



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Maestría en Ciencias Agropecuarias

“Efectos del quitosán-coumestrol sobre el tejido testicular en rata (*Rattus rattus*) y su posible empleo en el control de fauna feral”

TESIS

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

M.V.Z Mariana Martínez Munguía

COMITÉ TUTORAL:

Director de Tesis: Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis

Asesor: M. en C. Osvaldo López Díaz

Ciudad de México. 11 de Octubre de 2016

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis

Profesor Investigador
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

ASESOR

M. en C. Osvaldo López Díaz

Profesor investigador
Laboratorio de Histopatología Veterinaria
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE

Dr. Mario Pérez Martínez
Profesor Titular de tiempo completo definitivo
Facultad de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional Autónoma de México

SECRETARIO

M. en C. Osvaldo López Díaz
Profesor Investigador
Laboratorio de Histopatología Veterinaria
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

VOCAL-1

Dra. María Guadalupe Micaela Prado Flores
Profesora Investigadora
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

VOCAL-2

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez
Profesor Investigador
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

La Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

La autora de este texto fue becaria del CONACYT con el número de registro:
612742

AGRADECIMIENTOS

Gracias papá por siempre brindarme más de lo que he necesitado, por ser el mejor ejemplo de perseverancia, paciencia, voluntad y lucha y por no rendirte nunca.

Gracias mamá por tu fuerza y apoyo incondicional ante cualquier situación, gracias a ti he aprendido a ser fuerte y a concluir lo que comienzo.

Gracias hermana por tu paciencia y comprensión, por ser mi guía desde siempre.

Gracias Eduardo por tu amor y apoyo incondicional.

Gracias Dr. Juan José Pérez Rivero por confiar en mí y unirme a su grupo de investigación.

Gracias Dr. Osvaldo López por siempre estar con la mejor disposición para ayudarme dentro mi formación.

Gracias a mis compañeros del grupo de investigación (Alfredo y Elizabeth) por su ayuda durante la fase experimental.

Gracias Dra. Guadalupe Prado por sus atenciones fuera del aula.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CUANTIFICACIÓN CELULAR DURANTE LAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO (Número de células)

Tabla 2. COMPARACIÓN SEMANAL DE MEDIAS DE CUANTIFICACIÓN CELULAR (Número de células)

Tabla 3. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE MORFOMETRÍA ESTRUCTURAL DURANTE LAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO. MEDICIONES

Tabla 4. COMPARACIÓN SEMANAL DE MEDIAS DE MORFOMETRÍA ESTRUCTURAL. MEDICIONES

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del testículo

Figura 2. Representación sistemática de una sección transversal a través de parte de un testículo de rata

Figura 3. Diagrama que ilustra la asociación celular de las 14 fases del ciclo del epitelio seminífero en la rata

Figura 4. Diagrama esquemático ilustrando un modelo para el control hormonal de la función testicular

Figura 5. Estructura química de los principales compuestos fitoestrogénicos

Figura 6. Comparación de la estructura de ER α y ER β

Figura 7. Fotomicrografías de imágenes representativas del tejido testicular teñidas con H.E. en 200x del grupo control y correspondientes al tratamiento de 800 μ g de COU, semana 5, semana 6, semana 7, semana 8, semana 9

Figura 8. Fotomicrografías de imágenes representativas del tejido testicular teñidas con H.E. en 200x del grupo control y correspondientes al tratamiento de 1600 μ g de COU, semana 5, semana 6, semana 7, semana 8, semana 9

Figura 9. TUNEL (+) células de tejido testicular dentro de los túbulos seminíferos

Figura 10. Fluorescencia de tejido testicular del grupo control. Fluorescencia de tejido testicular del grupo de animales tratados con 800 μ g de COU

ABREVIACIONES

AIF. Factor de inducción de la apoptosis
Apaf-1. Proteasa-activadora de apoptosis factor-1
CD95 (Fas). Grupo de determinación 95 (Fas)
CNP. Nanopartículas a base de quitosán
COU. Coumestrol
CYTC. Citocromo C
DAB. Diaminobenzidina
DISC. Complejo de señal de muerte inducida
DNA. Ácido desoxirribonucleico
Endo G. Endonucleasa G.
ER. Receptor estrogénico
ERs. Receptores estrogénicos
ER α . Receptor estrogénico alfa.
ER β . Receptor estrogénico beta
FSH. Hormona folículo estimulante
GnRH. Hormona liberadora de gonadotropina
hsp. Proteínas de choque térmico
LH. Hormona luteinizante
MPT. Permeabilidad de transición mitocondrial
NaCl. Cloruro de sodio
NF. Factor nuclear
N-terminal. Grupo amino terminal
PAI. Inhibidores de proteínas de apoptosis
PBS. Tampón fosfato salino
pH. Potencial de hidrógeno

