T
1186

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124220

124220

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Casa abierta al tiempo

"EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE COUMESTROL EN LOS NIVELES DE GONADOTROPINAS Y LA FUNCIÓN TESTICULAR"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTA

MARÍA DEL ROSARIO TARRAGÓ CASTELLANOS

Tutor: Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Asesores: Dra. Leticia Bucio Ortiz
Dr. José Cortés Zorrilla

JULIO DE 2007

UAM XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

"El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al padrón de Postgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93"

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
Aprobó la tesis que presentó

María del Rosario Tarragó Castellanos

El día 23 de Julio de 2007

Sinodales:

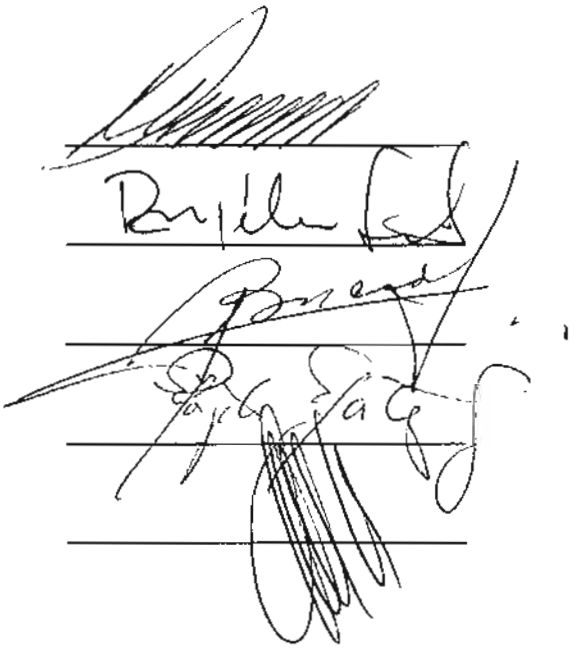
Dr. Javier Velázquez Moctezuma (Presidente)

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio (Secretaria)

Dra. Leticia Bucio Ortiz (Vocal)

Dra. Margarita Martínez Gómez (Vocal)

Dr. José Cortes Zorrilla (Vocal)



AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Dr. Javier Velázquez Moctezuma por todo el apoyo que me brindo en este largo camino, por sus enseñanzas que me orientaron en el trabajo y me ayudaron a culminar esta etapa, por el optimismo que siempre me transmitió.

A los Doctores Mario García Lorenzana y Vicente Díaz Sánchez, por su apoyo, enseñanzas y comentarios.

A la Dra. Leticia Bucio Ortiz y al Dr. José Cortés Zorrilla, por sus criticas y comentarios siempre positivos que ayudaron desde el inicio a enriquecer el trabajo.

A las Doctoras Rosa Angélica Lucio Lucio y Margarita Martínez Gómez, por el tiempo que le dedicaron a revisar la tesis, y por sus comentarios y sugerencias que me ayudaron a enriquecer el trabajo.

A la Dra. Reyna Fierro por su apoyo y comentarios positivos.

A todas las personas que en algún momento de este largo camino me brindaron su apoyo y ayuda.

DEDICATORIAS

A Mario, por acompañarme en este largo camino, a veces fácil y a veces difícil. Por sus enseñanzas, apoyo y cariño.

A mis dos Angeles, May y Charin, por su paciencia, sus sonrisas y enojos, por su cariño, alegría, entusiasmo por ser una luz en mi camino.

A mis padres, Jorge y Carmen, por darme la vida, pues con ella me dieron la oportunidad de existir, ser y amar.

A Jorge, Jordi y Jofre, por su apoyo y cariño.

A Carlina y Alejandro por su cariño.

A mis sobrinos y cuñados por su apoyo.

A Leoncio y Teo por su apoyo.

A mis compañeros de neurociencias, Javier, Anabel, Adriana, Armando y Mario por el apoyo que me han dado, sus comentarios, su amistad y todos los momentos que hemos compartido.

A Vero y Yuri por su ayuda, apoyo y cariño. Por todos los momentos que hemos compartido en el laboratorio.

A todos los que forman parte del área de neurociencias, por su apoyo y todos los momentos que hemos compartido.

A Angélica, Angélica, Edelmira, Andrea y Alejandra por brindarme su apoyo, ayuda y amistad.

Al Doctor Tomás Morato por sus comentarios, apoyo y cariño que siempre me ha brindado.

A todas las personas que en algún momento de este largo camino me brindaron su apoyo, una sonrisa, una palabra de cariño.

A todos los que creyeron en mí y a los que no también.

ÍNDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. ANTECEDENTES	12
1.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS Y SU PAPEL EN LAS PLANTAS	
1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FITOETRÓGENOS	18
1.3 FITOESTRÓGENOS EN HUMANOS	25
1.4 FITOESTRÓGENOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS	29
1.5 FITOESTRÓGENOS EN ROEDORES	32
1.5.1 Etapa Prenatal	33
1.5.2 Etapa Neonatal	34
1.5.3 Etapa Poslactancia	36
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVO	42
4.1 Objetivo General	42
4.2 Objetivos Particulares	42
5. METODOLOGÍA	43
5.1 TRATAMIENTO	43
5.1.1 Animales	43
5.1.2 Dosis	43
5.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	44
5.3 ANÁLISIS HORMONAL	44
5.3.1 Radioinmunoanálisis de Gonadotropinas	44
5.3.1.1 Hormona Leutinizante (LH)	44
5.3.1.2 Hormona folículo estimulante (FSH)	45
5.3.2 Radioinmunoanálisis de Testosterona	45
5.4 ÍNDICE SOMÁTICO	45

5.5 LONGITUD DE GLÁNDULAS COAGULANTES 46
5.6 MEDICIÓN DE LOS DIÁMETROS Y
VOLUMEN TESTICULAR 46
5.6.1 Medición de diámetros testiculares 46
5.6.2 Volumen testicular 47
5.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y
MORFOMÉTRICO DE TESTICULO 47
5.7.1 Análisis histológico cualitativo 47
5.7.2 Análisis morfométrico de testículo 48
5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 49
6. RESULTADOS 50
6.1 ANÁLISIS HORMONAL 50
6.1.1 Radioinmunoanálisis de Gonadotropinas 50
6.1.2 Radioinmunoanálsis de Testosterona 50
6.2 ÍNDICES SOMÁTICOS 52
6.2.1 Índice testicular somático 52
6.2.2 Índice prostato somático 52
6.2.3 Índice vesicular somático 52
6.2.4 Índice coagulante somático 52
6.3 LONGITUD DE GLÁNDULAS COAGULANTES 54
6.4 MEDICIÓN DE DIÁMETROS Y VOLUMEN TESTICULAR 55
6.4.1 Diámetros o ejes testiculares 55
6.4.2 Volumen testicular 55
6. 5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y
MORFOMÉTRICO DE TESTICULO 57
6.5 1 Análisis histológico cualitativo 57
6.5.2 Análisis morfométrico 59
6.5.2.1 *Área tubular* 60
6.5.2.2.Conteo de tipos celulares 61
6.5.2.3 *Número total de células* 63

6.5.2.4 *Densidad celular* 63

6.5.2.5 Túbulos que contienen todos los tipos celulares 65

7. DISCUSIÓN 66

8. LITERATURA CITADA 78

ANEXO I 102

ARTICULO 105

RESUMEN

Los fitoestrógenos son compuestos químicos no esteroides, de origen vegetal. Su nombre se refiere a la capacidad que tienen de inducir respuestas estrogénicas al unirse a los receptores beta (β) de estrógenos. Entre los fitoestrógenos está el coumestrol que se encuentra en altas concentraciones en alfalfas, esto lo convierte en uno de los principales disruptores endocrinos en el ganado. En bovinos como en ovinos, se describen alteraciones reproductivas relacionadas con la alta ingesta de coumestrol, los cuales han sido analizados principalmente en hembras. Dado la poca información que hay del efecto de los fitoestrógenos en machos se decidió realizar el presente trabajo en machos utilizando como modelo la rata. Se analizó el efecto del coumestrol sobre hipófisis, testículo y glándulas sexuales en ratas Wistar. Posterior a la administración aguda de dosis crecientes de coumestrol, se determinaron los niveles plasmáticos de gonadotropinas (LH / FSH) y testosterona. Por otro lado, se analizó el efecto del coumestrol en el índice somático de las glándulas sexuales accesorias y testículo, así como el efecto en la espermatogénesis. No se observaron cambios en los niveles plasmáticos de gonadotropinas, sin embargo, los niveles de testosterona mostraron un decremento después de todos los tratamientos, siendo significativo en las dosis de 12.5, 25 y 200 µg de coumestrol, esto podría significar que el coumestrol puede inducir respuesta a nivel testicular en dosis bajas como altas. Con relación a los índices somáticos, se observó que el tratamiento con coumestrol no modificó el índice prostato-somático, pero si incrementó el índice vesicular-somático e indujo un decremento en el índice coagulante-somático, sugiriendo que induce un efecto estrogénico en estas glándulas. A nivel testicular el coumestrol tuvo un efecto inhibitorio en la espermatogénesis específicamente en las fases VII y VIII del espitelio seminífero. Esto produjo un decremento en el contenido celular de los túbulos seminíferos, presentando un "arresto" de la espermatógenesis. Estos resultados sugieren que la administración aguda de coumestrol tiene efecto principalmente en estructuras periféricas reproductivas, probablemente a través de su unión a receptores β de estrógenos.

ABSTRACT

Phytoestrogens are non-steroid chemical compounds derived from plants. Its name refers to their capacity to induce estrogenic responses when bonded to estrogen-beta (β) receptors. Among phytoestrogens there is the coumestrol. Alfalfa often contains coumestrol in great amounts and this makes it one of the principal endocrine disruptors in cattle. In bovines and ovines reproductive alterations have been described related to a high ingestion of coumestrol, which have been mainly studied on females. Due to a lack of information regarding males it was decided to do this investigation on males using the rat as a model, it was analyze the effect of coumestrol on pituitary, testicle and sexual glands on Wistar rats. After increasing acute doses of coumestrol administrated to rats, plasmatic gonadotrophins (LH – FSH) and testosterone levels were determined. Besides, the effect of coumestrol on the somatic index of the accesory sexual glands and testicles was analyzed as well as the effect on spermatogenesis. No changes were observed on the plasmatic levels of gonadotrophines, although, testosterone levels decreased after all treatments, being remarkable on the 12.5, 25 and 200 µg of coumestrol doses. This could mean that coumestrol could induce a testicular-level response with low as well as with high doses. Regarding somatic indexes, it was observed that treatment with coumestrol did not modify the prostatic-somatic index, but the vesicular-somatic index increased and the coagulating-somatic index decreased, suggesting that it induces an estrogenic effect on these glands. At testicular level coumestrol showed an inhibiting effect at the spermatogenesis, particularly at phases VII and VIII of the epithelium's cycle. This caused a decrease on cell's seminal tubules content, showing an "arrest" of the spermatogenesis. These results suggest that acute administration of coumestrol has effect mainly on perifeic reproductive structures, maybe through its bond to estrogen-beta (β) receptors.

1. ANTECEDENTES

En la actualidad es frecuente escuchar de problemas reproductivos por baja fertilidad en el humano. Este problema se extiende también a especies silvestres y a especies de importancia económica. Se considera que la reproducción es afectada en todas las especies por la presencia de compuestos químicos que actúan como disruptores endocrinos, es decir, que tienen actividad estrogénica o antiestrogénica.

Gutendorf y Westendorf (2001) han propuesto que algunos disruptores endocrinos encontrados en el agua y en sedimentos, pueden ser hormonas naturales o sintéticas, fitoestrógenos o pueden formar parte de una gran variedad de compuestos quimicos como detergentes y pesticidas. Todos estos compuestos pueden tener efecto tanto en la reproducción, así como en la inducción de cáncer hormono-dependiente. Esto es debido al efecto dual (estrógeno-antiestrógeno) que pueden presentar, tanto en animales de vida silvestre como en humanos.

Los primeros estudios sobre fitoestrógenos se realizaron alrededor de 1940, en Australia, cuando los tréboles comenzaron a ser utilizados como una importante pastura para el ganado ovino. Al poco tiempo de su uso, se notó en el ganado un decremento en la fertilidad de casi el 30%, que se manifestaba como una disminución en la concepción, acompañada de una hiperplasia glandular quística de cervix y útero; alteración del moco cervical que por su mayor fluidez impide que el semen permanezca el tiempo necesario en el tracto reproductor de la hembra para que se lleve a cabo la fertilización, observándose que 24 horas posteriores a la cópula el número de espermatozoides presentes es menor al esperado. A este

síndrome de esterilidad en el ganado ovino se le denominó como "enfermedad del trébol" (Cox y Braden, 1974 a y b; Cox, 1977; Adams, 1990). Además, la galactorrea observada en hembras no preñadas, así como en machos, sugirió la presencia de algún tipo de estrógeno presente en las plantas.

A los compuestos presentes en las plantas que tienen la capacidad de producir efectos estrogénicos, se les denomina de manera genérica, fitoestrógenos. En un sentido más amplio, este término se refiere a los compuestos con efecto estrogénico, es decir que tienen la capacidad de: 1) unirse a los receptores de estrógenos; 2) inducir respuestas específicas en genes relacionados con los estrógenos y 3) estimulación positiva mediada por el receptor a estrógenos en el crecimiento de las células de cáncer de mama (Lieberman, 1996; Kurzer y Xu, 1997).

A partir de estas primeras observaciones, se iniciaron los estudios en diversos campos del conocimiento. Los primeros se realizaron en el ganado por la importancia económica que implican. Después, surgieron los estudios relacionados con el análisis de los mecanismos de acción de fitoestrógenos, así como los efectos tisulares en el aparato reproductor y el sistema nervioso, en diferentes etapas del desarrollo. Se ha propuesto a los fitoestrógenos como probables disparadores y/o reguladores de la reproducción en mamíferos (Labov, 1977). Los fitoestrógenos presentes en alimentos de consumo humano, son una alternativa para el tratamiento y prevención de diferentes padecimientos como el cáncer mamario, (Schmidt *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2002), cáncer prostático, (Hedelin *et al.*, 2006; Mäkela et al., 1998; Pertschuk *et al.*, 1980), cáncer testicular, (Walcott *et al.*, 2002; Juriansz *et al.*, 1988), cáncer uterino, (Hunter *et al.,* 1999; Hopert *et al.*, 1998), osteoporosis, (Tsutsumi,

1994; Tsutsumi *et al.*, 1995) y menopausia, (de Boer *et al.*, 2004; Cos *et al.*, 2003; Stopper *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2004).

1.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS Y SU PAPEL EN LAS PLANTAS

Entre las plantas que contienen estos compuestos están algunas de la familia de las leguminosas, que son importantes económicamente por el uso que se les da como forraje e incluso como alimento para consumo humano.

A pesar de saber que los fitoestrógenos inducen alteraciones reproductivas en el ganado, fue hasta 1950, que se aislaron e identificaron en el trébol los primeros fitoestrógenos pertenecientes a la familia de las isoflavonas: la genisteina y la formononetina (Bradbury y White, 1951). Posteriormente, fueron identificadas la daidzeina y la biochanina A (Bradbury y White, 1954; Bickof, 1968).

En 1957 fueron identificados otros fitoestrógenos pertenecientes a la familia de los coumestanos sintetizados a partir de ácido cinámico y cuya fórmula empírica es $C_{15}H_8O_5$, con dos hidroxilos libres (Bickoff *et al.*, 1957), que al parecer permiten la unión al receptor de estrógenos.

Aunada a la identificación de estos compuestos, se iniciaron los estudios para conocer su potencia biológica, considerando su capacidad para aumentar el peso uterino. Se encontró que los coumestanos, principalmente el coumestrol, son más potentes que cualquier isoflavona pero menos potente que el dietiletilbestrol (compuesto análogo al 17 ß estradiol) (Bickoff *et al.*, 1957; Micheli *et al.*, 1962).

Entre los fitoestrógenos existen diversas familias de moléculas que se incluyen a los denominados isoflavonoides y corresponden a tres grupos: las isoflavonas, los pterocarpenos y los coumestanos (O´Neill *et al.*, 1986). Algunos autores sugieren que todos estos compuestos siguen la misma ruta metabólica, por lo que se clasifican dentro del grupo de isoflavonas (Dewick y Martin, 1979). Las isoflavonas derivan de dos rutas metabólicas primarias, una a partir del acetato de malonato y la otra de un compuesto denominado ácido shikémico que proporciona los carbonos del esqueleto 3 fenil cromano común a todos estos compuestos (Figura 1) (Soriano-Rochard y Núñez, 1986; Kimura *et al.*, 2001).

Los compuestos derivados del ácido cinámico, ácido p-cumárico, etc. son derivados en realidad de aminoácidos aromáticos, dan origen a compuestos de 15 carbonos como el coumestrol, los cuales se encuentran distribuidos en anillos heterocíclicos (Salisbury y Ross, 1992).

Cos y col. (2003), sugieren que todos los fitoestrógenos son compuestos polifenólicos no estrogénicos con actividad biológica parecida a los estrógenos. Basados en su estructura química proponen una nueva clasificación asociando en cuatro grupos a todos estos compuestos: isoflavonoides, flavonoides, estilbenos y lignanos. Entre las isoflavonas o isoflavonoides, se encuentran compuestos como genisteina, daidzeina, coumestrol y equol (figura 2).

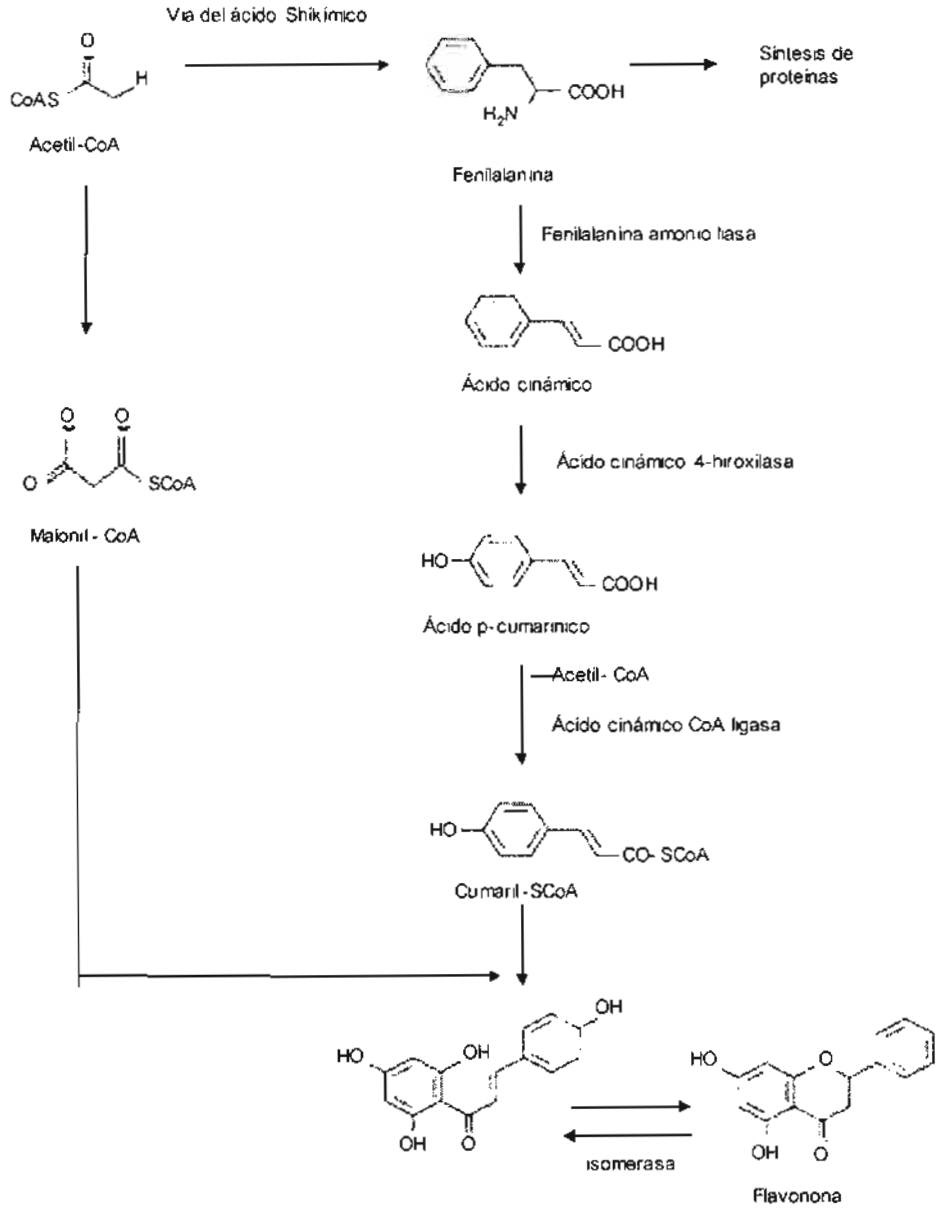
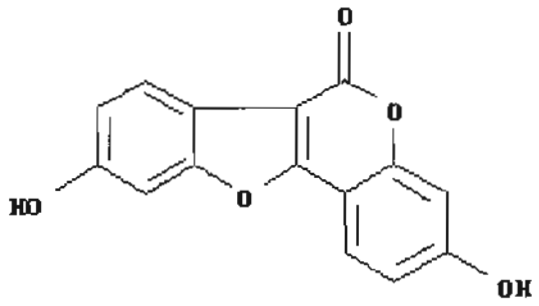
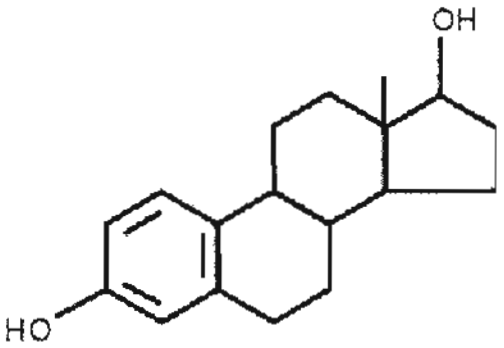


Figura1: Ruta de la biosíntesis de flavonoides en las plantas (Kimura *et al.*, 2001)



COUMESTROL



ESTRADIOL

Figura 2: Estructuras químicas comparativas de coumestrol (derivado del ácido shikémico) y el estradiol (derivado del colesterol).

