causes immediate alterations of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and medial preoptic area in male rats., *Teratology* 56: 220-8
- 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.
- Vela Navarrete R., Garcia Cardoso J. V., Pardo Montero M., Jiménez P., Máteos-Cáceres y López Farré A., 2009. Testosterona, función endotelial, salud cardiovascular y Andrógeno deficiencia del varón añoso., *Arch. Esp. Urol.*, 62: 173-178
- Vergara Onofre Marcel., 2004., *Biología molecular de la diferenciación sexual hipotalámica de la rata. Estudio de patrón de la unam poli a y expresión de genes homeobox y ret.*, Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas., Universidad Autónoma Metropolitana.
- Vivek R., Nipun Babu V, Thangama R., Subramanian K.S., Kannan S., 2013. pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 111 117–123.
- Weber A. L., Santos Lima E.A., Bordin A.LB., D'Acampora A.J., Ortiz V., Souza J.A., PereimaM.L., Golderg.
- Weihua, Z., S. Andersson, G. Cheng, E.R. Simpson, M. Warner, and J.Gustafsson. 2003. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett.* 546:17-24.

- Whitten P.L., Lewis, C. Russell, Naftolin E. F., 1995. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208: 82–86.
- Whitten, P.L., H.B. Patisaul and Young LJ. 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol. Teratol.* 24:47- 54.
- Wrobel K, Chen YZ, Kulkoyluoglu E, Chen KL, Hieronymi K, Holloway J, Li S, Ray T. Partha RS, Landesman Y, Lipka AE, Smith RL and Erdogan ZM. 2016. ER α -XPO1 Cross Talk Controls Tamoxifen Sensitivity in Tumors by Altering ERK5 Cellular Localization., *Mol Endocrinol.*,30: 1029–1045.
- Ze-hua L., Yoshinori K., Satoshi Mi., 2010. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment., *water research.* 44: 567 – 577.