rTdT. Transferasa terminal recombinante

Smac/DIABLO. Segundo activador derivado de mitocondrias de las caspasas

SSC. Citrato salino de sodio

Streptavidin HRP. Horseradish peroxidasa-labeled Streptavidin

TAF1/2. Región de función de activación 1/2

TNF. Factor de necrosis tumoral

TUNEL. Desoxinucleotidil transferasa terminal dUTP Nick end labeling

ÍNDICE

1.RESUMEN	1
2.INTRODUCCIÓN	2
3.TEJIDO TESTICULAR	5
4.ESPERMATOGÉNESIS EN RATA	8
5.FITOESTRÓGENOS	12
6.RECEPTORES ESTROGÉNICOS	14
7.COUMESTROL	15
8.QUITOSÁN	17
9.OBJETIVOS	18
9.1 Objetivo general	18
9.2 Objetivos específicos	18
10.HIPÓTESIS	18
11.METODOLOGÍA	18
12.PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	21
12.1 Toma de muestras	21
12.2 Fijación de tejidos	21
12.3 Procesamiento de tejidos	21
12.4 Microtomía	22
12.5 Tinción	22
13.MORFOMETRÍA	23
14.PRUEBA DE TUNEL. DETECCIÓN DE APOPTOSIS.	23
14.1 Procedimiento para el análisis de apoptosis	23
15.DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA	25
16.RESULTADOS	26
16.1 MORFOMETRÍA CELULAR	26
16.2 APOPTOSIS	32
16.3 FLUORESCENCIA	32
17.DISCUSIÓN	33
18.CONCLUSIONES	36
19.REFERENCIAS	38

1. RESUMEN

El coumestrol (COU), de acuerdo a su estructura química, pertenece a la familia de fitoestrógenos de los coumestanos, (Setchell *et al.*, 1981; Glitsso *et al.*, 2000; Lenis *et al.*, 2010). Los fitoestrógenos son sustancias producidas por las plantas con una estructura similar al estradiol-17 β , por lo que imitan la acción de los estrógenos e ingresan a las células blanco y al unirse a receptores estrogénicos α y β como antagonistas, produciendo alteraciones en el aparato reproductor de los machos, y su respuesta es dependiente de la dosis aplicada (Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

La quitina es un polisacárido distribuido en la naturaleza como principal componente del exoesqueleto de los crustáceos (Şenel y Mclure, 2004) y tiene la capacidad de formar geles en pH ácidos por su naturaleza policatiónica (Şenel y Mclure, 2004). El quitosán es un polímero de acetil-glucosamina obtenido de una desacetilación termoalcalina heterogénea de la quitina (Hernández-Cocoltzi *et al.*, 2009) cuya biodegradación lleva a la liberación de aminoazúcares, que se incorporan a las vías metabólicas de las glicoproteínas (Zhang y Neau, 2002).

Se utilizaron 45 ratas macho raza Wistar de 9 semanas de edad, asignadas a 3 grupos de manera aleatoria, cada grupo conformado por 15 animales. Correspondiendo al grupo 1, los animales control; al grupo 2 los animales implantados con 800 μ l de coumestrol/ 300 μ l quitosán vía subcutánea y al grupo 3 los animales implantados con 1600 μ l de coumestrol/ 300 μ l de quitosán vía subcutánea; se mantuvieron con el implante por cuatro semanas y a partir de la semana 5 se obtuvieron los testículos de 3 animales de cada grupo por semana hasta finalizar en la semana 9, a éstas muestras se les realizó un procesamiento histológico y tinción con Hematoxilina y Eosina para realizar la medición de área y diámetro del túbulo seminífero, así como grosor del epitelio germinal y espacio intersticial entre cada túbulo. Se realizó una morfometría celular donde se contaron y compararon estadísticamente el número de células Leydig, Sertoli, espermatogonias, espermátocitos y espermátides elongadas, además de microscopía de fluorescencia para medir la intensidad de pixeles fluorescentes y se valoró el índice apoptótico (IA) con pruebas de inmunohistoquímica mediante el sistema de TUNEL.