Estos compuestos están presentes en bajas concentraciones en las plantas, su efecto en estas es principalmente antimicrobiano (Feet y Osman, 1982) y fungicida (Sukumuran y Gnanamanickam, 1980). Los niveles de fitoestrógenos en las

plantas pueden variar por su distribución geográfica (Hanson *et al.*, 1965), por el corte, estado de crecimiento de la planta, la temperatura y la luminosidad (Rossiter y Bech, 1966 a y b; Medina *et al.*, 1982 a y b, Gómez *et al.*, 1982).

Desde 1968, Bickoff consideró que los fitoestrógenos sirven como mecanismos de defensa en las plantas expuestas a ataques foliares. En general, podríamos decir que ante alguna situación que induzca "estrés" en las plantas, la respuesta en estas es elevar los niveles de fitoestrógenos para adaptare a las nuevas condiciones. El ataque de áfidos, induce un incremento del valor normal de 1 a 2 mg de coumestrol a 100 mg de coumestrol por kg de alfalfa (Livingston *et al.*, 1961; Loper y Hanson, 1964); la invasión del hongo *Pseudopesisa medicaginis* induce una elevación de 75 veces los niveles basales de coumestrol (LeBars *et al.*, 1990). La concentración de coumestrol considerada biológicamente activa para ejercer un efecto estrogénico es de 20 a 25 mg/kg (Smith *et al.*, 1980).

1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos presentan menor potencia biológica que el estradiol, sin embargo, sus efectos son notables en el organismo al ser consumidos, debido a la estimulación de la síntesis hepática de la proteína transportadora de estrógenos (SHBG) (Aldecreutz *et al.*, 1987). El incremento de SHBG reduce la concentración libre de hormonas sexuales endógenas, ejerciendo así los fitoestrógenos su efecto sobre los órganos blanco (Whitten y Naftolin, 1992).

Aunque estos compuestos se unen a SHBG con menor afinidad que los esteroides sexuales endógenos, estas interacciones son fisiológicamente relevantes en situaciones en las que los niveles de SHBG son altos y los de esteroides endógenos bajos, específicamente en niñas en etapas pre-púberes y mujeres que consumen anticonceptivos (Hodgert *et al.*, 2000).

En el caso específico del coumestrol se ha observado que la actividad estrogénica parece estar determinada por la concentración de coumestrol libre en el plasma, más que por su concentración total (Shutt *et al.*, 1969).

Para determinar la dosis media efectiva de algunos fitoestrógenos Milligan y col., (1998), realizaron un ensayo *in vivo* sobre el incremento de la permeabilidad vascular uterina en ratonas ovariectomizadas. Al comparar sus resultados con el estradiol y estriol, se determinó que el coumestrol es el fitoestrógeno más activo, la genisteina es 10 veces menos potente que el coumestrol; la daidzeina y la formononetina no inducen un efecto cuantificable. Estos resultados indican que algunos compuestos, aún en exposiciones cortas pueden inducir efectos estrogénicos típicos, y que, a pesar de su baja potencia, producen respuestas agudas.

A nivel de receptores se ha visto que tanto los coumestanos como las isoflavonas (coumestrol y genisteina) son capaces de competir con el 17 β estradiol para unirse a los receptores citosólicos uterinos. La afinidad de unión se relaciona con su potencia estrogénica, es decir, una parte de estradiol equivale a 70 de coumestrol y 175 de genisteina para inhibir la unión *in vitro* de 17 β estradiol H^3

(Shemesh *et al.*, 1972). Además, los coumestanos tienen la capacidad de traslocar los receptores citoplásmicos y saturar los receptores nucleares de manera similar al estradiol (Martín *et al.*, 1978).

Se ha reportado que el coumestrol en bioensayos realizados en la fracción citosólica de células uterinas de oveja, se une con relativa afinidad (de 5% con relación al estradiol) (Shutt y Cox, 1972), esto también se ha descrito en el hipotálamo e hipófisis de la oveja (Molteni *et al.*, 1995). La afinidad de unión al receptor citosólico del útero es menor que la del estradiol ya que la constante de disociación (Kd) para el coumestrol es de 50 nM y para el estradiol es de 0.2-0.5 nM (Geynet *et al.*, 1972).

Inicialmente se propuso que los efectos que manifiestan los fitoestrógenos se deben a la unión de éstos con los receptores de estrógenos. Sin embargo, la diversos efectos que pueden inducir en los diferentes tejidos y sistemas hace pensar que estos compuestos no actúan exclusivamente a través de un mecanismo simple, ya que no todos los fitoestrógenos actúan por medio de su unión a los receptores de estrógenos tipo II, los cuales están ligados a los procesos biológicos más importantes determinados por estrógenos (Chapin *et al.*, 1996). A partir de estudios *in vitro* se sugiere que los fitoestrógenos son agonistas del estradiol al unirse tanto a receptores α como β. Sin embargo, las interacciones más fuertes entre estos compuestos y el receptor ocurren con los receptores tipo β, en contraste a lo que ocurre con el estradiol (Casanova *et al.*, 1999).

Cassidy (2003) propone que los fitoestrógenos ejercen su efecto preferentemente a través de los receptores β estimulando tejidos específicos, sin embargo, también presentan otros efectos que se realizan de manera independiente a los receptores estrogénicos como son su capacidad antioxidante, efecto antiproliferativo y antiangiogénico. Asímismo, propone que los fitoestrógenos de la dieta se metabolizan en el intestino por bacterias, se absorben y posteriormente se conjugan en el hígado y pasan a la circulación plasmática. Los que no son utilizados son excretados por la orina.

Los fitoestrógenos tales como genisteina, coumestrol y zeralonona estimulan la actividad transcripcional de ambos subtipos de receptores de estrógenos en concentraciones de 1^{-10} nM, aunque la unión se realiza preferentemente al subtipo β (Kuper *et al.*, 1998). Entre los receptores ß se ha identificado, a partir de un análisis de RNAm 2 nuevas isoformas, los receptores de estradiol ß1 y ß 2. La afinidad del estradiol a estos receptores es muy baja, en especial a la isoforma 2; compuestos como genisteina y coumestrol compiten efectivamente con el estradiol para unirse a estos receptores, los cuales se expresan de manera importante en ovario, próstata, hipófisis y músculo de rata, siendo escasa la isoforma 2 (Peterson *et al.*, 1998).

De manera general, se ha observado que los fitoestrógenos administrados en la rata de forma aguda, inducen receptores de progesterona en el útero, hipófisis, hipotálamo y área preóptica (Whitten y Naftolin, 1992).

Se ha planteado que el coumestrol y las isoflavonas ejercen su efecto al interactuar con los receptores de estrógenos, siendo esta unión de alta afinidad. En

células cancerosas de mama, inducen una respuesta estrogénica al interactuar en los genes c-myc, pS2 y con los receptores de progesterona (Mayr *et al.*, 1992; Mäkelä *et al.*, 1994; Micksicek, 1995).

En estudios de saturación de receptores con dosis equipotentes de estradiol y genisteina, ambos tienen la misma capacidad para estimular la síntesis de proteínas, catepsina pS2 y receptores a progesterona reguladas por estrógenos, asímismo inducen una regulación a la baja de receptores de estradiol y estimulan la proliferación celular. Sin embargo, la genisteina tiene efecto bifásico, en concentraciones de 1 μm estimula la proliferación celular y en dosis de 10 a 20 μm inhibe abruptamente este proceso (Zava *et al.*, 1997).

Whitten y cols. (2002) analizaron el efecto de las isoflavonas sobre los mecanismos neurales en receptores ERα-dependientes (receptores de oxitocina en el núcleo ventromedial del hipotálamo) y ERβ-dependientes (regulación de ERβ mRNA en el núcleo paraventricular). El tratamiento en ratas con 100 ppm (μg/g) de coumestrol en la dieta, desde el día del nacimiento al día 21 produce anovulación prematura y la administración desde el día de nacimiento al día 10 suprime la conducta sexual en machos. Una semana de tratamiento en ratas ovariectomizadas incrementa los receptores ß y la expresión de RNA mensajero en el núcleo paraventricular, efecto opuesto al estradiol. Por los resultados anteriores, se sugiere que la acción de los fitoestrógenos a nivel de conducta es estrogénica, al antagonizar o producir una respuesta opuesta al estradiol.

Los fitoestrógenos de la dieta presentan actividad estrogénica-antiestrogénica, ésta última se ha postulado que se manifiesta al interactuar el fitoestrógeno con el receptor a estrógenos, desplazando a los estrógenos endógenos y bloqueando así su efecto hormonal (Mäkelä *et al.*, 1994). En el caso de las isoflavonas se ha reportado un efecto inhibitorio en la formación de 5α dihidrotestosterona (5α DHT) a partir de testosterona por la enzima 5α reductasa (Evans *et al.*, 1995). También pueden inhibir la actividad de enzimas como aromatasas, tirosin quinasa y DNA topoisomerasa e incrementar la síntesis de antioxidantes (Peterson y Barnes, 1991; Barnes, 1998; Kurzer y Xu, 1997).

Otro efecto estrogénico de los fitoestrógenos es su relación con la síntesis de prostaglandinas. Al respecto, en estudios *in vitro* se ha demostrado que tanto daidzeina, genisteina, equol y coumestrol son capaces de estimular la síntesis microsomal de prostaglandinas H (PHS), la cual fue medida por la disminución de ácido araquidónico dependiente de oxigeno. Estos resultados sustentan la idea de que compuestos con capacidad estrogénica pueden modular la activación de PHS (Degen, 1990).

En estudios realizados con ratas ovariectomizadas, se muestra que los fitoestrógenos pueden actuar como agonistas de los estrógenos. En roedores, se ha observado que el coumestrol (100 g/ml en el agua de beber) y el 17 β estradiol (100 ng/ml) son capaces de inducir la misma respuesta. La administración combinada, produce efectos aditivos en relación al peso uterino y proliferación celular en la vagina y el útero. Asímismo, se observa que el pretratamiento con coumestrol por 24

horas reduce la respuesta mitótica del útero durante 48 horas, posterior a un implante subcutáneo de estradiol. Estudios realizados por Pocock y col. (2002) encuentran que el coumestrol actúa como un estrógeno típico y sólo muestra efectos aditivos con el estradiol.

La capacidad del coumestrol para estimular la respuesta uterina, de manera similar al estradiol, sugiere que este fitoestrógeno puede ser clasificado como "un verdadero inductor del crecimiento uterino". Sin embargo, también es considerado como un estrógeno "impedido" (como estriol), debido a que no es retenido el mismo tiempo que el estradiol en el núcleo y actúa entonces como un antiestrógeno. Sin embargo, de manera general, se sugiere que estos compuestos pueden actuar como estrógenos o antiestrógenos dependiendo del esquema de administración (Kitts *et al.*, 1983). Es decir que cuando se administran y la respuesta es similar a la que induce el estradiol (por ej. aumento de peso uterino) se determina que la respuesta es estrogénica. Sin embargo, cuando la respuesta no es similar a la que induce el estradiol o incluso es contraria se dice que la respuesta es antiestrogénica (por ej. disminución del peso uterino).

A pesar de que hasta el momento se ha planteado que la respuesta que inducen los fitoestrógenos en ovinos y bovinos consumen es estrogénica, existe una controversia debido a que algunos de estos compuestos como la genisteina y el coumestrol, han inducido respuestas de tipo antiestrogénico (Newsome y Kitts, 1980). Esta acción de los fitoestrógenos se observa al realizar un análisis de unión a receptores y encontrar un agotamiento parcial de receptores; la disminución de los sitios receptores se explica por la translocación de los receptores al núcleo y la

retención de coumestrol en el núcleo, la cual es menos prolongada en tiempo que la de estradiol, por lo que es muy probable que los efectos antiestrogénicos estén relacionados con el reemplazo incompleto de receptores.

Jacob y col. (2001) encuentran en rata que el co-tratamiento de estradiol y coumestrol estimula el área preóptica y los núcleos hipotalámicos ventromediales, lo cual sugiere una acción antiestrogénica del coumestrol mediada por receptores α de estradiol.

Los fitoestrógenos como zeralonona, coumestrol, quercetina y biochanina A son inhibidores de la 17 β hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 5, enzima involucrada en el metabolismo de andrógenos y estrógenos. Al actuar como inhibidores de la aromatasas se considera que inducen un efecto benéfico en cánceres hormono dependientes (Krazeisen *et al.*, 2001, 2002).

1.3 FITOESTRÓGENOS EN HUMANOS

En el caso del humano, es importante señalar que los estrógenos provenientes de plantas así como de hongos, contribuyen a lo que se denomina la exposición total de estrógenos. La exposición de estrógenos endógenos más la exposición de fitoestrógenos y xenoestrógenos (compuestos no esteroideos que se encuentran en detergentes, pesticidas y plásticos cuyas moléculas se unen a los receptores de estrógenos) se sugiere pueden tener consecuencias en el desarrollo prenatal a nivel de tracto reproductivo en desarrollo, en la fertilidad en el humano, además, de ser potenciales promotores del crecimiento de tumores hormono

dependientes dependiendo de las dosis alcanzadas (Miksicek, 1994; Seawright, 1995).

La disminución de hormonas esteroides en la mujer asociadas a la menopausia, se caracterizan por alteraciones las cuales se manifiestan como vaginitis atrófica y resequedad vaginal, además de contribuir a problemas como la osteoporosis e incrementar el riesgo de alteraciones coronarias (Kurzer y Xu, 1997). A pesar de que estos síntomas son universales, se sugiere que las manifestaciones de estos varían según la cultura alimenticia (Lock, 1991), siendo menores en las poblaciones japonesas. Diversos estudios muestran que los fitoestrógenos presentes en la dieta (principalmente frijol de soya y sus derivados) son los responsables de reducir la sintomatología durante la pre y menopausia (Aldecreutz *et al.*, 1992; Colditz *et al.*, 1992; Murkies *et al.*, 1995; Chiechi *et al*, 1999a; Chiechi, 1999b; Shiizaki *et al.*, 1999).

Los efectos que presentan los estrógenos con relación a la osteoporosis, son: la reducción de la sensibilidad del hueso como respuesta al efecto de la hormona paratiroidea, bloquea la liberación de interleucina-1, actúa como un potente agente que modula resorción, y modula directamente la actividad del osteoblasto (Aurbach *et al.*, 1992). Se ha visto que los fitoestrógenos prevén la resorción del hueso y promueven el incremento de la densidad ósea, (Tsutsumi, 1995; Anderson *et al.*, 1995; Arjmandi *et al.*, 1996; Kalu *et al.*, 1988; Fanti *et al.*, 1998; Chiechi *et al.*, 1999a; 1999b).

Por otro lado, es importante señalar que diversas evidencias sugieren que la dieta rica en fitoestrógenos reduce el riesgo de cáncer de mama, próstata y colon

(Aldecreutzs *et al.*, 1995; Barnes, 1995; Messina *et al.*, 1994). Dixon-Shanies y Shaidk (1999), después de realizar estudios epidemiológicos, sugieren que el consumo de una dieta rica en fitoestrógenos (genisteina, daidzeina, biochanina A y coumestrol) tiene un potencial importante en la prevención de cáncer de mama. La acción inhibitoria de la genisteina en el cáncer de mama parece ser compleja y está solo parcialmente mediada por los receptores de estrógenos (Chen *et al.*, 2003).

El desarrollo del cáncer endometrial está altamente relacionado con la exposición prolongada a estrógenos, se sugiere que los fitoestrógenos podrían tener un efecto antiestrogénico en el desarrollo de este tipo de cáncer. Horn-Ross y col. (2003), evaluaron la asociación entre la ingesta de fitoestrógenos (isoflavonas, coumestanos y ligninas) y el cáncer endometrial; encontraron que tanto las isoflavonas como las ligninas están inversamente relacionados con el riesgo de cáncer endometrial, así mismo, mujeres postmenopáusicas con obesidad y dieta carente o con muy bajo contenido de fitoestrógenos presentan un alto riesgo de cáncer endometrial.

En el cáncer primario de ovario, el consumo de una dieta rica en fitoestrógenos induce un menor riesgo de volver a presentar una neoplasia posterior a un tratamiento. McCann y col. (2003), proponen que este tipo de dieta tiene un papel quimiopreventivo en neoplasias relacionadas con hormonas.

Debido al uso cada vez más frecuente de fitoestrógenos como terapia alternativa durante la menopausia y postmenopausia, Nikander y col. (2003), analizaron en mujeres posmenopáusicas sintomáticas (presencia de depresión, bochornos, insomnio, resequedad vaginal) el efecto del consumo de estos

compuestos, observaron que los fitoestrógenos no causan cambios en los niveles de FSH y LH ni en los niveles de la proteína transportadora de hormonas sexuales. El tratamiento, es tolerado por las pacientes y no provoca cambios en enzimas hepáticas, creatinina, en el índice de masa corporal o presión sanguínea, pero si disminuyen los síntomas asociados con la menopausia.

La disminución de estrógenos durante la menopausia, se ha asociado con un mayor riesgo de presentar desordenes neurodegenerativos. Linford y Dorsa (2002) encontraron que 50 nM de genisteina son suficientes para reducir la apoptosis neural, encontraron que los receptores neuronales son principalmente de tipoβ, y que tanto el 17 ß estradiol como la genisteina reducen el número de neuronas apoptóticas por medio de receptores de estrógenos al inhibir las caspasas.

Con relación al cáncer de próstata, se ha mostrado una asociación inversa entre el consumo de coumestrol y daidzeina con el riesgo de presentar este padecimiento (Strom *et al.*, 1999).

Si bien, se plantea un efecto benéfico de los fitoestrógenos sobre el cáncer prostático en hombres, también se ha propuesto que estos compuestos pueden estar involucrados en el incremento de alteraciones reproductivas como por ejemplo: en el hombre disminución del conteo espermático y en la mujer inducción de poliquistosis ovárica y.ciclos anovulatrorios; estos efectos se han observado en los últimos 50 años (Sharpe y Shakkebaek, 1993).

De manera general se propone que las isoflavonas inhiben el crecimiento de células cancerígenas, modulando los genes relacionados con el control homeostático

del ciclo celular y apoptosis. Sarkar y Li (2002), proponen que estos compuestos inhiben la activación del factor transcripcional nuclear NF-Kappa β y la vía de la señal Akt, ambos compuestos involucrados en el equilibrio entre la sobrevivencia celular y la apoptosis, por lo cual actúan como potentes inhibidores de angiogénesis y metástasis.

A pesar de que el uso y consumo de este tipo de compuestos está muy difundido ya que cada vez es mayor el número de hombres y mujeres que consumen comprimidos de soya y alfalfa, es de gran importancia realizar estudios basados en el consumo por tiempo prolongado en humano para poder determinar las dosis, tiempo de administración adecuados y descartar así efectos secundarios.

Por otro lado, es necesario realizar curvas dosis respuesta ya que dependiendo de la dosis y el órgano a considerar el efecto que se presente puede ser estrogénico o antiestrogénico.

1.4 FITOESTRÓGENOS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

Las primeras observaciones que se realizaron del efecto de los fitoestrógenos fueron hechas en ganado ovino. En estudios realizados recientemente en esta especie (Adams, 1995 a y b), se sugiere que la infertilidad que inducen los fitoestrógenos se pueden categorizar en temporal y definitiva. La infertilidad temporal resulta de la acción de los fitoestrógenos, que actúan de manera similar a los estrógenos en la mayoría de los mamíferos. La infertilidad permanente resulta de

cambios que son inducidos por estos mismos compuestos en el cérvix y son efectos análogos a los inducidos por los estrógenos durante la organogénesis. En estos trabajos proponen que el tratamiento prolongado de fitoestrógenos activa mecanismos que se presentan durante el desarrollo ontogenético y se pierden en el neonato.

La administración de coumestrol en ovejas ovariectomizadas, induce cambios asociados con una pronunciada estrogenización del tracto reproductor, los cuales son inducidos al alcanzar niveles de coumestrol de 0.6-3.1 μg/100ml en sangre, por medio de la administración de coumestrol por vía intramuscular (7.5-25 mg/24 hr) o infusión intrarruminal (350 mg/24 hrs) (Shutt *et al.*, 1969).

El consumo de alimento comprimido con diferentes coumestanos induce en ovinos depresión de la ovulación (Ramón *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1980). Se ha visto que pueden influenciar la liberación de LH durante la estación reproductiva, sugiriendo que la amplitud de los pulsos de LH puede estar asociada con un efecto directo del coumestrol en el ovario o indirectamente por una inhibición en los niveles de FSH (Montgomery *et al.*, 1985; Martín *et al.*, 1988).

La exposición prolongada de coumestrol en ovejas, produce cambios macroscópicos del tracto reproductor a nivel de útero, así como alteraciones histopatológicas de cervix y útero; presentan una gran cantidad de pliegues cervicales y desarrollo de quistes, así como mayor actividad glandular (Cantero *et al.*, 1996).

En el ganado bovino que consume con frecuencia forrajes estrogénicos, se observa irregularidad del ciclo estral, baja tasa de fertilidad (Lotane y Adler, 1966), aumento de la conducta sexual, quistes ováricos, hiperplasia de mama y útero así como relajación del ligamiento pelviano (Jurado, 1989).

Al igual que en los ovinos, en bovinos se presentan alteraciones del moco cervical disminuyendo la resistencia eléctrica del moco; en los machos se ha observado baja fertilidad, ginecomastia e hipospermia (Romero *et al.*, 1997). Al parecer, la infertilidad que se presenta en los bovinos es temporal, ya que se ha observado que los efectos estrogénicos desaparecen después de un mes de remover al ganado de los pastos estrogénico (Adams, 1995b).

LeBars y col. (1990), encontraron que los efectos adversos que inducen los fitoestrógenos en diversas especies como ovinos, caprinos y bovinos, al consumir forrajes verdes o deshidratados, se ven incrementados en las épocas de primavera (por el ataque foliar por áfidos que sufren las plantas así como al final de ésta por ataque fúngico, que pueden incrementar hasta 100 veces los niveles basales de fitoestrógenos), estos niveles se conservan después de la colecta, el ensilaje, la exposición al sol y se ha visto que no pueden ser desnaturalizados por ningún tratamiento.

En peces, se ha visto que la presencia de fitoestrógenos como contaminantes en el agua o por la elaboración de alimentos con polvo de soya y aceite de alfalfa, inducen alteraciones en los procesos fisiológicos relacionados con los estrógenos. Tales procesos son la reproducción, el crecimiento y la osmorregulación. En el Salmón mantenido en cultivo, cuya base alimentaria es alimento seco con alto

contenido de fitoestrógenos, se presentan elevadas concentraciones de vitelogenina en plasma de animales inmaduros tanto en hembras como machos, alterándose así la reproducción (Pellisero *et al.*, 1989; Pellisero *et al.*,1991; Pellisero *et al.*,1993).

En diversas especies tanto domésticas como silvestres, se sugiere que los fitoestrógenos puede tener algún ligando endógeno que les permita determinar e identificar la calidad de las plantas para su dieta, lo cual a su vez, les permitirá aplazar el crecimiento o la reproducción, a este ligando se le denomina "interacoide" y se sugiere actúe por un mecanismo mediado por receptores (Chapin *et al.*, 1996).

En especies domésticas es importante continuar realizando estudios, ya que en su mayoría se reporta una disminución de la fertilidad tanto en el macho como en la hembra, es importante no descartar la alimentación con alto contenido de fitoestrógenos o contaminantes del agua como inductores de estas alteraciones.

En el caso de las especies productoras de leche, sería recomendable realizar un estudio que relacione el consume de fitoestrógenos en el alimento que consumen las vacas y la cantidad de estos compuestos presentes en la leche ya que ésta podría llegar a ser una vía importante de consumo en el humano si los animales son alimentados con pastos estrogénicos.

1.5 FITOESTRÓGENOS EN ROEDORES

Los roedores constituyen el modelo experimental más empleado. Por ello en esta sección se presentan los trabajos que se han realizado con roedores en diferentes etapas del desarrollo.

1.5.1 Etapa Prenatal

De manera general la exposición prenatal de genisteina produce diversas alteraciones: 1) reducción del peso al nacimiento, 2) reducción de la distancia ano genital al nacimiento, 3) incremento del volumen de los núcleos dimórficos en el área preóptica del hipotálamo, 4) adelanto de la pubertad y alteración de los ciclos vaginales (Levy *et al.*, 1995). Hemos observado en rata wistar que la administración en el día 10 de gestación de coumestrol en dosis equimolares a 2 y 4 μg de estradiol, producen en la hembra un retraso en el desarrollo del ovario al observarse escasos folículos, así como los cordones de las células germinales menos definidos y con un aspecto fibrilar; en el caso de los machos la lámina basal de los túbulos es poco definida, al igual que la cápsula testicular, el tratamiento disminuye el número de células germinales y de Sertoli, presentando además, irregularidad en la forma de los túbulos. Estos resultados sugieren que el coumestrol en las dosis empleadas tienen un efecto estrogénico en los machos y un efecto antiestrogénico en las hembras (García *et al.*, 2007).

La exposición de genisteina durante la gestación y la lactancia en ratas, provoca anormalidades prepuberales, los machos expuestos presentan una distancia anogenital menor que los controles, y menor tamaño testicular; la administración perinatal, causa disfunciones a largo plazo ya que los machos en la etapa adulta despliegan escasa conducta copulatoria y bajos niveles de testosterona (Wisniewski *et al.*, 2003).

1.5.2 Etapa Neonatal

La exposición diaria de coumestrol (100 μg) o equol (100 μg) en ratas hembras, entre los días 1 al 5 postnatales, inducen un desarrollo prematuro de las glándulas uterinas e incremento del peso uterino, el cual es reducido en edades tardías y se presenta un agotamiento de los sitios receptores de estradiol; esta respuesta se presenta con ambos fitoestrógenos siendo menor en el caso del equol (Medlock *et al.*, 1995).

La administración de coumestrol durante los 5 primeros días de vida, en dosis de 100 μg en machos, no modifica el peso testicular, de las glándulas sexuales accesorios, ni el conteo espermático. Tampoco modifica los niveles de LH, FSH y testosterona, por lo que concluyen que la administración neonatal de coumestrol no produce ninguna alteración en el potencial espermatogénico al no modificar los parámetros antes mencionados (Awoniyi *et al.*, 1997).

La administración de coumestrol en la dieta de ratas neonatas hembras produce la inducción de receptores de progesterona, apertura vaginal temprana, bajo peso corporal e irregularidad en los ciclos vaginales (Whitten y Naftolin, 1992). En ratas recién nacidas que consumen coumestrol a través de la lactancia se observó que al alcanzar la edad de 132 días el 83% de las crías presentan síndrome anovulatorio, el cual se caracteriza por un estado de estro permanente y la presencia de células cornificadas en el útero e inhibición del pico de LH posterior a la administración de estradiol seguida por progesterona (Whitten *et al.*, 1993).

Faber y Hughes (1993), al analizar el efecto de la genisteina en dosis de 1 hasta 1000 μg, encontraron que la dosis de 10μg se asocia con incremento en la respuesta hipofisiaria para la liberación de gonadotropinas. El volumen de los núcleos dimórficos del área preóptica del hipotálamo se incrementa en dosis de 500 a 1000 μg. Esto sugiere que las dosis bajas de genisteina tienen efectos no androgénicos en la sensibilización de la hipófisis y las dosis altas tienen el efecto típico de los estrógenos en masculinizar el cerebro.

El tratamiento con β-Sisterol (esterol vegetal semejante a colesterol), afecta la secreción basal de LH tanto en machos como en hembras, al interferir en la síntesis de hormonas esteroides creando un ambiente neonatal caracterizado por bajos niveles de estrógenos, lo cual induce una sensibilización de la hipófisis y el hipotálamo a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) e incrementa los niveles circulantes de LH. Niveles bajos de coumestrol (0.1 μg) incrementan únicamente en hembras los niveles de LH; dosis de 1 y 10 μg de coumestrol elevan LH tanto en machos como en hembras. Esta diferencia se explica por la susceptibilidad de las hembras a la masculinización inducida por administración endógena de estrógenos. Sin embargo, estos tratamientos no inducen cambio en los núcleos dimórficos hipotalámicos (Register *et al.*, 1995).

La administración de fitoestrógenos en hembras neonatas causa alteraciones morfofisiológicas en el tracto reproductivo, las cuales se hacen visibles a los 40 días de edad y son irreversibles, entre las alteraciones se observa cornificación vaginal persistente (Burroughs, 1995), ovarios con cuerpos hemorrágicos y escasos folículos

ovulatorios (Burroughs *et al.*, 1990), metaplasia escamosa uterina (Forsberg y Kalland, 1981), y apertura vaginal temprana (Burroughs, 1995).

En machos recién nacidos, la exposición de genisteina (100 μg / 10 días) produce sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, alterando la respuesta hipofisiaria, manifestándose por la disminución de los niveles basales de FSH (Faber y Hughes, 1991; Register *et al.*, 1995).

1.5.3 Etapa Poslactancia

En ratas mayores de 21 días de edad que consumen coumestrol, se presenta inducción a receptores de progestina en útero, hipófisis y núcleos dimórficos en el área preóptica del hipotálamo, apertura vaginal temprana e irregularidad de los ciclos estrales, lo cual se traduce en alteraciones reproductivas (Whitten y Naftolin, 1992).

Ashby y col. (1999), reportan en ratas intactas inmaduras, que la actividad uterotrópica del coumestrol es similar a la del estradiol al inducir aumento del fluido uterino e incremento del peso del útero, cervix y vagina. Tinwell y col. (2000), encuentran que el coumestrol tiene efecto estrogénico al inducir incremento tanto en la altura del epitelio uterino como en la formación glandular y en el contenido de DNA.

En roedores el coumestrol (300 μg/ rata) induce la síntesis de proteína en útero de manera similar al 17 β estradiol (4μg/rata), a genisteina (1250 μg/rata) y dietiletilbestrol (5μg/rata) (Sonjen y Kaye, 1976).

En roedores la administración de coumestrol induce en hembras púberes, desarrollo prematuro del peso uterino efecto que no se presenta en hembras adultas de edades avanzadas. lo cual se puede deber a una disminución a nivel de receptores de estradiol (Medlock *et al.*, 1995).

La acción estrogénica del coumestrol se presenta tanto *in vivo* como *in vitro*, el coumestrol compite por el receptor a estrógenos e induce un incremento en el peso uterino. El incremento de peso uterino ocurre tanto en peso fresco como en peso seco, indicando un crecimiento verdadero. El aumento del peso uterino se acompaña de la inducción de receptores citosólicos a progestinas e incremento en la unión de estrógenos a nivel nuclear. Los fitoestrógenos de la dieta presentes en el alimento pueden actuar como potentes agentes estrogénicos (Whitten *et al.*, 1993).

McKim y col. (2001) reportan que la administración de diferentes dosis de coumestrol (0, 10, 35, 75 y 150 mg/día) durante los días 18 a 21 postnatales, inducen incremento en el peso uterino absoluto e incremento en la altura de las células epiteliales, ambos efectos de manera dosis dependiente. La dosis más alta de coumestrol induce un crecimiento uterino que se consideró 230% mayor que el grupo control.

La genisteina, el coumestrol y la zeralonona cuasan incremento del peso uterino, de la altura del epitelio uterino y del número de glándulas (Jefferson et al., 2002).

En ratas ovariectomizadas, la administración de coumestrol en el rango de miligramos y por tiempo prolongado (2 administraciones de 0.6mg o 2.4 mg/ 0.45ml por 8.5 horas) tiene la capacidad de suprimir la liberación de LH inducida por GnRH

in vitro. Se sugiere que actúa centralmente al reducir la frecuencia de los pulsos generadores de GnRH hipotalámico, el efecto de estos compuestos sobre los pulsos de LH ocurre a nivel de hipófisis, reduciendo la respuesta a GnRH en un proceso mediado por receptores de estrógenos (McGarvey *et al.*, 2001).

Existen muy pocos datos del efecto de los fitoestrógenos en machos, en estudios realizados a nivel de próstata se ha observado que la genisteina es capaz de actuar como agonista de estrógenos al inducir metaplasia escamosa epitelial (Santti *et al.*, 1998). Se sugiere una acción quimiopreventiva de estos compuestos (Mäkelä *et al.*, 1995a). Sin embargo, no existe evidencia del efecto estrogénico o antiestrogénico de los derivados de la soya cuando se utilizan por corto tiempo en el desarrollo de metaplasia epitelial y la expresión del proto-oncogene c-fos en próstata, por lo que los resultados encontrados sobre el efecto prostático son aún contradictorios (Mäkelä *et al.*, 1995b).

Se plantea, que la estrogenización temprana de machos resulta en un decremento persistente de la actividad enzimática de 5 α reductasa y del crecimiento prostático, indicando que existe un período crítico de la actividad enzimática, este tipo de compuestos no produce un efecto similar a la castración cuando se administra en machos adultos normales (Mäkelä, 1990).

El consumo de una dieta alta en isoflavonas, durante un período de 5 semanas en ratas macho, produce un decremento significativo en el peso corporal y prostático. Los niveles de testosterona y androstendiona se observan significativamente más bajos en estos animales en comparación con los que

consumen una dieta libre de fitoestrógenos, sin embargo, no se presentan diferencias significativas en los niveles plasmáticos de LH o estradiol (Weber *et al.*, 2001).

Stroheker y col. (2003), evaluaron en ratas Wistar el efecto de la soya administrada en la dieta sobre órganos accesorios reproductivos y la respuesta a la administración de andrógenos, a los 10 días de administración observaron que las vesículas seminales son los órganos más sensibles a los fitoestrógenos, y que tanto vesículas seminales como próstata presentan una respuesta alterada a la administración de propionato de testosterona.

Lephart y col. (2003), propusieron que la dieta con soya protege de las alteraciones relacionados con la edad; para demostrar su hipótesis, realizaron un estudio en ratas a las cuales les administraron una dieta rica o carente de fitoestrógenos. Analizaron la respuesta al dolor inducido por choques eléctricos, así como la respuesta al estrés hormonal, los receptores de glucocorticoides en hipocampo y los niveles de sinaptosinas y de las moléculas de adhesión neural. Encontraron que la dieta con fitoestrógenos no modifica la conducta al dolor, pero incrementa a nivel de hipocampo los receptores de glucocorticoides modificando el sistema de retroalimentación negativo, que se presenta en el estrés hormonal (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal).

Aunque aparentemente son muchos y muy diversos los estudios realizados en roedores sería de gran importancia considerar estudios morfofisiológicos y conductual de manera integral en las diferentes etapas del desarrollo, así como el análisis de tratamientos a largo plazo.

2. JUSTIFICACIÓN

El coumestrol es uno de los fitoestrógenos que mayor potencia biológica presenta. Su efecto estrogénico/antiestrogénico sobre la fisiología reproductiva ha sido evaluado, encontrando que se trata de un "disruptor endocrino". Se ha determinado que la ingesta de coumestrol disminuye la fertilidad de las hembras y machos de especies de importancia económica. Esta es la causa de que sean enviados al rastro, por lo que no es posible realizar estudios en estos animales; además, en caso de poder realizarlos su mantenimiento resultaría muy costoso y su manejo difícil.

Esto abre nuevas líneas de investigación dirigidas a determinar el uso del coumestrol como un regulador en los procesos reproductivos utilizando a los animales de laboratorio cuyo mantenimiento es más económico y su manejo más fácil. Dado que se ha descrito que la administración de estrógenos produce a la rata macho una disminución en los niveles de gonadotropinas y testosterona y alteración en la función testicular, se decidió realizar el presente estudio utilizando a la rata macho para determinar el efecto del coumestrol no solo en los niveles circulantes de gonadotropinas y testosterona sino también en el ciclo espermatogénico, así como en las glándulas sexuales accesorias.

3. HIPÓTESIS

Si el efecto del coumestrol es estrogénico, esperaríamos que las ratas macho expuestas a dosis crecientes de coumestrol presentarán niveles disminuidos de gonadotropinas y testosterona, modificaciones en las glándulas sexuales accesorias, así como alteraciones en la espermatogénesis.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Analizar el efecto del coumestrol sobre hipófisis, testículo y glándulas sexuales accesorias.

4.2.1 Objetivos Particulares

4.2.1 Analizar por radioinmunoanálisis el efecto del coumestrol en los niveles de gonadotropinas.

4.2.2.Analizar por radioinmunoanálisis el efecto del coumestrol sobre la producción de testosterona.

4.2.3 Analizar por medio del cálculo del índice somático, el efecto del coumestrol en testículo y glándulas sexuales accesorios (próstata, glándula vesicular y glándula coagulante). Analizar el efecto del coumestrol en el tamaño de las glándulas coagulantes.

4.2.4 Analizar el efecto del coumestrol en los diámetros o ejes testiculares y el volumen testicular.

4.2.5 Analizar el efecto del coumestrol en la espermatogénesis por medio del análisis histológico y morfométrico.

5. METODOLOGÍA

5.1 TRATAMIENTO

5.1.1 Animales

Se utilizaron 70 ratas macho Wistar con un peso promedio de 300g. Las ratas se dividieron en 7 grupos (10 animales por grupo) y se mantuvieron durante el experimento en condiciones de bioterio (12 hrs luz/12 hrs obscuridad) con agua y alimento *ad libitum*.

5.1.2 Dosis

Durante tres días consecutivos (Toyama *et al.*, 2001; Okamura *et al.*, 2004) se les administró Coumestarol ($C_{18}H_8O_5$; P.M.: 268.22; Acros Lab, Belgium) en dosis crecientes, para realizar una curva dosis-respuesta. Las dosis empleadas fueron las siguientes:

Grupo A (Control): 0 μg de coumestrol /100 μl de aceite vegetal (av) /día

Grupo B: 12.5 μg de coumestrol/ 100 μl av /día

Grupo C: 25 μg de coumestrol/100 μl av /día

Grupo D: 50 μg de coumestrol/100 μl av /día

Grupo E: 100 μg de coumestrol/100 μl av/día

Grupo F: 200 μg de coumestrol/100 μl av /día

Grupo G: 400 μg de coumestrol/ 100 μl av /día

El tratamiento se administró diario por medio de una inyección subcutánea en un volumen de 0.1 ml.

5.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Al cuarto día, los animales fueron pesados y posteriormente sacrificados por decapitación. Se obtuvo sangre, testículo derecho e izquierdo, así como las glándulas sexuales que responden al estímulo de estrógenos: próstata, vesícula seminal y glándula coagulante.

Los órganos fueron pesados y fijados en Bouin Dubosq (Humason *et al.*, 1979), por 48 horas y posteriormente lavados en alcohol de 70°.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el suero, posteriormente se congeló a -4° C hasta la realización del análisis hormonal por radioinmunoanálsis.

5.3 ANÁLISIS HORMONAL

5.3.1 Radioinmunoanálisis de Gonadotropinas

5.3.1.1 Hormona Leutinizante (LH)

Se utilizó el Kit AMERLEX-M LH RIA (JP 3081 TE/97b). La curva estándar abarca un rango de 0-144 mUI-ml (Anexo 1).

Especificidad del ensayo: tiene reacción cruzada con TSH <4%, FSH >0.1% y 49.7 con hCG:

5.3.1.2 Hormona folículo estimulante (FSH)

Se utilizó el Kit AMERLEX-M FSH RIA (JP 3071 E/97b). La curva La curva estandar abarca un rango de 0-83.8 mUI-ml (Anexo 1).

Especificidad del ensayo: reacción cruzada con TSH < 0.09%, LH < 0.08% y hCG < 0.006%.

5.3.2 Radioinmunoanálisis de Testosterona

Se utilizó el Kit TESTOSTERONE RIA (DSL-4000). La curva estándar en un rango de 0.1 a 25 ng/ml (Anexo 1).

Especificidad del ensayo: Presenta reacción cruzada con 5α dihidrotestosterona en 5.8%, 11 oxotestosterona en 4.2 %, Androstenediona en 2.3%, Etisterona en 1.9%, Norentindrona en 0.92%.

5.4 ÍNDICE SOMÁTICO

A partir del peso de los órganos y el peso corporal se calculó el Índice Somático de cada órgano (testículo = Índice Testicular Somático, próstata = Índice Prostato Somático, vesículas seminales Índice Vesicular Somático y glándula

coagulante Índice Coagulante Somático) (Kuhn-Veiten ., 1987; Parxer and Ball, 2005) utilizando la fórmula: $\frac{\text{Peso del órgano X 100}}{\text{Peso corporal}}$

5.5 LONGITUD DE GLÁNDULAS COAGULANTES

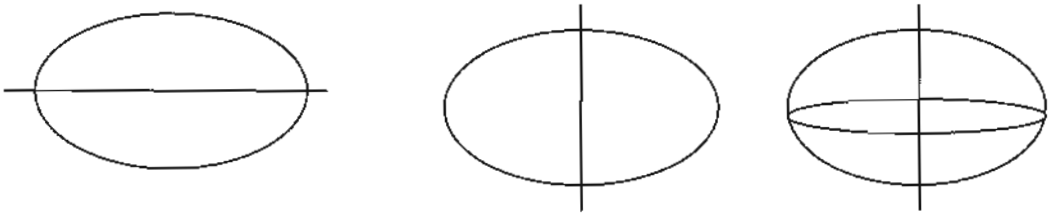
Se midió la longitud de glándula coagulante utilizando un vernier y se compararon con el grupo control

5.6 MEDICIÓN DE LOS DIÁMETROS Y VOLUMEN TESTICULAR

5.6.1 Medición de diámetros o ejes testiculares

Se realizó la medición de los 3 diámetros testiculares (Aceitero *et al.*, 1998):

CRÁNEO-CAUDAL **DORSO-VENTRAL** **MEDIO-LATERAL**



5.6.2 Volumen testicular

A partir de los datos anteriores se calculó el volumen testicular aplicando la siguiente fórmula (Steene, 1989; de Odorico et al., 1998):

$$V=1/3\ \pi rab$$

Donde: r=eje dorso-ventral b= eje medio-lateral

a= eje cráneo-caudal

5.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DE TESTICULO

5.7.1 Análisis histológico cualitativo

Los testículos fueron lavados en alcohol de 70° hasta eliminar el exceso de Bouin. Posteriormente fueron deshidratados con concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 96% y 100%), aclarados en Xileno e incluidos en Paraplast (Oxford, labwere, St. Louis).

Se realizaron cortes transversales, en la región media del testículo de 5 µm. Se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina (H-E). Posteriormente se realizó un análisis cualitativo y morfométrico (cuantitativo) de testículo derecho e izquierdo.

5.7.2 Análisis morfométrico de testículo

Para el análisis morfométrico se utilizó un analizador de imágenes KS 300 Zeiss.

Se midieron 200 túbulos (aproximadamente 20 túbulos de cada animal) de cada grupo cuyo factor de forma fuera cercano a 1 (0.98 a 1). En esos mismos túbulos se cuantificó el número de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas. La identificación de los tipos celulares se realizó siguiendo los siguientes criterios (Fawcett, 1995):

Espermatogonias: Se encuentran en la base del túbulo seminífiero cerca de la lámina basal, con núcleo ovoide o redondo.

Espermatocitos: Células grandes y redondas cuya cromatina se observa de diferentes formas pudiendo llegar a formar racimos.

Espermátides: Se localizan en los niveles superiores del epitelio seminífero pueden ser de forma redonda (espermatocitos tempranos) o alargados (espermatocitos tardíos).

Se calculó el número total de células el cual representa la suma de los tipos celulares antes mencionados. Se determinó la densidad celular por tubulo correspondiente al número de células por milímetro cuadrado del área tubular.

Por último se analizó en el control y en los grupos tratados el número total de túbulos que contenían todos los tipos celulares.

En todos los casos se realizó en análisis tanto en testículo derecho como izquierdo.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los niveles hormonales fueron analizados usando la prueba de U de Mann-Whitney. Los demás parámetros fueron analizados por medio de una ANOVA de una vía. En caso de diferencias significativas para los índices somáticos, diámetros y volumen testicular se aplicó una prueba de Tukey. En el análisis morfométrico se aplicó una prueba de Bonferroni (grupos tratados *vs* control.

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS HORMONAL

6.1.1 Radioinmunoanálisis de Gonadotropinas

No se observan cambios en las concentraciones hormonales de LH y FSH, posterior a la administración de coumestrol (Figura 3A).

6.1.2 Radioinmunoanálsis de Testosterona

En los niveles plasmáticos de testosterona se observa un decremento considerable en las dosis de 12.5 a 400 µg, sin embargo, solo las dosis de 12.5, 25 y 200 µg son diferentes significativamente ($p< 0.05$) cuando se comparan con el control (Figura 3B).