Se analizaron los resultados estadísticamente de manera independiente para conocer la relación que existe entre tratamientos con pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney tomando como valor de significancia $p < 0.05$, encontrando una disminución en el número total de espermatogonias, espermátides elongadas y espermátocitos con un efecto más agudo en el tratamiento de 1600 μ g de mientras que con el tratamiento de 800 μ g de COU se observó un efecto inicial más lento. En ambos tratamientos los efectos fueron similares en lo referente a la cantidad de CL en cambio en las CS se observó un efecto más agudo y sostenido en el tratamiento

800 µg de COU. Refiriéndose al epitelio germinal, diámetro y área de los túbulos seminíferos, en ambos tratamientos se presentó un aumento significativo, que a lo largo de las semanas fue disminuyendo, situación que coincide con la recuperación de las células germinales observadas al final del tratamiento.

Ambos tratamientos provocaron daños en el tejido testicular de ratas macho Wistar al ser administrados vía subcutánea utilizando al quitosán como vehículo, lo que indica una distribución del fitoestrógeno en los tejidos reproductivos que ejerce deficiencias en la reproducción, de esta manera, utilizando un enfoque médico preventivo, en este proyecto se emplea un método innovador para alterar la fertilidad con agentes no letales (quitosán-coumestrol) que preservarán la salud y el bienestar animal contribuyendo a la disminución de la fauna nociva.

2. INTRODUCCIÓN

Siempre que exista la presencia de animales domésticos y silvestres, principalmente aves y mamíferos, en zonas donde habitan o trabajan los humanos existe el peligro de adquirir una enfermedad procedente de los animales. (Cruz-Reyes, 2009).

El principal problema que impide abatir la sobrepoblación de perros y gatos es la falta de educación e irresponsabilidad de quienes adquieren una mascota (Sánchez *et al.*, 2010), ya que, en la mayoría de los casos ese animal queda sin ningún cuidado y protección, por lo tanto no recibe ninguna vacuna y mucho menos se le somete a un esquema de desparasitación, lo que se convierte en un motivo de preocupación (Pérez-Rivero, 2011). Debido a esto, se incrementa el número de casos de enfermedades transmitidas al hombre representando un problema social y de salud pública (Castillo *et al.*, 2000).

En el Distrito Federal, según cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2013) para el año 2010, existían, 112 millones 336 mil 538 habitantes en México y se calculaban un total de 1 200 000 animales domésticos entre perros y gatos, de los cuales actualmente se estima que un 10% se encuentra en situación de calle, es decir 120 000, a una razón de 9 habitantes por perro (Secretaría de Salud, 2014), siendo las delegaciones políticas Gustavo A. Madero, Iztapalapa, Milpa Alta y Xochimilco las que concentran la mayor parte de la población canina (Universo de Salud, 2003).

Los animales ferales son hospederos de parásitos como los ooquistes de *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium spp.*, quistes de *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* y huevos de *Ascaris lumbricoides* por lo tanto actúan como "transporte" diseminador de estos agentes (Traub *et al.*, 2002; Giangaspero *et al.*,

2007; Cruz-Reyes, 2009); dichos parásitos y sus huevos se encuentran en las heces fecales, existiendo la posibilidad de que cuando el excremento se seca, éstos sean acarreados por el viento contaminando el ambiente, y así ingresen al aparato respiratorio y/o digestivo del humano e infectarlo (Pérez-Rivero, 2011).

Entre las enfermedades infecciosas que afectan a las pequeñas especies (perros y gatos) y son de notificación obligatoria se encuentran infección por coronavirus canino (*Alphacoronavirus / Alphacoronavirus 1*), dipilidiosis (*Dypilidium caninum*) dirofilariasis canina, (*Dirofilaria immitis*), enfermedad de chagas / tripanosomiasis americana (*Trypanosoma cruzi*), equinococosis (*Echinococcus granulosus*), fiebre de las montañas rocosas (*Rickettsia rickettsii*), hepatitis infecciosa canina (*Mastadenovirus, Adenovirus Canino Tipo 1*), influenza canina (*Influenzavirus A*), infestación por pulgas (*Ctenocephalides canis*), infestación por garrapatas (*Dermacentor variabilis*), moquillo / distemper canino (*Morbillivirus*), parainfluenza canina (*Virus de Parainfluenza Tipo II, Paramixovirus*), parvovirus canina (*Protoparvovirus*), traqueobronquitis canina (*Adenovirus Canino Tipo II y/o Bordetella bronchiseptica*), bordetelosis felina (*Bordetella bronchiseptica*) dermatofitosis (*Microsporium canis*), infección por calicivirus felino (*Vesivirus*), inmunodeficiencia viral felina (*Lentivirus*), leucemia viral felina (*Gammaretrovirus*), neumonitis infecciosa felina o clamidiosis felina (*Chlamydomphila felis*), panleucopenia felina o enteritis infecciosa felina (*Parvovirus*), peritonitis infecciosa felina (*Alphacoronavirus / Coronavirus Felino*), rinotranqueítis viral felina (*Herpesvirus Felino Tipo 1*) (SAGARPA, 2016).