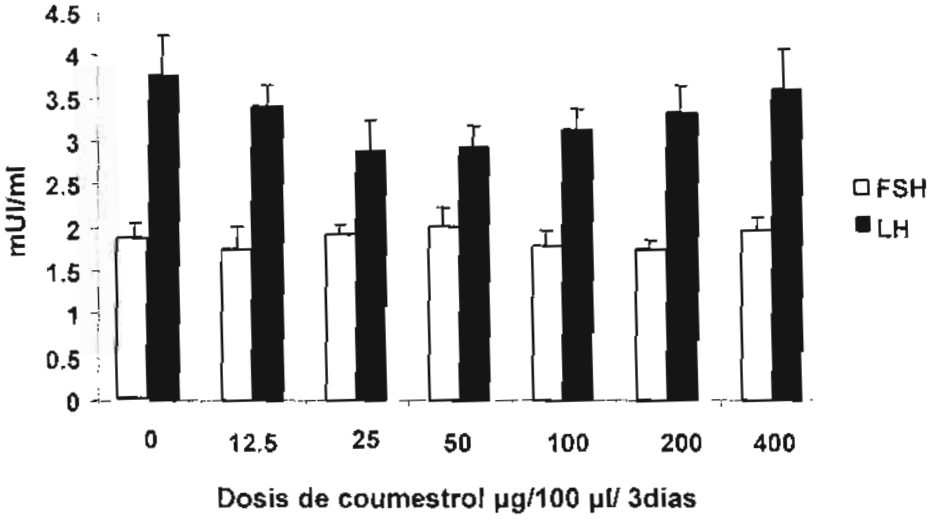


FIGURA 3A

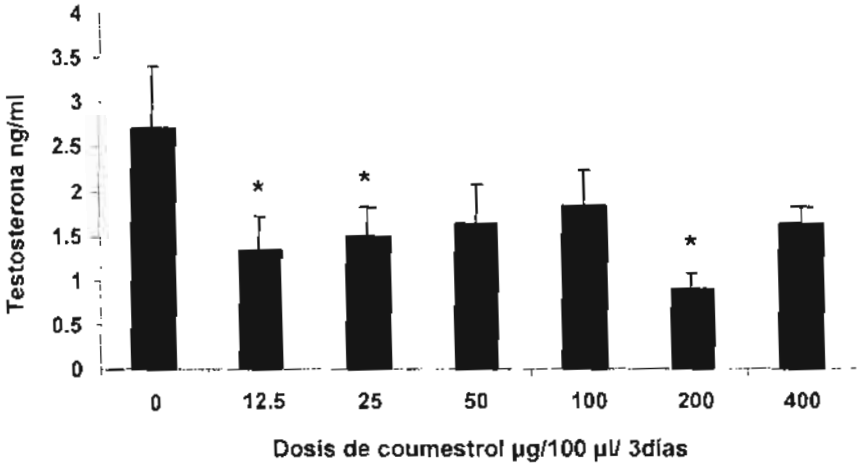


FIGURA 3B

FIGURA 3A: Niveles plasmáticos de gonadotropinas posteriores a la administración de diferentes dosis de coumestrol. No se observan cambios significativos cuando se comparan los tratamientos con el control. **FIGURA 3B**. Niveles plasmáticos de testosterona posteriores a la administración de diferentes dosis de coumestrol. En todas las dosis se observa un decremento de los niveles de testosterona los cuales no son estadísticamente significativos en todas las dosis (*=$p<0.05$, Prueba estadistica U Mann Whitney)

6.2 ÍNDICES SOMÁTICOS

6.2.1 Índice testicular somático

Únicamente la dosis de 12.5 µg de coumestrol fue diferente al grupo control ($p<0.05$) (Figura 4A).

6.2.2 Índice prostato somático

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. (Figura 4B)

6.2.3 Índice vesicular somático

Se observa un incremento significativo en las dosis de 25 µg a la dosis de 400 µg de coumestrol. (Figura 4C)

6.2.4 Índice coagulante somático

Todos los grupos disminuyeron significativamente ($p<0.01$) con relación al grupo control. (Figura 4D)

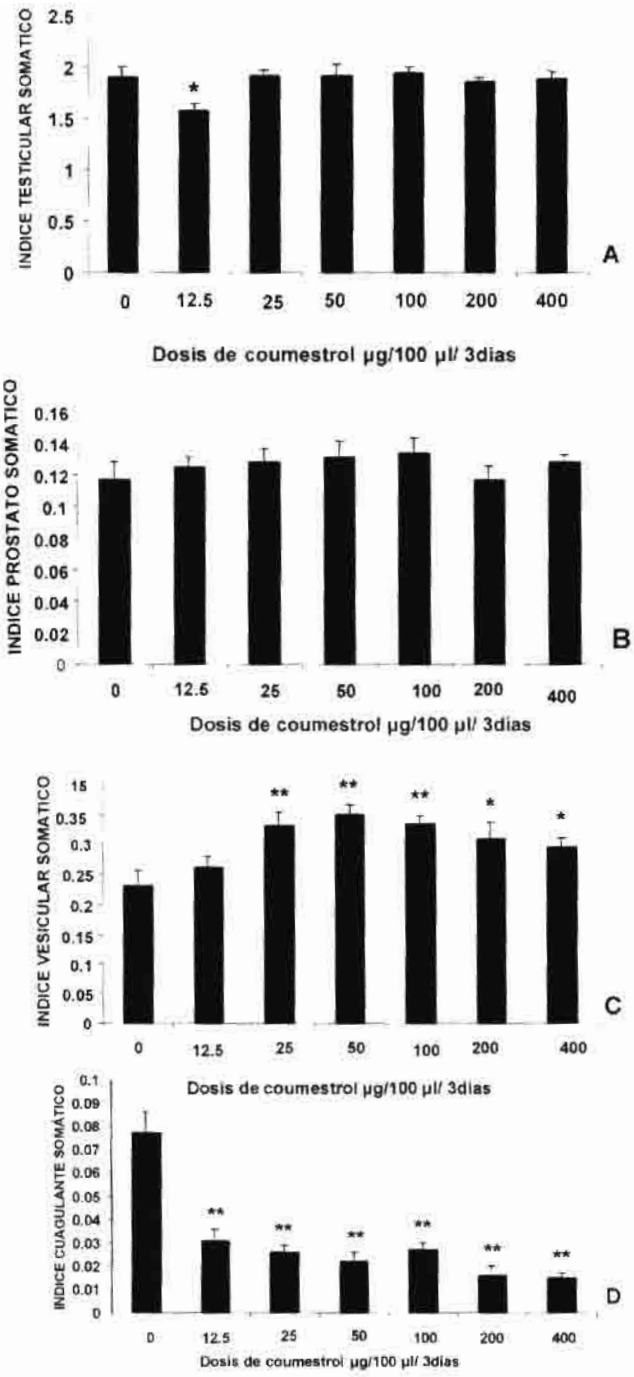


Figura 4: Índices somáticos posteriores a la administración de coumestrol. A Índice testicular somático, se observa un decremento en la dosis de 12.5 µg. B Índice Prostato Somático, no se observan cambios en ninguna dosis. C Índice Vesicular Somático, se observa un incremento significativo a partir de la dosis de 25 µg. D Índice Coagulante Somático, se observa un decremento significativo en todas las dosis administradas. (ANOVA seguida de la prueba de Tukey, *p<0.05, **p<0.01)

6.3 LONGITUD DE GLÁNDULAS COAGULANTES

En todos los grupos se presentó un decremento significativo en el tamaño de la glándula coagulante ($p < 0.01$) con relación al grupo control (Figura 5).

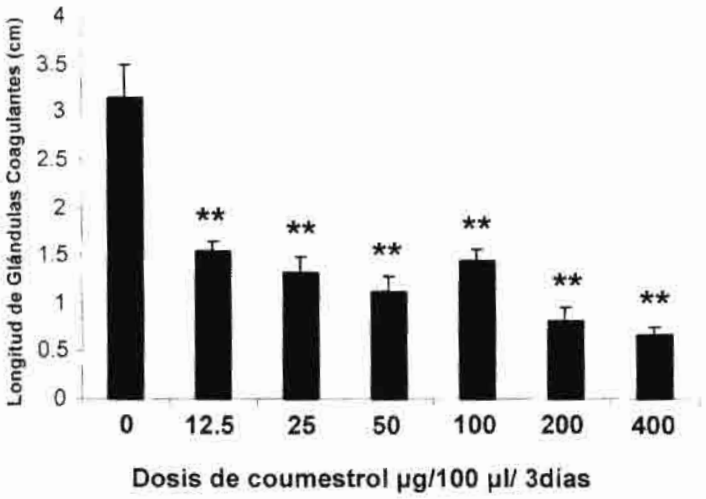


Figura 5. Longitud de Glándulas Coagulantes posterior a la administración de coumestrol. Se observa un decremento en la longitud a todas las dosis administradas (ANOVA seguida por la prueba de Tukey, **p<0.01)

6.4 MEDICIÓN DE DIÁMETROS Y VOLUMEN TESTICULAR

6.4.1 Diámetros o ejes testiculares

Con relación a los ejes testiculares, sólo en el testículo derecho se observan diferencias, el testículo izquierdo no presenta modificaciones en ninguno de los ejes. En el testículo derecho en el eje cráneo–caudal sólo la dosis de 12.5 µg de coumestrol fue significativamente menor que su respectivo control (Figura 6A). En el eje antero-posterior se observó un aumento significativo en las dosis de 200 y 400 µg de coumestrol con respecto a su control (Figura 6B); por último en el eje medio lateral las dosis de 25, 50, 100 y 200 µg de coumestrol fueron significativamente menores que su respectivo control (Figura 6C).

6.4.2 Volumen testicular

En el testículo izquierdo no se observan cambios en el volumen testicular en ninguna de las dosis empleadas. En el testículo derecho se observa un decremento significativo ($p<0.01$) en todas las dosis (Figura 6D).

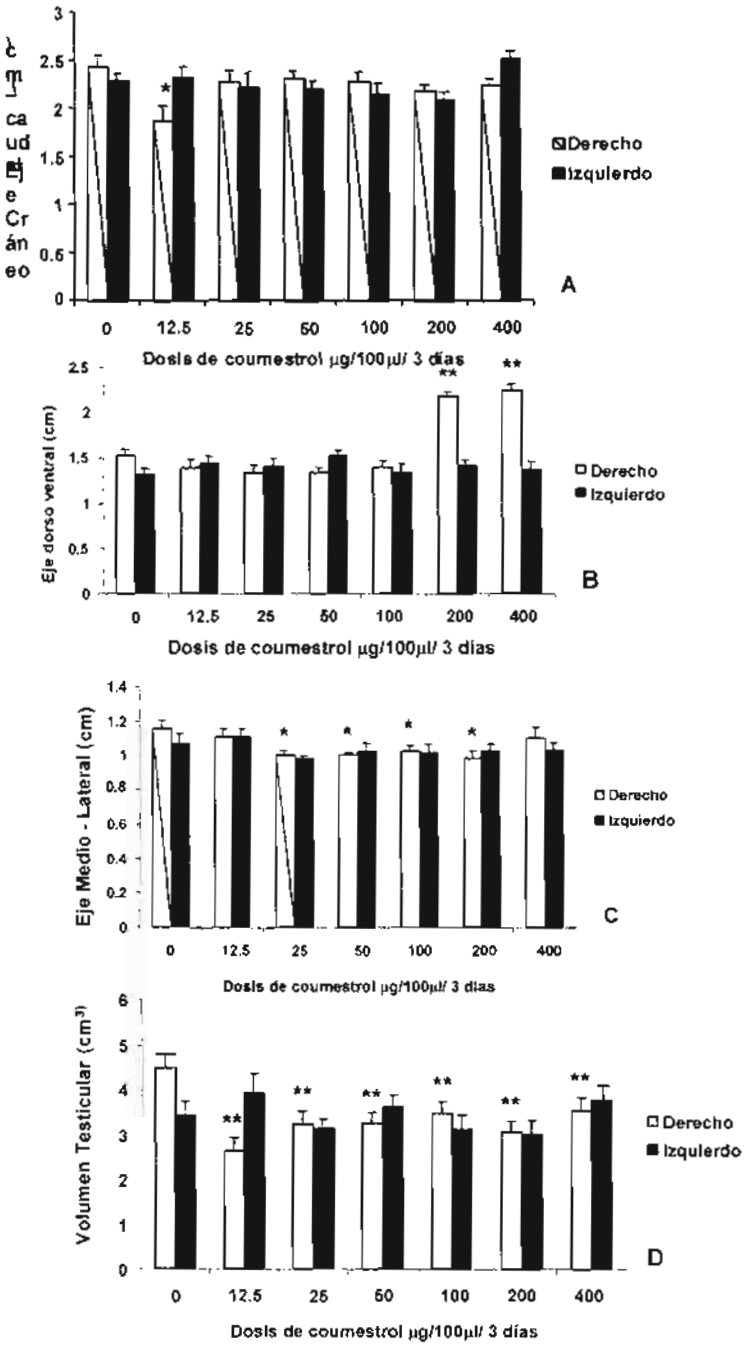


Figura 6. Ejes testiculares y volumen testicular posterior a la administración de coumestrol. A Eje cráneo-caudal. Se observa un decremento en la dosis de 12.5 µg en el testículo derecho. B Eje antero-posterior. Se observa un incremento en las dosis de 200 y 400 µg en el testículo derecho. C Eje medio lateral. Se observa un decremento en las dosis de 25 a 200 µg en testículo derecho. D Volumen testicular. Se observa un decremento en todas las dosis empleadas en el testículo derecho. (ANOVA seguida por la prueba de Tukey, **p<0.01)

6. 5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO DE TESTÍCULO

6.5 1 Análisis histológico cualitativo

Nuestros resultados muestran que el coumestrol induce cambios morfológicos en el testículo, sin embargo, la respuesta más clara se observa en el testículo derecho. Es importante señalar que en algunos de los parámetros analizados no se observan cambios en el testículo izquierdo con ninguna de las dosis empleadas.

En contraste, en el testículo derecho se observa un incremento en el número de túbulos que presentan un "arresto" de la espermatogénesis, principalmente en la fase VII del ciclo del epitelio seminífero, el cual se caracteriza por espermatogonias A1, espermatocitos preleptoténicos, espermatocitos paquiténicos y espermátides. Algunos túbulos seminíferos presentan ausencia de algún tipo celular en particular (Figura 7).

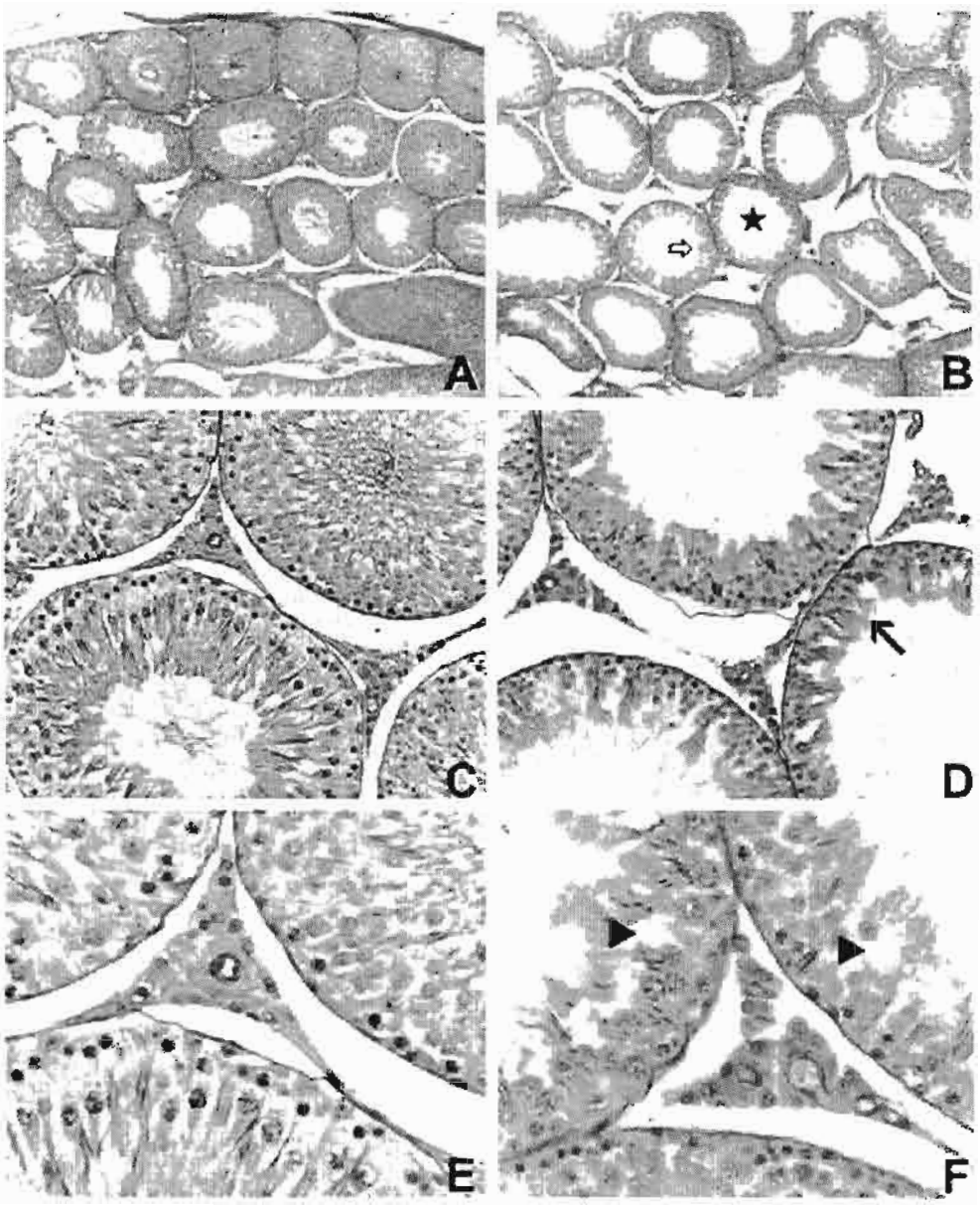


Figura 7. Fotomicrografías de cortes transversales de túbulos seminíferos de rata. Las imágenes **A, C y E** corresponden al grupo control, los cuales no presentan diferencias detectables entre testículo derecho e izquierdo, siendo similares las imágenes Las imágenes **B, D y F** corresponden al testículo derecho de animales tratados. En el primer nivel de amplificación (**A y B**, 100X) los testículos tratados con coumestrol muestran un incremento en el área luminal y pobre desarrollo del epitelio A una ampliación de 200X (**C y D**) se observa heterogeneidad de tipos y asociaciones celulares. Al nivel más alto de amplificación (400X, **E y F**) se observa en los animales tratados, una inhibición de las fases del epitelio seminífero con una alta proporción de asociaciones celulares correspondientes a las etapas VII y VIII del ciclo En estos mismos animales, se observa un incremento de los espacios intercelulares (Tarragó-Castellanos *et al.*, 2006).

6.5.2 Análisis morfométrico

En los animales control se observó que existen diferencias entre el testículo derecho e izquierdo del mismo animal, siendo éstas diferencias significativas en algunos casos cuando se comparan entre sí. En el testículo izquierdo se observa que, tanto el volumen testicular, el número total de células, la densidad celular, el número de espermatocitos y espermátides son significativamente menores que en el testículo derecho. Sin embargo, se observan valores más altos en el área tubular, espermatogonias y espermátides tempranas (Tabla 1).

Parámetros morfométricos	Testículo derecho	Testículo izquierdo
Volumen (cm^3)	4.49 ± 0.32	3.27 ± 0.36 *
Número total de células	441 ± 12.05	373.75 ± 15.19 *
Área tubular(mm^2)	11.22 ± 0.26	12.08 ± 0.33
Densidad celular	5.869 ±0.91	3.492±0.38 *
Espermatogonias (número)	67.48 ± 1.27	75.11 ± 1.86 *
Espermatocitos (número)	228.05 ± 6.81	157.62 ± 9.98 *
Espermátides tempranas (número)	29.35 ± 3.21	45.62 ± 4.70 *
Espermátides tardías (número)	114.61 ± 3.06	92.36 ± 4.48 *

Tabla 1. Comparación de parámetros morfométricos entre el testículo derecho e izquierdo del grupo control. ANOVA seguida de Duncan y Bonferroni *$p<0.05$. Se expresa el promedio ± ee.

6.5.2.1 *Área tubular*

Tanto los testículos derechos como izquierdos fueron comparados con su respectivo control. Con relación al área tubular, ésta se incrementó significativamente en el testículo derecho en todas las dosis empleadas. En el testículo izquierdo sólo se observa un incremento significativo en las dosis de 25 y 50 µg de coumestrol y un decremento únicamente en las dosis de 400 µg de coumestrol (Figura 8).

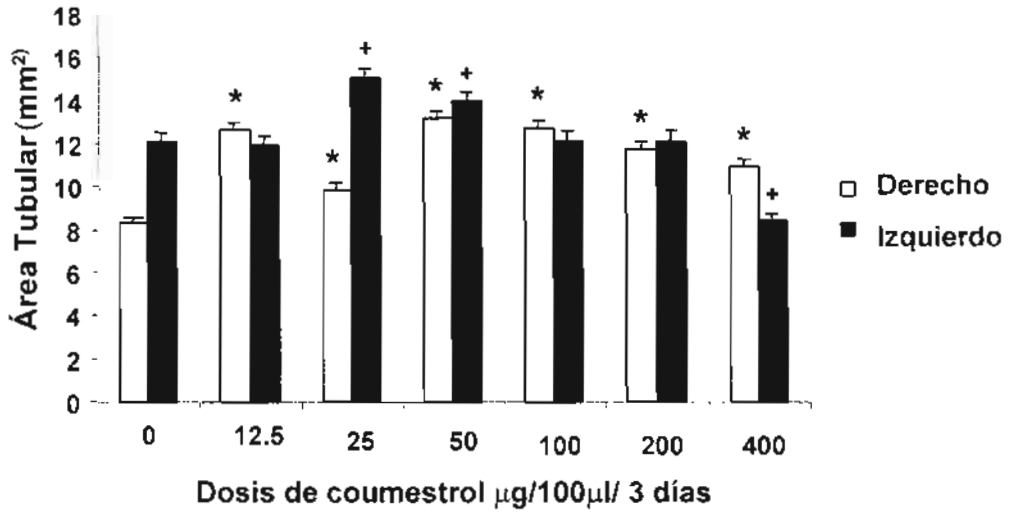


Figura 8. Área tubular. Se observa un incremento del área tubular en el testículo derecho en todas las dosis administradas, en el testículo izquierdo se presenta esta respuesta únicamente de las dosis de 25, 50 y 400 µg de coumestrol (ANOVA seguida por Bonferroni *vs* Control, *,$^{+}$p<0.05).