A pesar de los adelantos alcanzados en el control de enfermedades y la extensión de la cobertura de los servicios de salud, la incidencia de las zoonosis sigue siendo alta tanto en los países en vías de desarrollo (México) como en los desarrollados (Calvo y Arosamena, 2009), en donde las personas están expuestas a contraer los padecimientos durante la convivencia diaria con los animales (Secretaría de Salud, 2001).

Ante la presencia de fauna feral, el procedimiento lógico es tratar de evitar que se reproduzca y por lo tanto prolifere, por lo que se requiere aprender a controlarla en forma específica, evitando así la afectación de especies no sujetas a control, tratando de encontrar un equilibrio en la población (Cruz-Reyes, 2009).

Las acciones de medicina preventiva por parte del Sector Oficial para perros y gatos se basan en la atención médico veterinaria encaminada a la prevención de enfermedades zoonóticas por medio de vacunación, y desparasitación; las cuales son proporcionadas de manera gratuita por los médicos veterinarios adscritos al Centro de Atención Canina (Gaceta Oficial del D.F., 2013). La Secretaría de Salud y el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (2010),

ofrecen para el manejo de la población canina y la prevención de zoonosis soluciones que se basan en la eutanasia, esterilización y aplicación de vacunas, cada año son destinados recursos económicos importantes para llevar a cabo campañas que enfrenten el problema de la sobrepoblación de fauna feral. El presupuesto asignado a este organismo, para el año en curso, referente a la esterilización mediante procedimientos quirúrgicos, es de \$1 200 000.00, con el cual se realizan orquiectomías en machos y ovariectomías en hembras (Secretaría de Salud, 2014).

Las intervenciones quirúrgicas son efectivas al cien por ciento, pero requieren de anestesia general; lo que se asocia a inversión de tiempo para la cirugía y la recuperación post operatoria (Zenteno, 2011), y debido a que el uso de anestésicos implica un riesgo de muerte o disminución (pasajera o permanente) de las capacidades vitales del paciente sometido a anestesia (Burzaco y Martínez, 2001), convierte a la esterilización quirúrgica en un método efectivo pero riesgoso, además de no ser apto para la esterilización de gran cantidad de animales.

En la actualidad, se ha dado a conocer un método de esterilización no quirúrgico en los perros machos que consiste en una inyección intratesticular de gluconato de zinc y arginina que se realiza en forma rápida y requiere de menos equipos para su aplicación, así como de menos cuidados postquirúrgicos, con una eficacia cercana al 100% (Martínez, 2006).

Los medicamentos y vacunas anticonceptivas funcionan por efecto farmacológico específico o promoviendo una respuesta inmunológica que inhiba o promueva el bloqueo de algún componente del sistema reproductivo animal, este puede ser a nivel neuroendocrino o inclusive a nivel local dentro de las gónadas, teniendo como consecuencia la infertilidad. Estos productos hacen más sencilla la esterilización, por ser más simples de utilizar que los métodos quirúrgicos. Algunos de los fármacos utilizados comúnmente para reducir la fertilidad son los estrógenos y los progestágenos que intervienen sobre la producción de testosterona y sobre la espermatogénesis (Allen, 1992), estos fármacos son altamente eficaces, pero producen efectos secundarios tales como el desarrollo de hiperplasia quística endometrial (piometra) e hiperplasia glándulo-quística del útero, acción diabética, aumento del riesgo de aparición de tumores de mama y del resto del aparato genital, alteración de forma permanente de la calidad del semen, entre otros (Mir y Fontaine, 2010).

El presente proyecto abordará un enfoque médico preventivo en el cual se empleará un método innovador para alterar la fertilidad, el cual utiliza agentes no letales, acorde a las normativas internacionales de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (OIE, 2009) y que preservará la salud y el bienestar animal contribuyendo a la disminución de riesgos sanitarios por causa de la fauna nociva.