6.5.2.2. Conteo de tipos celulares

El coumestrol decrece significativamente el número de espermatogonias y espermatocitos en el testículo derecho en todas las dosis utilizadas. En el caso de las espermatogonias, este decremento se presenta en el testículo derecho en todas las dosis empleadas en el testículo derecho, en el testículo izquierdo sólo en la dosis de 25 µg de coumestrol no se presenta esta respuesta (Figura 9A). Al igual que en las espermatogonias, los espermatocitos presentan un decremento en testículo derecho en todas las dosis administradas. En el testículo izquierdo sólo se presenta este efecto en las dosis de 12.5, 25 y 50 µg de coumestrol (Figura 9B). El promedio de decremento de espermatogonias es de 18.5% y de espermatocitos es del 43% con respecto al control.

El efecto del coumestrol en el número de espermátides tempranas y tardías fue menor. En el caso de las espermátides tempranas se encontraron diferencias significativas con relación al control en las dosis de 50, 100, 200 y 400 µg de coumestrol en el testiculo derecho; en el testículo izquierdo sólo se observan diferencias significativas en los grupos de 200 y 400 µg de coumestrol (Figura 9C). Con relación a las espermátides tardías en el testículo derecho se observan diferencias significativas en las dosis de 12.5, 50 y 400 µg de coumestrol, en el testículo izquierdo sólo se presentan diferencias en las dosis de 50 y 200 µg de coumestrol (Figura 9D).

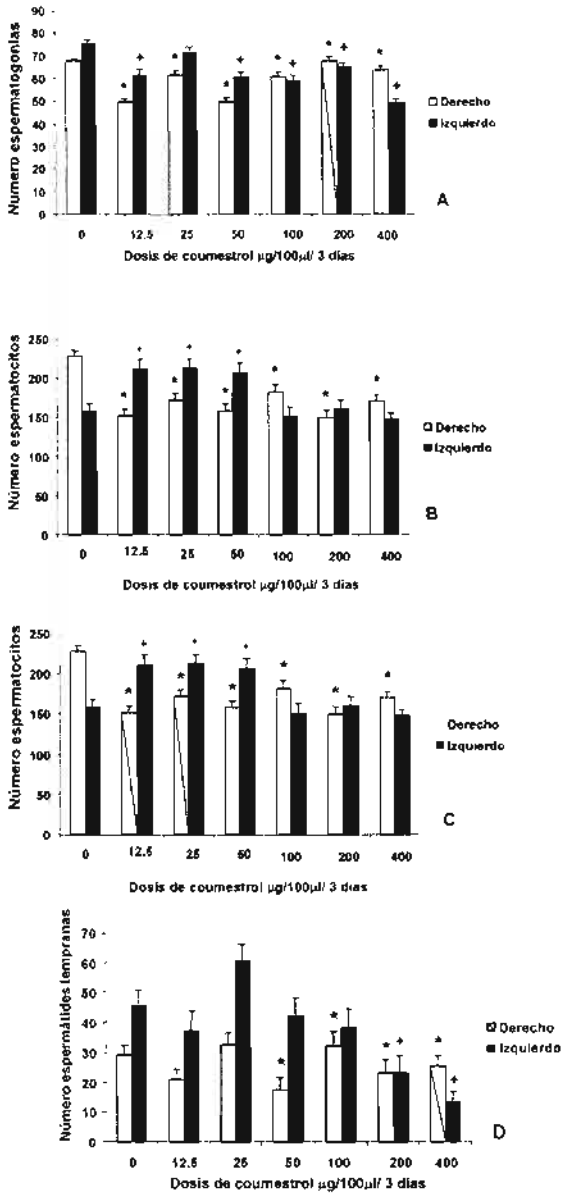


Figura 9. Conteo Celular A Disminución significativa de espermatogonias en ambos testículos en las dosis de 12.5 y 50 a 400 µg, en la dosis de 25 µg únicamente en testículo derecho. B. Disminución significativa de espermatocitos en ambos testículos en las dosis de 12 5 a 50 µg y solo en el derecho en las dosis de 100 a 400 µg. C. Disminución significativa de espermátidas tempranas en el testículo derecho en las dosis de 50 a 100 µg y en ambos testículos en dosis de 200 y 400 µg. D Disminución significativa de espermátides tardías en el testículo derecho en las dosis de 12 5, 50 y 400 µg en el testículo izquierdo se observó un incremento significativo en la dosis de 50 µg y un decremento significativo en la dosis de 400 µg. (ANOVA seguida por Bonferroni vs Control, *, $^{+}p<0.05$)

6.5.2.3 *Número total de células*

Con relación al número total de células, se observan diferencias significativas importantes entre los testículos derecho e izquierdo. En el testículo derecho, se observa un decremento significativo con relación a su control desde la dosis más baja de coumestrol. Sin embargo, sólo en la dosis más alta de coumestrol se observa este efecto en el testículo izquierdo (Figura 10A).

6.5.2.4 Densidad celular

Con relación a la densidad celular se encontró que en el testículo derecho hay una disminución significativa en todas las dosis, mientras que en el testículo izquierdo no hubo cambios significativos (Figura 10B).

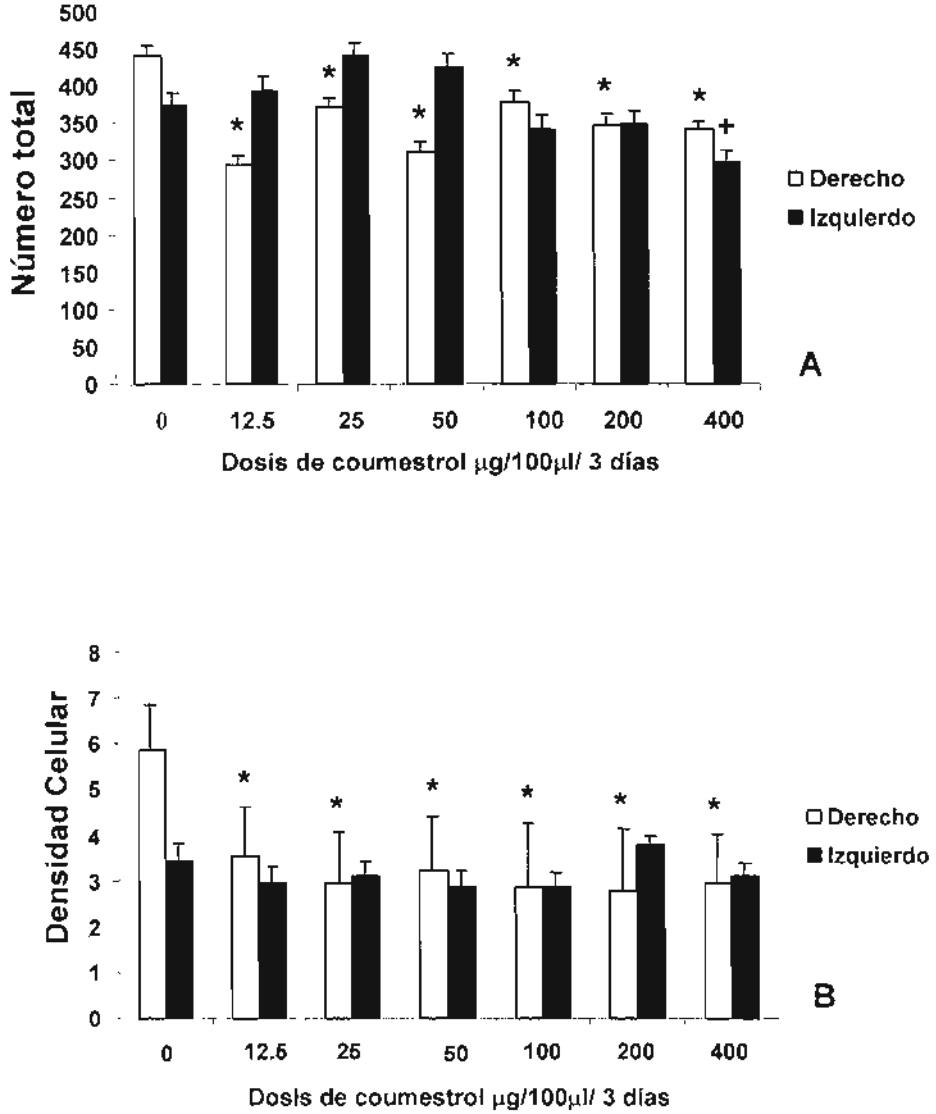


Figura 10. Número total de células y densidad celular posterior a la administración de coumestrol. **A**. Se observa una disminución significativa en el número total de células en el testículo derecho y sólo en el izquierdo en la dosis más alta. **B**. La densidad celular disminuyó significativamente en todas las dosis empleadas en el testículo derecho, en el izquierdo no se observó ningún efecto. (ANOVA seguida por Bonferroni *vs* Control, $^{*,+}p<0.05$).

6.5.2.5 Túbulos que contienen todos los tipos celulares

Se observa un decremento en el número de túbulos que contienen todos los tipos celulares. Este efecto es observado tanto en el testículo derecho como en el izquierdo, efecto que se presenta desde la dosis más baja, notándose un decremento sistemático (Figura 11).

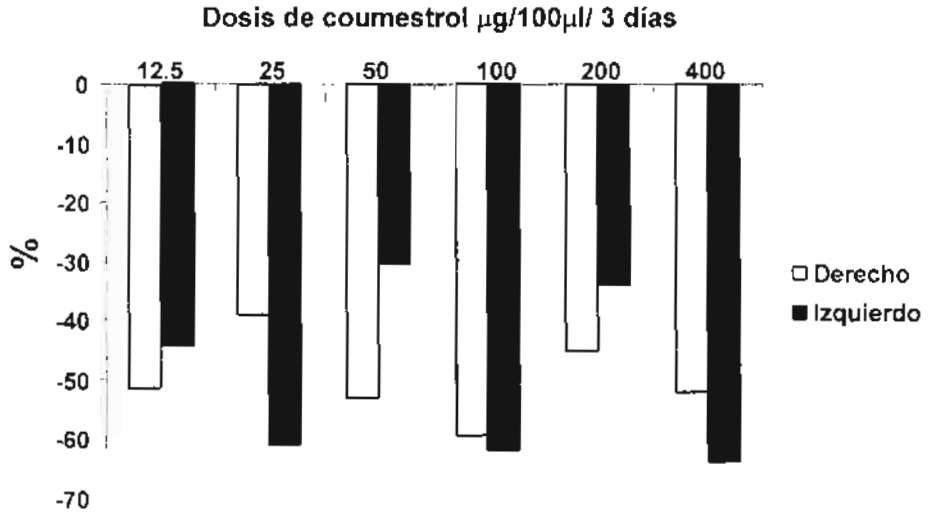


Figura 11. % de túbulos con todos los tipos celulares (espermatogonias, espermatocitos, espermátides tempranas, espermátides tardías y espermatozoides). Se observa un decremento en el número de túbulos que presentan todos los tipos celulares con respecto al control.

7. DISCUSIÓN

La hipótesis propuesta en el presente trabajo se cumple parcialmente ya que los resultados obtenidos muestran que el coumestrol actúa principalmente a nivel periférico modificando los niveles hormonales de testosterona así como induciendo cambios en las glándulas sexuales accesorias y en testículo. Sin embargo a nivel central la hipótesis propuesta no se cumple ya que las dosis de coumestrol administradas no modifican los niveles de gonadotropinas. El efecto del coumestrol no induce un efecto "clásico" como el estradiol al no modificar los niveles de gonadotropinas.

En años recientes, se ha incrementado el interés por el estudio de los disruptores endocrinos, similares a estrógenos, a los cuales pueden estar expuestos los machos ya sea porque se encuentren en el ambiente (aire y agua) o porque sean ingeridos en la dieta, independientemente del origen de estos se ha visto que tienen la capacidad inducir un deterioro en la reproducción disminuyendo la fertilidad en ambos sexos.

Dada la facilidad que tienen los estrógenos para cruzar barreras y acceder a diferentes tejidos, el llamado efecto estrogénico se refiere a una amplia gama de respuestas fisiológicas que se manifiestan ante la presencia o la administración de estrógenos. Para el caso de los fitoestrógenos y en particular del coumestrol, se han reportado efectos que semejan en gran medida la acción de los estrógenos. Sin embargo, dadas las diferentes farmacocinéticas cabe la posibilidad de que los fitoestrógenos y en particular el coumestrol, no reproduzcan ciento por ciento la

gama de efectos que los estrógenos producen. Los resultados del presente trabajo indican que este es el caso al no presentar ningún efecto a nivel hipofisiario. El coumestrol presenta un marcado efecto estrogénico pero limitado a la periferia, mientras efectos centrales, como la regulación de la liberación de gonadotropinas parece no estar afectada.

El efecto inhibitorio que ejerce el estradiol en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, ha sido ampliamente estudiado (Krester *et al.*, 1983). La acción inhibitoria del estradiol, tiene como resultado final, el decremento de los niveles plasmáticos de testosterona, este efecto, se debe principalmente a la inhibición de la liberación de gonadotropinas o probablemente a una acción directa sobre el testículo.

Diversos estudios han demostrado que dosis de estrógenos en el rango de microgramos son capaces de suprimir tanto LH como FSH (Kulin y Reiter, 1972; Sherins y Loriaux, 1973; Steewart-Bentley *et al.*, 1974). Asimismo, se ha propuesto que la administración de estradiol decrece la amplitud de los episodios secretores, sin tener efectos significativos en su frecuencia (Santen, 1975). Nuestros resultados sin embargo, no concuerdan con estos estudios, al observar que la administración sistémica de coumestrol no induce cambios en los niveles de gonadotropinas, sugiriendo la posibilidad de que los fitoestrógenos no tengan la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. En este sentido, nuestros resultados son similares a los reportados en ratas Sprague-Dawley sometidas a dietas ricas en soya (Weber *et al.*, 2001), en las cuales encuentran un decremento en los niveles plasmáticos de testosterona, sin observarse cambios en los niveles de gonadotropinas.

De manera general, se ha reportado que los fitoestrógenos se unen a receptores α y β, pero preferencialmente al subtipo β (Casanova *et al.*, 1999). Estudios de inmunolocalización de ambos subtipos de receptores, muestran que las células secretoras de la adenohipófisis presentan principalmente receptores α, no presentándose el subtipo β (Pelletier *et al.*, 2000). La ausencia de receptores β a nivel hipofisiario nos permite explicar porque el coumestrol no indujo ningún cambio en los niveles de gonadotropinas, ya que éste se une principalmente a receptores tipo β.

En todos los mamíferos el testículo tiene dos funciones principales: la síntesis de esteroides y la producción de espermatozoides. Para llevar a cabo el desarrollo y funcionamiento normal del testículo, se requiere el estímulo de las gonadotropinas y la síntesis de testosterona, cuyos efectos son modulados localmente por factores producidos en el mismo testículo, incluyendo los estrógenos (Carreau *et al.*, 2003). La presencia de genes relacionados con la aromatización a nivel testicular en células de Leydig, Sertoli y germinales, confirma la propuesta de que los estrógenos son indispensables para la fertilidad en el macho (Carreau *et al.*, 2004). La administración de coumestrol en los niveles de testosterona, es posible que actúe a nivel de testículo, a través de alguno de los mismos mecanismos propuestos para el estradiol. Sholeton y col. (1975) sugieren que la producción de testosterona puede ser alterada por estrógenos a dos niveles: 1. Supresión de la liberación de LH hipofisiaria y 2. Por un efecto directo de los estrógenos a nivel testicular para la producción de testosterona.

Como se mencionó anteriormente la primera propuesta de Sholeton queda descartada al no encontrarse ningún efecto sobre los niveles de gonadotropinas por lo que suponemos que el coumestrol debe actuar directamente sobre testículo modificando la producción de testosterona.

Diversos estudios han demostrado un decremento en la producción de testosterona en animales tratados con estrógenos, sin presentarse un decremento en los niveles séricos de LH (Tchoiakian *et al.*, 1974; Sholeton *et al.*, 1975). Se ha visto que el estradiol reduce el número de sitios de unión de hCG en las células de Leydig (Saez *et al.*, 1978). Además, es importante señalar que las células de Leydig pueden expresar receptores de estrógenos de los subtipos α y β, además de tener la capacidad de convertir la testosterona a 17 β estradiol (Akingbemi *et al.*, 2003).

Kalla y cols. (1980), propusieron que el efecto *in vivo* del estradiol puede darse directamente en testículo, interfiriendo en la función de las células de Leydig, induciendo una aparente reducción en la actividad de la 17-20 desmolasa. Esto se traduce en que la biosíntesis de hormonas esteroides es "detenida", quedando una mayor cantidad de 17 α hidroxiprogesterona al no poder continuar la vía metabólica hacia la biosíntesis de andrógenos. También es posible que el coumestrol presente un efecto similar al reportado en ratas y humanos (Krazeisen *et al.*, 2002), en el cual se bloquea la actividad de 17 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β - HSD). Éste es un paso limitante en el metabolismo de andrógenos a estrógenos, y puede ser inhibido por diversos fitoestrógenos tales como zeralonona, coumestrol, quercetina y biochanina A.

Abney (1999) sugiere que el estradiol puede inhibir la esteroidogénesis pro mecanismos que no involucran necesariamente los receptores de estrógenos,.

A nivel del aparato reproductor masculino, no sólo el testículo presenta receptores de estrógenos, las glándulas sexuales accesorias son también órganos blanco de las hormonas esteroides (Bodker *et al.*, 1999; Mäkelä *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2004). Diversos estudios reportan la producción de estrógenos en el testículo así como en tejido reproductivo accesorio, además, se ha descrito la presencia de receptores de estrógenos, tanto α como β en testículo, próstata, conducto deferente y pene (cuerpo cavernoso) (Bodker *et al.*, 1999; Mäkelä *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2004).

Otro efecto importante del estradiol en órganos de la periferia, es el efecto que tiene sobre la función y morfología de glándulas accesorias del aparato reproductor masculino. Kalla y col. (1980) no encuentran cambios inducidos por el efecto del tratamiento agudo con estradiol en glándulas sexuales accesorias. Sin embargo, Oko y Hruduka (1984), reportan una disminución significativa en el peso de la próstata. Es importante considerar que en este último trabajo realizan una administración crónica durante 30 días de estradiol, por lo que es probable que el tratamiento prolongado produzca este tipo de efectos sobre la próstata. Nuestros resultados coinciden con los reportados con una administración aguda de estradiol al no encontrarse ningún cambio en el índice próstata-somático.

Con relación a las glándulas vesiculares, los reportes que se tienen son variables ya que dependen del tratamiento y edad en el que éstos se apliquen. Kalla y col. (1980), trabajando con animales adultos a los que les aplicó estradiol por tres

días, reportan que el peso de las vesículas permaneció sin cambio; Oko y Hruduka (1984), indican al igual que en el caso de la próstata, una reducción significativa en el peso de las glándulas vesiculares.

Aguilar y col. (1987), encuentran en animales estrogenizados neonatalmente una atrofia tanto de testículo como de próstata y un incremento en el peso de las vesículas seminales. La disminución tanto a nivel testicular como prostático, proponen se deba, a que estos animales presentan una marcada disminución de los niveles plasmáticos de testosterona; sin embargo, sugieren que, el incremento en las glándulas vesiculares sea probablemente debida a un efecto de los estrógenos, los cuales pueden actuar directamente en el crecimiento vesicular.

Observamos un incremento en el peso glandular de vesículas seminales y glándula coagulante a partir de la dosis de 25 µg de coumestrol. Es muy probable que en dosis de 25 a 400 µg de coumestrol, se pueda dar también la unión al receptor α de estrógenos, induciéndose el efecto propuesto por Aguilar y col. (1987).

El efecto del coumestrol en la glándula coagulante es muy claro, al presentar cambios visibles en el tamaño y en el peso. Se considera que ésta glándula es sensible a los efectos estrogénicos (Holterhus *et al.*, 1993), por lo que el coumestrol está induciendo un efecto estrogénico. Observamos un incremento en el peso de las glándulas vesiculares, el cual es inverso al decremento que se presenta en peso y tamaño de las glándulas coagulantes. Es probable que en las primeras, el coumestrol pueda actuar directamente induciendo un incremento y en las glándulas coagulantes induzca una atrofia.

Algunos trabajos realizados en animales adultos (Kalla *et al.*, 1980; Oko y Hruduka, 1984) o en animales neonatos (Bellido *et al.*, 1985) tratados con estradiol, reportan que este tipo de tratamiento causa una significativa reducción en el peso y tamaño de los testículos. En el presente trabajo en las dosis utilizadas de coumestrol, únicamente la dosis de 12.5 µg presentó el efecto antes mencionado, ya que en el resto de las dosis utilizadas no hubo ningún cambio.

El análisis morfológico del testículo muestra una clara lateralización. El testículo izquierdo no muestra diferencias significativas al compararlas con su respectivo control; el testículo derecho muestra cambios morfológicos similares a los que se han reportado en la literatura para el estradiol (Steinberger, 1971; Van der Malen *et al.*, 1981). Efectos similares de lateralización han sido reportados, posterior a la administración de benzoato de estradiol a ratas neonatas, en las cuales, se observan únicamente modificaciones en el testículo derecho (Aceitero *et al.*, 1998).

Se ha sugerido que el testículo derecho es mucho más sensible a la estimulación farmacológica debido a diferencias en la irrigación (Gerendai y Motta, 1990) e inervación (Gerendai y Halasz, 1977). Reportes recientes indican una clara asimetría en la inervación testicular del nervio vago, la cual se propone, es influenciada por la acción de gonadotropinas en la síntesis de esteroides (Gerendai *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado en el hombre, que la administración de LH incrementa las concentraciones de testosterona en la vena testicular derecha (Turner *et al.*, 1990). Es muy posible, que el coumestrol, ejerza su actividad estrogénica en los niveles plasmáticos de testosterona actuando principalmente en el testículo derecho cuando se administran tratamientos agudos como el del presente trabajo.

Las alteraciones morfológicas relacionadas con alteraciones o cambios en la espermatogénesis y cambios en el diámetro tubular observados en el presente estudio, han sido también observadas en ratas después de la administración de estradiol (Aceitero *et al.*, 1998), encontrándose proliferación de solo algunos subtipos celulares en los túbulos seminíferos. En el presente estudio, nosotros encontramos un incremento en el número de túbulos en estadio VII del ciclo del epitelio seminífero, así como un aumento en el número de espermatogonias AI. Un deterioro similar en la espermatogénesis al encontrado en el presente estudio, ha sido reportado posterior a la administración de benzoato de estradiol (Brown-Grant *et al.*, 1975). En 1988, Kula encontró que la administración de benzoato de estradiol pero no de testosterona, en fetos de ratas en el periodo gestacional del día 5 al 11, induce un incremento en número de espermatogonias en el túbulo seminífero. Sin embargo, el mismo tratamiento, es incapaz de inducir el mismo efecto cuando la administración se hace neonatal, en los días 5 al 15 de edad. Estos resultados sugieren que el efecto del estradiol depende no sólo de la dosis empleada, sino también del tiempo en el desarrollo en el cual se administra (Kula *et al.*, 2001).

En estudios realizados en el epitelio seminífero, en las células que conforman el estadio VII del epitelio seminífero, como son los espermatocitos paquiténicos, hacia las espermátides redondas que se encuentran ya en el estadio VIII, han encontrado la presencia de receptores tipo β RNAm y proteínas (enzimas); la presencia tanto de aromatasas como de receptores indica que las células germinales son sitios de síntesis y recepción de estradiol en el testículo de rata adulto (Tsai Morris *et al.*, 1985; Nitta *et al.*, 1993; Van Pelt *et al.*, 1999). Por otro lado, Meistrich y

col. (2000) y Shetty y col. (2004), han encontrado que al someter ratas machos a radiación, les induce azospermia, condición que puede ser revertida con la administración de estradiol, induciendo un restablecimiento de la espermatogénesis. Nuestros resultados sugieren un efecto antiestrogénico del coumestrol, reflejado por una inhibición en la proliferación de espematogonias.

Chieffi y Varriale (2004), encontraron que la administración de estradiol en lagartijas, estimula la presencia de espermatogonias, ejerciendo su efecto a través de receptores β a estrógenos. Song y Gutzei (2003) reportan que bajas dosis de estradiol estimulan la proliferación de cultivos de espermatogonias, por el contrario, las dosis altas de estradiol ejercen un efecto inhibitorio.

Es probable, que los efectos que tiene el coumestrol sobre la espermatogénesis, sean mediados por los receptores β a estrógenos, ya que estos se encuentran presentes como únicos receptores nucleares a estradiol en espermatogonias tipo A y B, así como en espermatocitos paquiténicos y espermátides redondas (O´Donnell *et al.*, 2001).

Al observarse un "arresto" de la espermatogénesis se sugiere un proceso apoptótico en los grupos experimentales. La presencia de células apoptóticas en el testículo, ha sido reportada posterior a la administración de dietiletilbestrol, el cual induce una regresión testicular afectando la proliferación celular de espermatogonias primarias y espermatocitos (Nonclercq *et al.*, 1996). Un incremento en los procesos apoptóticos en células germinales, ha sido reportado posterior a la administración de benzoato de estradiol en ratas (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1977) y a la administración de dietiletilbestrol el cual induce la degeneración celular por

mecanismos apoptóticos en espermatocitos paquiténicos y espermátides redondas en el estadio VIII lo cual se restablece al administrar testosterona (O´Donnel *et al.*, 1994).

Sin embargo, el efecto sobre la espermatogénesis puede ser debido a la disminución de testoserona inducida por el tratamiento. Se ha descrito en rata que los estadios VII-VIII del ciclo del epitelio seminífero son andrógeno dependientes, la disminución de testosterona induce la muerte de células germinales principalmente en estos estadios en células meióticas y postmeióticas (Sharpe et al., 1992; Barlett *et al.*, 1986). Como consecuencia de las alteraciones antes mencionadas se observa un decremento en el número total de células y de la densidad celular. El "arresto" en la espermatogénesis, se corrobora por la disminución de túbulos que presentan todos los tipos celulares.

En algunos de los parámetros analizados se observa que el coumestrol induce respuestas sólo a dosis bajas o dosis bajas y altas. Este tipo de respuestas en las que dosis bajas inducen una respuesta la cual no se observa a dosis intermedias se denomina hormesis, en el cual la estimulación de dosis bajas y dosis altas pueden dar una respuesta similar o contraria. Es decir que la respuesta a un compuesto puede ser de tipo monotónica (dosis=respuesta) o no monotónica (conocida como respuesta en "U") (Calabress y Baldwin, 2003), en el caso del coumestrol pareciera que algunas respuestas son de tipo no monotónico.

Las respuestas que induce el coumestrol dependen no sólo del órgano que se esté considerando sino también de las dosis. Si bien, suponemos que la mayoría de

los efectos que estamos analizando dependen de la unión de los fitoestrógenos a los receptores de estradiol, la expresión de los genes que unen al receptor de estrógenos depende de promotores y del tipo de receptor con el cual se unió el ligando (Klinge, 2001). Para que los receptores intracelulares a estrógenos lleven a cabo su unión a los genes específicos, requieren como prerrequisito el reclutamiento de moléculas denominadas coactivadores de los receptores ERα y ERβ, este tipo de coactivadores son determinantes importantes para la acción estrogénica en tejidos específicos, mostrando además, un perfil de expresión específico en cada tejido (Tremblay y Ciguere, 2002).

Los ligandos que se unen a los receptores de estrógenos regulan el reclutamiento de coactivadores al inducir distintas conformaciones de la unión al ligando y activar los dominios de los receptores de estrógenos (Paige *et al.*, 1999). Hall y Korach (2002) en estudios realizados con fitoestrógenos sugieren que los cambios inducidos por diferentes fitoestrógenos pueden deberse a la transactivación de los receptores de estrógenos α y β. También se ha observado que en algunos tejidos el máximo reclutamiento de coactivadores de los receptores de estrógenos β se presenta a bajas dosis de coumestrol y genisteina, aunque la eficacia es menor al compararla con el estímulo de estradiol a receptores tipo α (Hall y Korach, 2002). Mueller y colaboradores (2004), proponen que el riesgo o beneficio de los efectos estrogénicos o antiestrogénicos depende fuertemente del órgano blanco, tiempo y nivel o dosis de exposición.

De manera general podemos concluir que el coumestrol tiene un efecto estrogénico limitado a órganos periféricos sin afectar a nivel central la regulación de

gonadotropinas. Quedan en las perspectivas inmediatas, el análisis de la conducta sexual y la fertilidad ante diferentes dosis de coumestrol y la realización de nuevos estudios a nivel neuroendocrino y testicular.

8. LITERATURA CITADA

Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function. A review. Steroids 64:610-617.

Aceitero J, Llanero M, Parrado E, López–Beltrán A. 1998. Neonatal exposure of male rats to estradiol benzoate causes rete testis dilation and backflow impairment of spermatogenesis. Anat Rec 252:17-33

Adams N.R. 1990. Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogen. Aust Vet J 67:197-201.

Adams NR. 1995 a. Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe. Proc Soc Exp Biol Med 208:87-91.

Adams NR. 1995 b. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. J Anim Sci 73:1509-1515.

Aguilar E, Bellido C, Aguilar R, Pinilla L, Tejero A, Galaz CF. 1987. Mechanism in the production of prepuberal reproductive defects in neonatal estrogenized male rats. Andrologia 19:22-31.

Akingbemi BT, Ge R, Rosenfold CS, Newton LG, Hardy DO, Caterall JF, Lubahan DB, Korach KS, Hardy MP. 2003. Estrogen receptor-(alpha) gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. Endocrinology 144:84-93.

Aldecreutz H, Hocherstedt K, Bannwart C, Bloigy S, Hamalainene KE, Tatses T, Ollus A. 1987. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens

on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens on sex hormone binding globulin (SHBG). J Steroid Biochem 27:1135-1144.

Aldecreutz H, Gorbach S, Goldin B. 1992. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. Lancet 339:1233.

Aldecreutz H, Goldin BR., Gorbach SL., Hölcerstedt KAV, Watanabe S. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. J Nutr 125:757-770.

Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. 1995. Orally dosed genistein from soy and prevention of cancerous bone loss in two ovariectomized rat models. J Nutr 125:799.

Arjmandi BA, Alekel L, Hollis BW, Anmin D, Stacewicz-Sapuntzakis M. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. J Nutr 126:161-167.

Ashby I, Odum J, Ashby J. 1999. Resveratrol and red wine consumption. Hum Exp Toxicol 18:625-626.

Aurbach GD, Marx SJ, Spiegel A. 1992. Metabolic bone disease. En Williams Textbook of Endocrinology. De JD Wilson, DW Foster, 28:1477-1517.

Awoniyi CA, Roberts D, Chandrasheka V, Veeramchaneric DN, Hurts BS, Tucker KE, Schlaff WD. 1997. Neonatal exposure to coumestrol, a phytoestrogen, does no alter spermatogenic potential in rats. Endocrinology 7:337-341.

Barnes S. 1995. Effect of genistein on in vitro and in vivo model of cancer. J Nutr 125:777-783.

Barnes S. 1998. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. Proc Exp Biol Med 217:386-392.

Bartell JM, Kerr JB, Sharp RM. 1986. The effect os selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular destribution of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. J Androl 7:240-253.

Bellido G, Gaytán F, Aguilar R, Pinilla L, Aguilar E. 1985. Prepuberal reproductive defects in neonatal estrogenized male rats. Biol Reprod 33:381-387.

Bickoff EM, Booth AN, Lymarn L, Livingston AL, Thompson CR, De Eds F. 1957. Coumestrol a new estrogen from forage crops. Science 126:969-970.

Bickoff M. 1968. Oestrogenic constituents of forage plants. Review series No 1 Commonwealth Bureay of Pasteur and Field Corps.

Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C. 1997. Apoptosis pattern elicited by oestradiol treatment of the seminiferous epithelium of the rat. J Reprod Fertilil 110: 61-70.

Bodker A, Bruun J, Balsleu E, Iversen HG, Meyhoff HH, Andersson KE. 1999. Estrogen receptor in the human male prostatic urethra and prostate in prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia. Scand J Urol Nephrol 33:237-242.

Bradbury RB, White DE. 1951. The chemistry of subterranean clover. I. Isolation of formononetin and genistein. J Chem Soc 3:2447-3449.

Bradbury RB, White DE. 1954. Estrogen and related substances in plants. Vitam Horm 12:207-209.

Brown-Grant K, Fink G, Greig F, Murray M. 1975. Altered sexual development in male rats after oestrogen administration during the neonatal period. J Reprod Fertil 44:25-42.

Burroughs CD, Mills KT, Berns HA. 1990. Reproductive abnormalities in female mice exposed neonatally to various doses of coumestrol. J Toxicol Environ Health 15:51-61.

Burroughs CD. 1995. Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally to various doses of coumestrol. Proc Exp Biol Med 208:78-81.

Cantero A, Sancha JL, Flores JM, Rodríguez A, Gonzalez T. 1996. Histopatological changes in the reproductive organs of Manchego ewes grazing on lucerne. Zentralb Veterinarned 43:325-330.

Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bouguiba S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad. A review. Reprod Biol Endocrinol 1:35-40.

Carreau S, Bourguibas S, Lambard S, Silandre D, Delalande C. 2004. The promoter(s) of the aromatase gene in male testicular cell. Reprod Biol 4:23-34.

Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Jansen DB, Heck HA. 1999. Developmental effect of dietary phytoestrogens in sprague-dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors α and β in vitro. Toxicol Sci 51:236-244.

Cassidy A. 2003. Potential risk and benefits of phytoestrogen-rich diets. Int J Vitam Nutr Res 73:120-126.

Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Hunter DJ, Mansoun JE. 1992. Type of postmenopausal hormone use and risk of breast cancer: 12 year follow-up from the Nurses Health Study. Cancer Causes Control 3:433-439.

Cos P, de Bruney T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. 2003. Phytoestrogens: recent developments. Planta Med 69:589-599.

Cox IR, Braden AW. 1974 a. Proceedings: A new phyto-oestrogen metabolite in sheep. J. Reprod Fertil 36:192.

Cox IR, Braden AW. 1974 b. The metabolism and physiological effects of phyto-oestrogens. Proc Aust Soc Anim Prod 10:122-129.

Cox IR. 1977. Plant oestrogen affecting livestock in Australia. Proceedings of anoint United State-Australian Symposium of Poisonous Plants of Utah State University, Logan. Utah "Effects of poisonous plants on livestock" de Keller an Kampen James. Academic Press. New York.

Chapin RE, Stevens JT, Hughes CL, Kelce WR, Hess RA, Daston GP. 1996. Symposium overview. Endocrine Modulation of Reproduction. Fundam Appl Toxicol. 29:1-17.

Chen WF, Huang MH, Tzang CH, Yan M, Wong MS. 2003. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. Biochem Biophys Acta 1638:187-196.

Chiechi LM, Lobascio A, Grillo A, Valerio T. 1999 a. Fitoestrogeni alimentari e prevenzione dell´osteoporosi e della malattia cardiovascolare postmenopausale. Minerva Ginecol 51:343-348.

Chiechi LM. 1999 b. Dietary phytoetrogens in the prevention of long-term postmenopausal diseases. Int J Gynaecol Obstet 67:39-40.

Chieffi P. Varriale B. 2004. Estrogen receptor beta localization in the lizard (*Podarcis sicula*) testis. Zygote 12:39-42.

De Boer T, Otjens D, Muntendam A, Meulman E, van Oostijen M, Ensing K. 2004. Develpment and validation of fluorescent receptor assays bases on the human recombinant estrogen receptor subtypes alpha and beta. J Pharm Biomed Anal 34:671-679.

Degen GH. 1990. Interaction of phytoestrogens and other environmental estrogens with prostaglandin syntetase in vitro. J Steroid Biochem 35:473-479.

de Odorico I, Spaulding KA, Pretorius DH, Leo-Toaff AS, Bailey TB, Nelson TR. 1999. Normal splenic volumes estimated using three-dimensional ultrasonography. J Ultrasound Med 18:231-236.

Dewick PM, Martin M. 1979. Biosynthesis of pterocarpan and isoflavan phytoalexins in *Medicago sativa*: The biochemical interconvertion of pterocarpans and 2´hidroxiflavonas. Phytochemistry 18:591-596.

Dietrich W, Haitel A, Huber JC, Reiter WJ. 2004. Expression of estrogen receptors in human corpus cavernosum and male urethra. J Histochem Cytochem 52:355-360.

Dixon-Shanies D, Shaidk N. 1999. Growth inhibition of human breast cancer cells by herbs and phytoestrogens. Oncol Rep 6:1383-1387.

Evans BAJ, Griffiths K, Morton MS. 1995. Inhibition of 5α reductase in genital skin fibroblast and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. J Endocrinol 147:295-302.

Faber MD., Hughes CL. 1991. The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, genistein and zearalenone on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. Biol Reprod 45:649-653.

Faber KA., Hughes CL. 1993. Dose response characteristics of neonatal exposure to genistein on pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone and volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postpuberal castrated female rats. Reprod Toxicol 7:35-39.

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. 1998. The phytoestrogen genistein reduce bone loss in short-term ovariectomized rats. Osteoporos Int 8:274-281.

Fawcett W. 1995. Sistema reproductor masculino. En: Bloom-Fawcett Tratado de Histología. 12 edición. Interamericana Mc-Graw Hill. Madrid. 835-852.

Feet WF, Osman SF. 1982. Inhibition of bacteria by the soybean isoflavonoids glyceollin and coumestrol. Phytopahology 72:755-760.

Forsberg JG, Kalland T. 1981. Neonatal estrogen treatment and epithelial abnormalities in the cervico vaginal epithelium of adult mice. Cancer Res 41:721-734.

García-Lorenzana M, Tarragó-Castellanos MR, Velázquez-Moctezuma J. 2007. Efecto del coumestrol en la diferenciación gonadal de rata Wistar. (enviado)

Gerendai I, Motta M. 1990. Effects of unilateral vagotomy on serum gonadotrophin concentration in rats with two testes and in hemicastrates. Endocrinol Exp 161:186-187.

Gerendai I, Csaba ZS, Cseravas V. 1995. Lateralized effects of right and left sided vagotomy on testicular steroidogenesis and serum gonadotropins levels in hemicastrated peripuberal rats. Neuroendocrinol Lett 17:193-198.

Gerendai I, Halasz B. 1997. Neuroendocrine asymmetry. Front Neuroendocrinol 18:354-381.

Geynet G, Millet C, Troung H, Bauleiu EE. 1972. Estrogen's and antiestrogens. Hormones and antagonists. Gynecol Lavest 3:22-29.

Gómez AG, Medina BM, Peinado LE. 1982. Efectos de algunos factores del suelo sobre la concentración de isoflavonas estrogénicas en pastos naturales. Arch Zootec 31:241-256.

Gutendorf B, Westendorf J. 2001. Comparison of an array of in vitro assay for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. Toxicology 166:79-89.

Han DH, Denison MS, Tachibana H, Yamada K. 2002. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. Biosci Biotechnol Biochem 66:1479-1487.

Hall JM, Korach KS. 2002. Analysis of the molecular mechanism of human estrogen receptor α and β reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. J Biol Chem 276:36869-36872.

Hanson CH, Loper GM, Kohler GO, Bickoff EM, Ataylor KW, Kehr WR, Stanford EW, Dudley JW, Pedersen MW, Sorensen EL, Carnahan HL, Wilsie CP. 1965. Variation in coumestrol content of alfalfa as related to location variety, cutting,

year, stage of growth and disease. Agric. Res. Sev. U.S. Departament of Agriculture Tech Bull 1333.

Hedelin M, Balter KA, Chang ET, Bellocco R, Kint A, Johansson JE, Wiklund F, Thellenberg-Karlsson C, Adami HO, Gronberg H. 2006. Dietary intake of phytoestrogens, estrogen receptor-beta polymorphism and the risk of prostate cancer. Prostate 66:1512-1520.

Hodgert JH, Zacharewski TR, Hammond GL. 2000. Interaction between human plasma sex hormone-binding globulin and xenobiotic ligands. J. Steroid Biochem Mol Biol 75:167-176.

Holterhus PM., Zhao GQ., Aumüller G. 1993. Effects of androgen deprivation and estrogen treatment on the structure and protein expression of the rat coagulating gland. Anat Rec 235:223-232.

Horn-Ross PL, John EM, Canchola AJ, Stewart SL, Lee MM. 2003. Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. J Natl Cancer Inst 95:1158-1164.

Hopert AC, Beyer A, Frank K, Strunck E, Wunsche W, Vollmer G. 1998. Characterization of estrogenicity of phytoestrogens in an endometrial-derived experimental model. Environ Health Perspect 106:399-405.

Humason GL. 1979. Animal Tissue Technique. San Francisco W.W. Freeman and Co. E.U.A.

Hunter DS, Hodges LC, Vonier PM, Fuchs-Young R, Gottardis MM, Walker CL. 1999. Estogen receptor activation via activation function 2 predicts agonism of xenoestrogens in normal and noeplastic cells of the uterine myometrium. Cancer Res 59:3090-3099.

Jacob DA, Temple JL, Patisaul HB, Young LJ, Rissman EF. 2001. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor alpha. Exp Biol Med 226:301-306.

Jefferson WN, Padilla-Banks E, Clark G, Newbold RR. 2002. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activational and inmature mouse uterotrophic response. J Chromatogr β Analyt Technol Biomed Life Sci 777:179-189.

Jurado CR. 1989. Fitoestrógenos, plantas estrogénicas, hongos estrogénicos. En: Toxicología Veterinaria. Editado Jurado CR. Salvat Editores. Barcelona 367-497.

Juriansz RL., Huseby RA., Wilcox RB. 1988. Intractions of putative estrogens with intracellular receptor complex in mouse Leydig cells: relationship to preneoplastic hyperplasia. Cancer Res 48:14-18.

Kalla NR, Nisula BC, Menard R, Loriaux D.L. 1980. The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis. Endocrinology 106:35-39.

Kalu DN, Masoro EJ, Yu BP, Hardin RR, Hollic BW. 1988. Modulation of age-related hyperparathyroidism and senile bone loss in Fischer rats by soy protein and food restriction. Endocrinology 122:1847-1854.

Kanno S, Hirano S, Kayama F. 2004. Effect of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. Toxicology 196:137-145.

Kimura Y, Aoki T, Ayae S. 2001. Chalcone isomerase isozimes with different substrate specifities towards 6'-hydroxy and 6'-deoxychalcones in cultured

cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids. Plant Cell Physiol 42: 1169-1173.

Kitts WD, Newsome FE, Runeckles UC. 1983. The estrogenic and antiestrogenic effects of coumestrol and zeralonol on the immature rat uterus. Can J Anim Sci 63:823-834.

Klinge CM. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acid Res 29:2905-2919.

Krazeisen A, Breitling R, Moller G, Adamski J. 2001. Phytoestrogens inhibit human 17 beta-hydroxyesteroid dehydrogenase type 5. Moll Cell Endocrinol 171:151-162.

Krazeisen A, Breitling R, Moller G, Admski J. 2002. Human 17 beta-hydroxyesteroid dehydrogenase type 5 is inhibited by dietary flavonoids. Adv Exp Med Biol 505:151-161.

Krester DM, Burger HG, Hudson B. 1983. The pituitary and testis. Clinical and Experimental studies. Berlin. Springer Verlag.

Kuhn-Velten ND, Bos RS, Staib W. 1987. Age dependance of the rat Leydig Cell and Sertili Cell function. Acta Endocrinologica 115:275-281.

Kula K. 1988. Induction of precocious maturation of spermatogenesis in infant rats by human menopausal gonadotropin and inhibition by simultaneous administration of gonadotropins and testosterone. Endocrinology 122:34-39.

Kula K, Walczak JE, Sowikiwska-Hilczer J, Oszukowska E. 2001. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. Moll Cell Endocrinol 178:89-97.

Kulin HF, Reiter EO. 1972. Gonadotropin suppression by low dose estrogen in men: Evidence for differential effects upon FSH and LH. J. Clin. Endocrinol Metab 35-836-839.

Kuper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Coriton JC, Safe SH, Var der Saag PT, Van der Burg B, Gustaffson JA. 1998. Interaction of estrogenic chemicals phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139:353-381.

Kurzer MS, Xu X. 1997. Dietary phytoestrogens. Annu Rev Nutr 17:353-381.

Labov JL. 1977. Phytoestrogen and mammalian reproduction. Minireview. Comp Biochem Physiol 57:3-9.

LeBars J, Le Bars P, Brice G. 1990. Présence accumulation et devenir du coumestrol dans la luzerne et ses dérivés. Rec Med Vét 166.463-469.

Lephart ED, Galindo E, Bu LH. 2003. Stress (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) and pain response in male rats exposed lifelong to high vs. low phytoestrogens diets. Neurosci Lett 342:65-68.

Levy JL, Faber KA, Ayyash L, Huhes L. 1995. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. Proc Exp Biol Med 208:60-66.

Lieberman S. 1996. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring on synthetic, merely semantical? J Clin Endocrinol Metabol 81:850-851.

Linford NJ, Dorsa DM. 2002. 17 beta-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. Steroids 67:1029-1040.

Livingston AL, Bickoff EM, Guggols J, Thompson CR. 1961. Quantitative determination of coumestrol in fresh and dried alfalfa. J Agric Fd Chem 9:135-137.

Lock M. 1991. Contested meanings of the menopause. Lancet 337:1270-1272.

Loper GM, Hanson CH. 1964. Influence of controlled environmental factors and two foliar pathogens on coumestrol in alfalfa. Crop Sci 4:480-482.

Lotane E, Adler JK. 1966. Early effects of excessive alfalfa feeding on bovine fertility. Refuah Vet 23:102-110.

Mäkelä S, Santti R, Martikainen P, Nienstedt W, Paranko J. 1990. The influence of steroidal and nonsteroidal estrogens on the 5 alpha-reduction of testosterone by the ventral prostate of the rat. J. Steroid Biochem 35:249-256.

Mäkelä S, Davis VL, Tally WC, Korkman J, Solo L, Vihko R, Santti R, Korach K. 1994. Dietary estrogens act trough estrogen receptor mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells. Environ Health Perspect 102:572-578.

Mäkelä SI, Pylkkänen L, Santti RSS, Aldecreutz H. 1995 a. Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. J Nutr 125:437-445.

Mäkela S, Santti R, Salo L, McLachlan JA. 1995 b. Phytoestrogens are partial estrogen in the adult male mouse. Environ Health Perspect 103:123-127.

Mäkela S, Poutanen M, Kostian ML, Lehtimaki N, Strauss L, Santti R, Vihko R. 1998. Inhibition of 17beta-hydroxisteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. Proc Soc Exp Biol Med 217:310-316.

Mäkelä S, Strauss L, Kuiper G, Valve E, Salmi S, Santti R, Gustafson JA. 2000. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. Mol Cel Endocrinol 170:217-229.

Martin PM, Horwits KB, Ryan DS, McGuire WC. 1978. Phytoestrogens interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. Endocrinology 103:1860-1867.

Martin GB, Price CA, Thiery JC, Weeb R. 1988. Interactions between inhibin, oestradiol activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts. Toxicology 74:135-149.

Mayr V, Busch A, Schneider S. 1992. Validation of two in vitro test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts. Toxicology 74:135-149.

McCann SE, Freudhenheim JL, Marshall JR, Graham S. 2003. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, photochemical and food groups. J Nutr 133:1937-1942.

McGarvey JC, Cates PA, Brooks A, Swanson IA, Milligan SR, Coen CW, O´Bryrne KT. 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. Endocrinology 142:1202-1208.

McKim JM, Wilga PC, Breslin WJ, Plotzke K, Gallovan RH, Meeks RG. 2001. Potential estrogenic and antiestrogenic activity of the cyclic siloxane octamethycotetrasiloxane (D4) and the linear siloxane hexamethyldisolona (HMDS) in immature rats using the uterotrophic assay. Toxicol Sci 63:37-46.

Medina M, Peinado LE, Gómez AA. 1982 a. Modificaciones estacionales del contenido estrogénico de pastos naturales. Arch Zootec 31:193-204.

Medina M, Peinado LE, Games AG. 1982 b. Isoflavonas estrogénicas en especies espontáneas del género trifolium. Arch Zootec 31:269-280.

Medlock KL, Branham WS, Sheehan DM. 1995. Effects of coumestrol and equol on the developing reproductive tract of the rat. Proc Exp Biol Med 208:67-71.

Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi L. 2000. Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. J. Androl 21:464-469.

Messina MJ, Presdy V, Setchell KDR, Barnes S. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. Nutr. Cancer 21:113-131.

Micheli AR, Booth AN, Livingston AL, Bickof EM. 1962. Coumestrol, plant phenolic, and synthetic estrogens; a correlation of structure and activity. J Med Pharm Chem 5:321-335.

Miksicek RJ. 1994. Interaction of naturally occurring nonesteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. J Steroid Biochem Molec Biol. 49:143-160.

Micksicek RJ. 1995. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. Proc Soc Exp Biol Med 298:44-50.

Milligan SR, Balasubramanina AV, Kaleta JC. 1998 Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay. Environ Health Perspect 106:23-26.

Molteni A, Brizio-Molteni L, Persky V. 1995. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. J. Nutr 125:751-756.

Montgomery GW, Martin GB, LeBars J, Pelletier J. 1985. Gonadatrophin release in ovariectomized ewes fed different amounts of coumestrol. J. Reprod Fertil 87:169-174.

Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach K. 2004. Phytoetrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ERα) and ERβ in human cells. Toxicol Sci 80:14-25.

Murkies AL, Lombard C, Strauss BJG, Wilcox G, Burger HG. 1995. Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes:effect of soy and wheat. Maturitas 21:189-195.

Newsome F, Kitts WA. 1980. Action of phytoestrogen coumestrol and genistein on cytosolic and nuclear oestradiol 17 β receptors in inmature rat uterus. Anim. Reprod. Sci. 3:233-245.

Nikander E, Kikkinen A, Metsa-Heikkila M, Aldecreutz H, Pietinen P, Tiitinen A, Ylikorkala O. 2003. A randomized placebo-controlled crossover trial with phytoestrogens in treatment of menopause in breast cancer patients. Obstret Gynecol 101:1213-1220.

Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Milette CF, Osawa V, Shizuta Y., Toda K, Bahr JM. 1993. Germ cell of the mouse testis express P450 aromatase. Endocrinology 132:1396-1401.

Nonclercq D, Revers D, Toubeau G, Beckers J, Sulon J, Laurent G, Zanen J, Heuson-Stiennon J. 1996. In situ demonstration of germinal cell apoptosis

during diethylstilbestrol-induced testis regression in adult male Syrian Hamster. Biol Reprod 55:1368-1376.

O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM. 1994. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. Endocrinology 135:2608-2614.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and Spermatogenesis. Endocrine Reviews 22:289-318.

Okamura M, Watanabe T, Kashida Y, Machida N, Mitsumori K. 2004. Possible mechanism underlying the testicular toxicity of oxfendazole in rats. Toxicol Pathol. 32(1):1-8.

Oko E, Hruduka F. 1984. Comparison of the effect of gosypol, estradiol 17 β and testosterone compensation on male rat reproductive organs. Biol Rep 30:1198-1207.

O'Neill MJ, Adisanya SA, Roberts MF, Pantry IR. 1986. Inducible isoflavonoids from the lima bean Phaseolus lunatus. Phytochemystry 25:1315-1322.

Paige LA, Christensen DJ, Gron H, Norris JD, Gottlin EB, Padilla KM, Chang CY, Ballas LM, Hamilton PT, McDonnell DP, Fowlkes DM. 1999. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ERα and ERβ. Proc Natl Acad Sci USA 96:3999-4004.

Parker GA, Ball MA. 2005. Sperm competition, mating rate and the evolution of testis and eyaculation sizes: a population model. Biol Lett 1:235-238.

Pelletier G, Labrie C, Labrie F. 2000. Localization of estrogen receptor α, oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. J Endocrinol 165:359-370.

Pellissero C, Cuisset B, LeMenn F. 1989. The influence of sex steroid in commercial fish meals and fish diet on plasma concentration of oestrogens and vitellogenin in cultured Siberian stugeron *Acipenser baeri*. Aqua Liv Ressour 2:161-168.

Pellissero C, Bennetau B, Babin P, LeMenn F, Dunogues J. 1991. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian stugeron (*Acipenser Baeri*). J Steroid Biochem Molec Biol 38:293-299.

Pellisero C, Flouriot G, Foucher JL, Bennefau B, Dunogues J, Leliac F, Sumpter JP. 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: an in vitro test for the estrogenic potency of chemical. J. Steroid Biochem Mol Biol 44:263-272.

Pertschuk LP, Tobin EH, Tanapat P, Gaetjens E, Carter AC, Bloom ND, Macchia RJ, Eisenberg KB. 1980. Histochemical analyses of steroid hormone receptors in breast and prostatic carcinoma. J Histochem Cytochem 29:799-810.

Peterson TG, Barnes S. 1991 Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cell: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. Biochem Biophys Res Commun 179:661-667.

Peterson DN, Tkalcevic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA. 1998. Identification of estrogen receptor beta 2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. Endocrinology 139:1082-1092.

Pocock VJ, Sales GP, Milligan SR. 2002. Comparison of the oestrogenic effects of infant milk formula, oestradiol and the phytoestrogen coumestrol delivered

continuously in the drinking water to ovariectomized mice. Food Chem Toxicol 40:643-651.

Ramón JP, Valderrabano J, Folch J. 1993. Reproductive performance of Raza Aragonesa ewes mead on lucerne (*Medicago sativa* cv. Aragon) pasture. Small Ruminant Research 11:323-329.

Register B, Bethel MA, Thompson N, Walmer D, Blohm P, Ayash L, Hughes CL. 1995. The effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol, coumestrol and β sitosterol on pituitary responsiveness and sexually dimorphic nucleus volume in the castrated adult rat. Proc Soc Exp Biol Med 208:72-77.

Romero RC, Tarragó CR, Muñoz MR, Arista RR, Rosado GA. 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. Vet Méx 28:25-30.

Rossiter RC. Bech AB. 1966 a. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover. I: Effects of temperature. Aust J Agric Res 17:29-37.

Rossiter RC, Bech AB. 1966 b. Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in Subterranean clover. II. Effects of phosphate supply. Aust J Agric Res 17:447-456

Saez JM, Haour F, Loras B, Sanchez P, Catheard AM. 1978. Oestrogen induced Leydig cell refractoriness to gonadotrophin stimulation. Acta endocrinol 89:379-392.

Salisbury FB, Ross CW. 1992. Lipids and other natural products in "Plant physiology" Wadsworth Publisher EUA.

Santen RJ. 1975. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in man? J Clin Invest 56:1555-1563.

Santti R, Mäkelä S, Stauss L, Korkman J, Kostian ML. 1998. Phytoestrogens: potential endocrine disrupters in males. Toxicol Indust Health 14:223-237.

Sarkar FH, Li Y. 2002. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. Cancer metastasis rev 21:265-280.

Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, Kerr JB, Saunders PT, McKinnell C. 1992. Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubule. J Androl 13:172-184.

Seawright AA. 1995. Directly toxic effects of plant chemicals which may occur in human and animal foods. Nat Toxins 3:227-232.

Sharpe RM, Shakkebaek EN. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet 341:1392-1395.

Shemesh M, Lindner HR, Ayalon HR. 1972. Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phytoestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol. J Reprod Fertil 29:1-9.

Sherins RIJ, Loriaux DL. 1973. Studies on the role of sex steroids in the feedback control of FSH concentration in men. J Clin Metab 36:886-893.

Shetty G, Weng C, Bolden-Tiller O, Huhtaniemi I, Handelsman D, Meistrich M. 2004. Effects of medroxiprogesterone and estradiol on the recover of spermatogenesis in irradiated rats. Endocrinology 145:4461-4469.

Shiizaki K, Goto K, Ishige A, Komatsu Y. 1999. Bioassay of phyotoestrogen in herbal medicine used for postmenopausal disorder using transformed MCF-7 cells. Phytother Res 13:498-503.

Sholeton LJ, Srustava L. Taylor BB. 1975. The *in vivo* and *in vitro* effects of diethylstilbestrol on testicular synthesis of testosterone. Steroids 26:797-804.

Shutt DA, Braden WH, Lindner HR. 1969. Plasma coumestrol levels in sheep following administration of synthetic coumestrol or ingestion of medi (*Medicago littoralis*). Aust J Agric Res 20:65-89.

Shutt DA, Cox R. 1972. Steroid and phytoestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. Endocrinology 52:299-310.

Schmidt S, Michna H, Diel P. 2005. Combinatory effects of phytoestrogens and 17 beta-estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol 94:445-449.

Smith JF, Jagusch KT, Brunswich LF, McGowan LT. 1980. The effect of lucerne feeding on ovulation rate in ewes. Proc NZ Soc Anim Prod 40:44-49.

Song M, Gutzei HO. 2003. Effect of 17-alpha-ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latapies*) testis. Dev Growth Differ 4:327-337.

Sonjen D, Kaye AM. 1976. Specifies in the synthesis of a cytoplasmic estrogen induced uterine protein. Moll Cell Endocrinol 4:353-358.

Soriano-Rochard E, Nuñez PH. 1986. Steroid binding to sheep uterine receptors *in vitro*. Endocrinology 52:299-310.

Steinberger E. 1971. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol Rev. 51:1-22.

Steene OP. 1989. Clinical and physical evaluation of the infertile male: testicular measurement or ochidometry. Andrologia 21:103-112.

Steewart-Bentley M, Odell W, Horton R. 1974. The feedback control of luteinizing hormone in normal adult men. J Clin Endocrinol Metab 38:545-553.

Stopper H, Schmitt E, Kobras K. 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. Mutat Res. 574:139-155.

Stroheker T, Cabaton N, Berges R, Lamothe V, Lhuguenot JC, Chagnon MC. 2003. Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wister rat. Food Chem Toxicol 41:1175-1183.

Strom SS, Yamamura Y, Duphorne CM, Spitz MR, Babaian RJ, Pilloco PC, Hursting SD. 1999. Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. Nutr Cancer 33:20-25.

Sukumuran L, Gnanamanickam SS. 1980. Isolation of antifungal compound form Indian Fodder legume plants. Indian J Microbiol 20:204-207.

Tarragó-Castellanos MR, García-Lorenzana M, Díaz-Sánchez V, Velázquez-Moctezuma J. 2006. Gonadotrophin levels and morphological testicular features in rats after different dosis of phytoestrogen coumestrol. Neuro Endocrinol Lett 27:487-492.

Tcholakian RK, Chowdhury M, Steinberg E. 1974. Time of action of oestradiol 17 β on luteinizing hormone and testosterone. J Endocrinol 26:797-806.

Tinwell H, Soames AR, Foster JR, Ashby J. 2000. Estradiol type activity of coumestrol in mature and immature ovariectomized rat uterotrophic assays. Environ Health Perspect 108: 631-634.

Toyama Y, Hosoi I, IchiKawa S, Maruoka M, Yuasa S. 2001. Beta-estradiol benzoato affects spermatogenesis in the adult mouse. Moll Cell Endocrinol 178:161-168.

Tremblay GB, Giguere V. 2002. Corregulators of estrogen receptor action. Crit. Rev Eukaryot Gene Expr 12:1-22.

Turner TT, Evans WS, López TJ. 1990. Gonadotrophin and Leydig cell responsiveness in the male rat. Effects of experimental left varicocele. J. Androl 11:555.562.

Tsai-Morris CH, Aguilano DR, Dufau ML. 1985. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. Endocrinology 116:38-46.

Tsutsumi N. 1995. Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. Biol Pharm Bull 18:1012-1015.

Tsutsumi N, Kawashima K, Nagata H, Tsuyuki J, Itoh F, Arai N, Kojima M, Ujiie A, Endo H. 1994. Effects of KCA-098 on bone metabolism: comparison with those of ipriflavone. Jpn J Pharmacol 65:343-349.

Tsutsumi N. 1995. Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. Biol Pharm Bull. 18:1012-1015.

Van der Malen HJ, Vrenkmann AO, Jong FH, Rommerts FF. 1981. Testicular oestrogen. J Endocrinol 89:33-45.

Van Pelt AM, Roois DG, Van der Burg B, Van der Zaag PT, Gustafsson JA, Kuiper GG. 1999. Ontogeny of estrogen receptor β expression in rat testis. Endocrinology 141:478-483.

Walcott FL, Hauptmann M, Duphorne CM, Pillow PC, Strom SS, Sigurdson AJ. 2002. A case-control study of dietary phytoestrogens and testicular cancer risk. Nutr Cancer 44:44-51.

Weber KS, Setchell KD, Stocco DM, Lephart ED. 2001. Dietary soy phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH prostate 5α reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague Sawley rats. J Endocrinol 170:591-599.

Whitten LP, Naftolin F. 1992. Effects of a phytoestrogens diet on estrogen dependent reproductive processes in immature female rats. Steroids 57:56-61.

Whitten LP, Lewis C, Naftolin F. 1993. A phytoestrogen diet induces the premature anovulatory syndrome in lactationally exposed female rats. Biol Reprod 49:1117-1121.

Whitten PI, Patisaul HB, Young LS. 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavones in rodents. Neurotoxicol Teratol 24:47-54.

Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP. 2003. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. J Urol 169:1582-1586.

Zava DT, Blen M, Duwe G. 1997. Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. Environ Health Perspect 105:637-645.

Anexo 1

Radioinmunoanálisis de Hormona Leutinizante (LH)

Procedimiento:

1. Rotular los tubos de ensayo.
2. Adicionar 200 µl de los estándares. La curva control abarca un rango de 0-144 mUI-ml.
3. Adicionar 100 µl de controles y suero.
4. Adicionar 100 µl de antisuero anti-LH en todos los tubos excepto en los tubos correspondientes a las cuentas totales.
5. Agitar en Vortex, e incubar a 37° C por 1 hora.
6. Adicionar 100 µl de marca (^{125}I-LH) en todos los tubos incluyendo cuentas totales.
7. Agitar en Vortex e incubar a 18-28° C por 2 horas.
8. Adicionar 1 ml del anticuerpo AMERLEX-M en todos los tubos.
9. Agitar e incubar de 18-28° C por 10 minutos.
10. Dejar reposar la muestra por 15 minutos. Decantar y escurrir en papel secante por 5 minutos.
11. Realizar el conteo en un contador de gamas durante un minuto.

Radioinmunoanálisis de Hormona folículo estimulante (FSH)

Procedimiento:

1. Marcage de los tubos de ensayo
2. Pipetear 300 µl de los estándares. La curva control abarca un rango de 0-83.8 mUI-ml.
3. Adicionar 200 µl, controles y plasma.
4. Adicionar 100 µl antisuero anti FSH en todos los tubos excepto en los tubos correspondientes a cuentas totales.
5. Agitar en Vortex e incubar a 37° C por 1 hora.
6. Adicionar 100 µl de marca (^{125}I-FSH) en todos los tubos incluyendo cuentas totales.
7. Agitar en Vortex e incubar a 18-28° C por 2 horas.
8. Adicionar 1 ml del anticuerpo AMERLEX-M en todos los tubos.
9. Agitar e incubar de 18-28° C por 10 minutos.
10. Reposar la muestra por 15 minutos. Decantar y dejar escurrir en papel secante por 5 minutos.
11. Realizar el conteo en un contador de gamas durante un minuto.

Radioinmunoanálisis de Testosterona

Procedimiento:

1. Marcage de los tubos de ensayo.
2. Adicionar 50 µl de los estándares de testosterona. Curva estándar en un rango de 0.1 a 25 ng/ml. 50 µl controles y muestras desconocidas.
3. Adicionar 500 µl de la marca ^{125}I-Testosterona.
4. Mezclar y agitar suavemente con la mano.
5. Incubar todos los tubos a 37° ± 2° C por 60 a 70 minutos.
6. Decantar el contenido de los tubos. Adicionar 1 ml de agua destilada. Dejar reposar 1 minuto y decantar.
7. Utilizando un contador de gamas se procedió a contar todos los tubos durante un minuto. Contar los tubos durante un minuto utilizando un contador de gamas.

Gonadotrophin levels and morphological testicular features in rats after different doses of the phytoestrogen coumestrol

C. Rosario TARRAGÓ-CASTELLANOS [1], C. Mario GARCÍA-LORENZANA [1], Vicente DIAZ-SÁNCHEZ [2] & Javier VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA [1*]

[1] Deptartment of Biology of Reproduction, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, C P 09340 México City, Mexico.
[2] Deptartment of Biology of Reproduction, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Dr. Salvador Zubiran", México City, Mexico.

Correspondence to: Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Departamento de Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
San Rafael Atlixco 186. Col. Leyes de Reforma
C.P. 09340. Iztapalapa. D.F. MÉXICO.
PHONE: (525)7244701; FAX: (525) 7244704
EMAIL: jvm@xanum.uam.mx

Submitted: April 14, 2006 *Accepted: May 1, 2006*

Key words: **phytoestrogens; coumestrol; testicles**

Neuroendocrinol Lett 2006; **27**(4):487–492 **PMID:** 16892005 NEL270406A03 ©Neuroendocrinology Letters **www.nel.edu**

Abstract

INTRODUCTION: Phytoestrogens are a wide variety of chemical compounds, mainly isoflavoniods, from a vegetable source. Their name makes reference to their ability to induce estrogenic responses in mammals. Coumestrol is a phytoestrogen that can be found in high concentrations in the dietary elements of cattle. Some endocrine alterations have been reported for cows and ewes after ingestion of vegetables with high concentrations of coumestrol. However, these studies have been made mainly in females.

OBJECTIVE: To analyze some features of the masculine endocrine response in rats after several doses of the phytoestrogen coumestrol.

DESIGN: Adult male rats were injected with several doses of coumestrol. Plasma gonadotrophins (LH/FSH) and testosterone levels were assessed. In addition, morphology of the testicles was analyzed.

SETTING: Experiments were done in the facilities of the neurosciences area at the University.

RESULTS: No significant changes were observed in gonadotrophin levels after the administration of coumestrol. Testosterone levels showed a significant decrease with the higher doses. Morphological analysis showed an inhibitory effect on spermatogenesis expressed mainly in the right testicle. Testicular volume decreased and the tubular area increased significantly after coumestrol treatment.

CONCLUSIONS: These results suggest that the endocrine effect of coumestrol is mainly expressed in peripheral targets in male rats. In addition, the possible mediation of estrogen beta receptors is discussed.

ORIGINAL ARTICLE

Introduction

Phytoestrogens are a wide variety of chemical compounds of vegetable origin that are capable of inducing estrogenic responses [15]. They have been chemically characterized as isoflavonoids and they have been subdivided into: isoflavones, pterocarpens and coumestanes [20]. It has been shown that phytoestyrogens (isoflavones and coumestanes) are able to couple with estrogen receptors and modify growing breast cancer cells [15]. Among coumestanes, coumestrol can be found widely distributed in the vegetables of the dietary elements of cattle. It has been reported that the amount of coumestrol in alfalfa increases from 1.5–2.5 mg /kg in healthy plants to 50–200 mg/kg in plants with a micotic disease caused by *pseudopesisa medicaginis* and, the ingestion of alfalfa with high levels of coumestrol [20–50 mg of coumestrol/kg of alfalfa) induces reproductive impairments [17]. Administration of coumestrol (7.5–25 mg/ 24 hours) induces a long-lasting estrogenization in ovariectomized sheep [23]. A similar diet in cows results in alterations of the estrous cycle and in a lower fertility rate [18] also inducing an increase of sexual behavior and hyperplasia of the udder and uterus [27]. In 1995, Adams et al reported that a diet with high levels of coumestrol elicits a total loss of fertility that can be transient or irreversible [2, 3]. In addition, bulls fed with alfalfa containing an average concentration of 80 mg/kg of coumestrol, showed a decrease of spermatic motility which was restored when their diet was modified [16].

Thus, it is possible that coumestrol has an influence on the hyphothalamic-pituitary-gonadal axis and/or on peripheral organs linked to reproduction. The goal of the present study was to analyze the effects of different doses of coumestrol on gonadotrophin and testosterone levels in male rats as well as to assess the effects on the morphological features of the testis.

Methods

Adult male Wistar rats (weight: 300–350 g: age: 90 ± 2 days) were used in this study. Subjects (Ss) came from our own vivarium and were kept in a room with a normal light cycle (12/12) with food and water available ad lib. All housing and behavioral procedures conform to the Principles of Laboratory Animal Care issued by the National Institutes of Health. Ss were randomly assigned to one of seven groups (N = 10 per group) with the following treatment with coumestrol (Cou) ($C_{18}H_8O_5$; Mw: 268.22; Acros Lab, Belgium):

A: Total dose: 12.5 µg. (weight range: 41.7–37.9 ug/kgbw)
B: Total dose: 25 µg (weight range: 77–70.8 ug/kgbw)
C: Total dose: 50 µg (weight range: 161.3–143.7 ug/kgbw)
D: Total dose: 100 µg (weight range: 335.6–306.7 ug/kgbw)
E: Total dose: 200 µg (weight range: 658–602.4 ug/kgbw)
F: Total dose: 400 µg (weight range 1460–1315.8 ug/kgbw) and
G: A control group injected with vehicle.

Treatments were applied in one daily subcutaneous injection in a volume of 0.1 ml of corn oil during three consecutive days. Four days later, two hours after the onset of the light period (11 AM), Ss were sacrificed by decapitation, their trunk blood was obtained and the testicles were removed for histological analysis.

Hormonal assessment:

Blood samples were centrifuged; serum was separated within 15 minutes and kept frozen until analysis.

Luteinizing hormone (LH) was determined by radioimmunoassay (RIA) using a commercial kit (Amerlex-M LH-RIA) with a sensitivity of 0.62 mIU/ml. Standard curve concentration range was from 0 to 144 mIU/ml with a cross-reaction of < 4% for thyroid-stimulating hormone (TSH), < 0.1% for follicle stimulating hormone (FSH) and < 49.7% for corionic-gonadotrophin hormone (CGH).

Follicle stimulating hormone (FSH) was determined by RIA using a commercial kit (Amerlex-M FSH-RIA) with a sensitivity of 0.54 mIU/ml. Standard curve concentration range was from 0 to 83.8 mIU/ml, with a cross-reaction of < 0.09% for TSH, < 0.08% for LH and < 0.006% for CGH.

Testosterone (T) was also determined by RIA using a commercial kit (Amerlex Testosterone RIA DSL-4000) with a sensitivity of 0.08 ng/ml. Standard curve concentration range was from 0 to 25 ng/ml with a cross-reaction of < 5.9% for 5 alpha DHT, < 2.3% for androstenedione and < 0.14% for androstenediol.

Histological analysis

Testicles were weighed and testicular/somatic index (TSI = testicular weight/body weight X 100) was obtained. Testicles were fixed in a Bouin-Duboscq solution [9], and were gradually dehydrated with increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 96% and 100%), cleared with Xylene and included in Paraplast (Oxford, labwere, St. Louis). The slices (5 µm) were stained using Hematoxyline/eosine and periodic acid-Schiff (PAS) and were analyzed using an Image Analyzer (KS300 Zeiss).

The following testicular diameters were obtained: craneo-caudal (a), anterior-posterior (r) and medio-lateral (b). Therefore, testicular volume was calculated with the following formula: $v = 1/3\ \pi$ rab. Using an Image Analyzer, the tubular area was assessed and the number of spermatogonies, spermatocytes and spermatides was determined. Total number of cells represents the sum of all the cellular types present in the tubule. Cell density

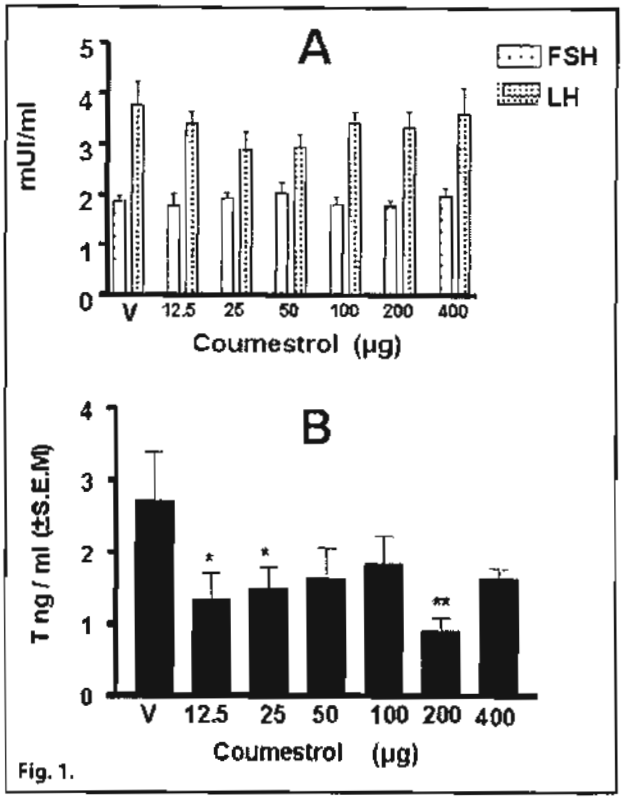


Fig. 1.

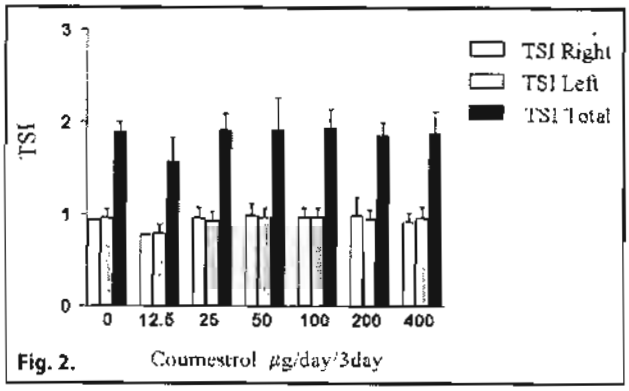


Fig. 2.

Figure 1. Panel A. Plasma levels of gonadotrophins after several doses of coumestrol. No significant changes were observed after coumestrol when compared to control group. Panel B shows plasma levels of testosterone after coumestrol. Compared to control, there is a decrease from the lower doses, (* = $p < 0.05$). ANOVA followed by Dunnet test).

Figure 2. Testicular/somatic index (TSI) after different doses of coumestrol. No differences were observed when the right testicle was compared to the left testicle. Total TSI decreased significantly only after the lower dose of coumestrol. (Anova followed by Tukey test. * = $p < 0.05$ compared to control).

represents the number of cells per square milimeter of tubular area.

Statistical Analysis

Hormonal levels were analyzed using ANOVA followed by a Dunnet test. TSI data were analyzed using an ANOVA followed, when significant, by a Duncan Test. Morphology was analyzed using a one-way ANOVA followed, when significant, by the Bonferroni Control Test.

Results

No behavioral or weight changes were observed during the threee days of treatment. As can be seen in Figure 1 (Panel A), no changes were observed in the concentration of either FSH or LH after the administration of different dose of coumestrol.On the other hand, plasma levels of T (Panel B) showed a statistical significant decrease at all coumestrol doses tested.

Figure 2 shows the results obtained concerning the TSI. As can be seen, only the group treated with 12.5 µg of coumestrol showed significantly lower values when compared to both the control and the other experimental groups.

Histological and Morphometric Analysis of the Testicles:

Coumestrol treatment induced morphological changes in the testicles, however, the changes were observed mainly in the right testicle. In some of the analyzed parameters, no changes were observed in the left testicle at any of the doses tested. Concerning Leydig cells a clear enlargement was observed at all the doses tested. (Figure 3).

Significant differences were found in the vehicle control group when the right testicles were compared to the left testicles. Left testicles showed a significantly smaller volume, a lower total cell number, cell density, spermatocytes and later spematids. In addition, higher values in the left testicle were observed in tubular area, spermatogonies and early spermatids.

Right and left testicles were analyzed after coumestrol administration by comparing each one with the vehicle control of the same side. Testicular volume decreases significantly when compared to the vehicle control group and at all the doses of coumestrol. However, this effect was observed only in the testicles of the right side. The tubular area displayed significant changes in the right testicle at all the doses tested, however, there was no dose-response pattern.

Discussion

It is well known that estradiol exerts an inhibitory effect on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis (HPG) [For review see: 12]. This inhibitory action of estradiol results in the decrease of testosterone plasmatic levels, which can be due to the inhibition of gonadotrophin release or to a direct effect on the testicles. It has been repeatedly shown that estradiol, even at small concentrations, induces a suppression of both LH and FSH [14, 22, 25]. Thus, it was expected that the estrogenic effect of coumestrol would result in an inhibition

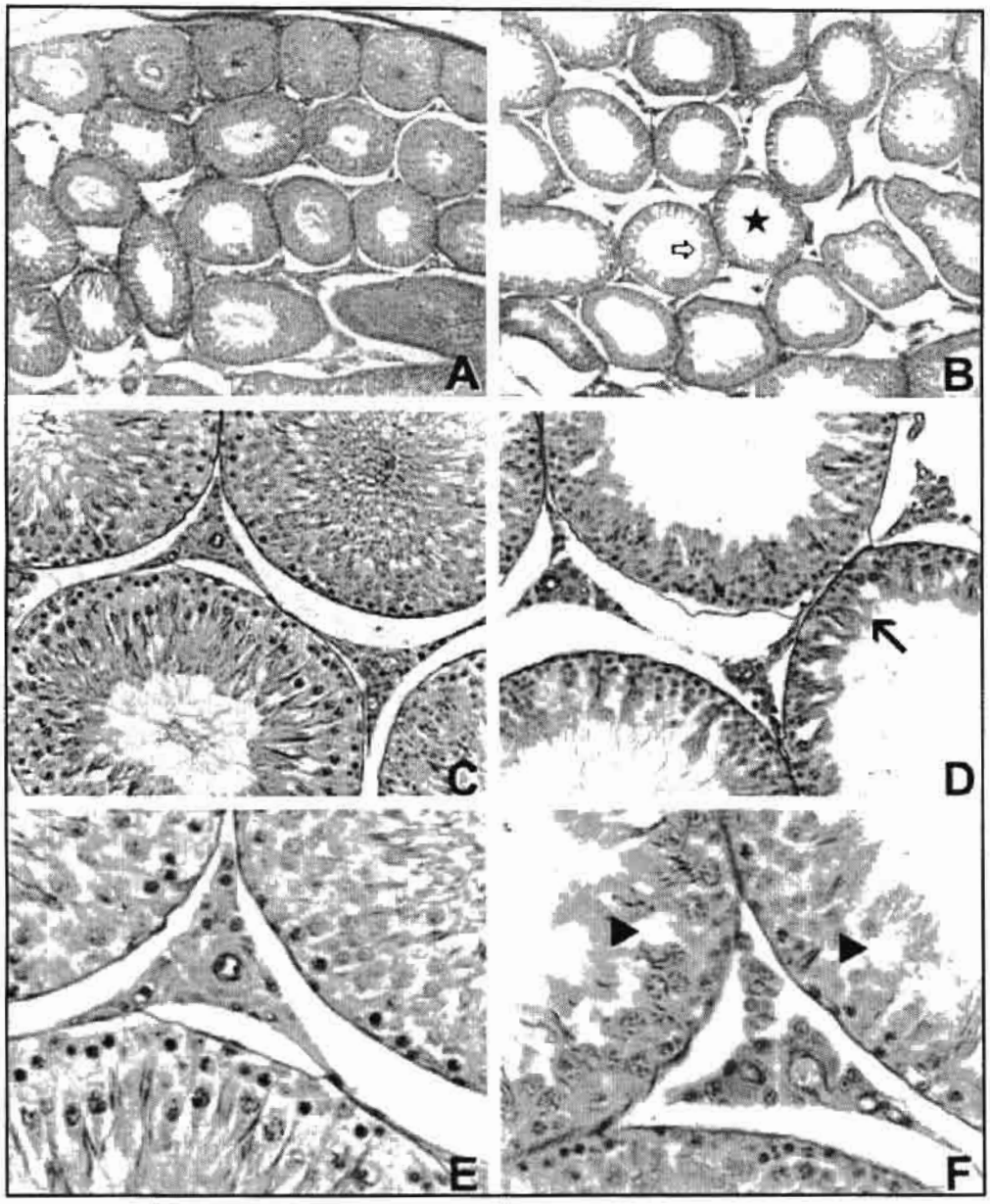


Figure 3. Photomicrographs showing transverse sections of seminiferous tubules of rat testis. Left side: (A.C and E): oil treated control. As no significant differences were detected between left and right testicles, control images are similar in both testicles. Right side (B, D and F) shows images of right testicles treated with coumestrol. At the first level of amplification (A, B. 100x) coumestrol treated testis show an increase in the luminal area with poor development of the epithelium. At a larger amplification (C, D. 200 x) diminished cellular stratification is noticeable with less heterogeneity of the diverse types of cellular associations. At the highest amplification, the experimental group shows an inhibition of the seminiferous epithelium phases, with a high proportion of cellular associations corresponding to phases VII and VIII of the epithelial seminiferous cycle. In addition, a clear increase of the intercellular space can be observed between the tubules of the experimental group.

of gonadotrophin release, however, the present results indicate that the systemic administration of coumestrol has no effects on plasma levels of gonadotrophins. This raises the possibility that this phytoestrogen is unable to cross the blood brain barrier. These results are similar to those reported for Sprague-Dawley rats submitted to a diet of phytoestrogens from soy [29], where there was a decrease in the plasma levels of testosterone with no changes in gonadotrophin levels.

In addition, it has been reported that phytoestrogens bind with both alpha and beta estrogen receptors, but preferentially with the beta receptor subtype [5]. Localization studies of estrogen receptor subtypes have shown that the secretory cells in the anterior pituitary exhibit the alpha receptor subtype while the beta receptor subtype has not been located in the pituitary [21]. These data could explain the lack of effect of coumes-

trol on gonadotrophin plasma levels observed in the present study.

Concerning the effect of coumestrol administration on testosterone levels, it is possible that the phytoestrogen is acting through the same mechanism that has been reported for estradiol. Kalla et al [10] reported that estradiol inhibits the activity of the 17-20-desmolase in Leydig cells that results in the arrest of steroid hormones synthesis and in the increase of 17-α-hydroxyprogesterone levels. It is also possible that in rats coumestrol has effects similar to those reported in humans [11], where the activity of 17-beta-hydroxysteroid-dehydrogense (17beta-HSD), which is a key enzyme in the metabolism of androgens and estrogens, can be inhibited by several phytoestrogens like zeralenone, coumestrol, quercetin and biochanina A.

On the other hand, it has been reported that estradiol administration induces a significant decrease in the size and weight of the testicles in adult [10; 19] and in neonate rats [4]. In the present study, only the smaller dose tested induced a significant decrease in both size and weight. Nevertheless, the morphological analysis showed a clear lateralization effect of coumestrol. The left testicles showed no differences when compared to control, while the right testicles displayed morphological changes that closely resemble the changes reported after the administration of estradiol [24, 28]. A similar lateralization effect has been reported after administration of estradiol benzoate to neonate rats that results in an impairment of the development, mainly, of the right testicle [1]. It has been suggested that the right testicle is more sensitive to pharmacological stimulation due to differences either of irrigation [6] and/or of innervation [7]. Recent reports indicate the existence of a clear asymmetric innervation of the testicles by the vagus nerve influencing the action of gonadotrophins on the synthesis of steroids [8]. Furthermore, it has been shown that in men, the administration of LH increases testosterone concentration mainly in the right testicular vein [26]. Thus, it is possible that coumestrol is exerting its estrogenic effect on plasma levels of testosterone acting mainly on the right testicle.

The present results suggest that coumestrol has an estrogenic effect that seems limited to peripheral targets, without affecting the central regulation of gonadotrophin release. The full picture of the influence of coumestrol on male reproductive mechanisms remains to be elucidated.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Edith Monroy for their helpful advice on the manuscript. The present study is part of the Doctoral Degree in Biological Sciences of the Universidad Autonoma Metropolitana.of RTC.

REFERENCES

1 Aceltero J, Llanero M, Parrado E, López-Beltrán A. Neonatal exposure of male rats to estradiol benzoote causes rete testis dilation and selective backflow impairment of spermatogenesis. The Anatomical Record 1998; **252**:17–33.
2 Adams NR. Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe. Proc Soc Exp Biol Med 1995a; **208**:87–91.
3 Adams NR. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. J Anim Sci 1995b; **73**:1509–1515.
4 Bellido G, Gaytán F, Aguilar R, Pinilla L, Aguilar E. Prepuberal reproductive defects in neonatal estrogenized male rats. Biol Reprod 1985; **33**:381–387.
5 Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engel S, Jansen DB, Heck Hd'A. Developmental effects of dietary phytoestrogens in sprague-dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors α and β in vitro. Toxicol Sci 1996; **51**:236–244.
6 Gerendai I, Motta M. Effects of unilateral vagotomy on serum gonadotrophin concentration in rats with two testes and in hemicastrates. Endocrinol Exp 1990; **161**:186–187.
7 Gerendai I, Halass B Neuroendocrine asymmetry. Front Neuroendocrinol 1997; **18**:354–381.
8 Gerendai I, Csaba ZS, Cseravas V. Lateralized effects of right and left sided vagotomy on testicular steroidogenesis and serum gonadotaropins levels in hemicastrated peripuberal rats. Neuroendocrinol Lett 1995; **17**:193–198.
9 Humason GL. (Ed.).Animal tissue technique. 1979. WW. Freeman and Co. San Francisco.
10 Kalla NR, Insula BC, Menard R, Loriaux DL. The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis. Endocrinol 1980; **106**: 35–39.
11 Krazein A, Breitling R, Moller G, Admski J. Human 17beta-hydroxysteriod dehydrogenase type 5 is inhibited by dietary flavonoids. Adv Exp Med Biol 2002; **505**:151–161.
12 Krester DM, Burger HG, Hudson B (Eds.). The pituitary and testis. Clinical and Experimental studies. 1983. Springer Verlag. Berlin.
13 Kula K. Induction of precocious maturation of spermatogenesis in infant rats by human menopausal gonadotropin and inhibition by simultaneous administration of gonadotropins and testosterone. Endocrinol 1988; **122**:34–39.
14 Kulin HF, Reiter EO. Gonadotrophin suppression by low dose estrogen in men: Evidence for differential effects upon FSH and LH. J Clin Endocrinol Metab 1972; **35**:836–839.
15 Kurzer MS, Xu X Dietary phytoestrogens. Annu Rev Nutr 1997;**17**:353–381.
16 Le Bars J, Hurard JB, Infertilité mâle bovine et tenuer en coumestrol de la luzaerne. Pharmacol Toxicol Vétérinaires. Colloques de l'INRA 1982; **8**:157–158.
17 Le Bars J, Le Bars P, et Brice G Presence accumulation et devenir du coumestrol dans la Luzerne et ses derives Rec Med Vet 1990; **166**:463–469.
18 Lotane E, Adler JK. Early effects of excessive alfalfa feeding on bovine fertility. Refuah Vet 1966; **23**:102–110.
19 Oko E, Hrudka F. Comparison of the effect of gosypol, estradiol 17β and testosterone compensation on male rat reproductive organs. Biol Rep 1984; **30**:1198–1207.
20 O'Neill MJ, Adisanya SA, Roberts MF, Pantry IR. Inducible isoflavonoids from the lima bean Phaseolus lunatus. Phytochem 1986; **25**:1315–1322.
21 Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor α, oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. J Endocrinol 2000; **165**:359–370.
22 Sherins RJ, Loriaux DL. Studies on the role of sex steroids in the feedback control of FSH concentration in men. J Clin Metab 1973; **36**:886–893.
23 Shutt DA, Braden WH, Lindner HR. Plasma coumestrol levels in sheep following administration of synthetic coumestrol or ingestion of medi (Medicago littoralis). Aust J Agric Res 1969; **20**:65–89.
24 Steinberger E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol Rev 1971; **51**:1–22.

25 Stewart-Bentley M, Odell W, Horton R. The feedback control of luteinizing hormone in normal adult men. J Clin Endocrinol Metab 1974; **38**:545–553.
26 Turner TT, Evans WS, López TJ. Gonadotroph and Leydig cell responsiveness in the male rat. Effects of experimental left varicocele. J Androl 1990; **11**:555–562.
27 Valderrabano J. Alteraciones reproductivas asociadas al consumo de Fitoestrógenos. Investigación Agraria 1992; **7**:115–124.
28 Van der Malen HJ, Vrenkmann AO, Jong FH, Rommerts FF. Testicular oestrogens. J Endocrinol 1981; **89**:33–45.
29 Weber KS, Setchell KD, Stocco DM, Lephart ED. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague Dawley rats. J Endocrinol 2001; **170**:591–599.

ARCHIVO HISTÓRICO