Debido a que no es posible utilizar al perro y al gato como modelos experimentales porque son considerados animales domésticos y no son criados con fines de experimentación, se respetará la Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal (2002) la cual en su artículo 47 menciona que: "es aprobada la experimentación con animales siempre y cuando se realicen apegados a las normas oficiales mexicanas sobre el tema y cuando estén plenamente justificados ante los comités institucionales de bioética, los cuales, entre otras cosas tomarán en cuenta que: 1. Los experimentos sean realizados bajo la supervisión de una institución de educación superior o de investigación con reconocimiento oficial y que la persona que dirige el experimento cuente con los conocimientos y la acreditación necesaria; 2. Los resultados experimentales deseados no puedan obtenerse por otros procedimientos o alternativas; 3. Las experiencias sean necesarias para el control, prevención, diagnóstico o tratamiento de enfermedades que afecten al ser humano o al animal y cuando los experimentos no puedan ser sustituidos; 4. Las pruebas se realicen en animales criados para tal fin", por lo tanto, este proyecto fue sometido y aprobado de acuerdo al Comité Interno del Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (DCBS.CICUAL.12.12) utilizará como modelo de estudio a la rata (*Rattus rattus*) siguiendo la normatividad vigente en México NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

3. TEJIDO TESTICULAR

Los testículos forman parte de los órganos genitales masculinos, son órganos pares, de forma ovoide, localizados dentro del escroto fuera de la cavidad abdominal y se encuentran suspendidos por el extremo del cordón espermático, que a su vez está formado por el conducto excretor, conductos deferentes, vasos sanguíneos y nervios que llegan directamente al testículo (Russell *et al.*, 1990); realizan dos funciones principales: la biosíntesis de hormonas esteroideas y la producción de espermatozoides (Carreau *et al.*, 2002). Están cubiertos por la túnica albugínea, ésta se extiende en la parte posterior del testículo y forma un engrosamiento de tejido conjuntivo que penetra al órgano llamado mediastino. A partir del mediastino y hasta la túnica albugínea se extienden radialmente los tabiques testiculares, que son estructuras en forma de bloques delgados y fibrosos que dividen al órgano en lóbulos testiculares (Benson, 1988; Fernández-Soto, 2012), dichos lóbulos contienen a los túbulos seminíferos delimitados por la membrana basal, fibroblastos y células peritubulares mioideas, en el interior de los túbulos se pueden distinguir las células de Sertoli y las células germinales. En el intersticio se pueden encontrar

células mioides peritubulares con capacidad contráctil (Marina, 2003). Los túbulos forman un bucle, se repliegan sobre sí mismos y recorren un trayecto recto que continúa hasta la rete de testis, un sistema de canales dentro del mediastino. La túnica vascular del testículo se localiza en la parte interna de la túnica albugínea, provista de numerosos vasos sanguíneos y de tejido conjuntivo denso (Russell *et al.*, 1990).

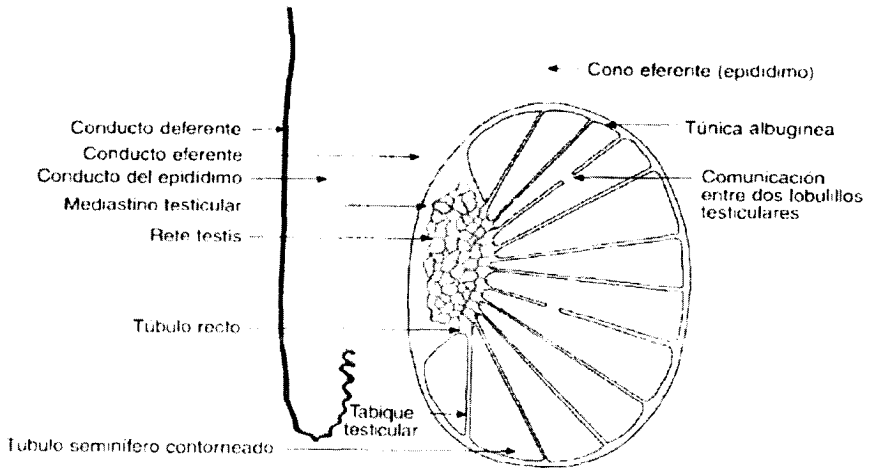


Figura 1. Estructura del testículo. Fuente: Geneser, 2007

El epitelio seminífero (Figura 2) está compuesto por dos poblaciones de células: células germinales y células de Sertoli (Kerr *et al.*, 1984; Fernández-Soto, 2012), las cuales forman parte de la barrera hemato-testicular, que es una barrera física entre los vasos sanguíneos y los túbulos seminíferos en los testículos formada por una unión estrecha, una cavidad de salida y uniones adherentes entre las células de Sertoli (Cheng *et al.*, 2011).

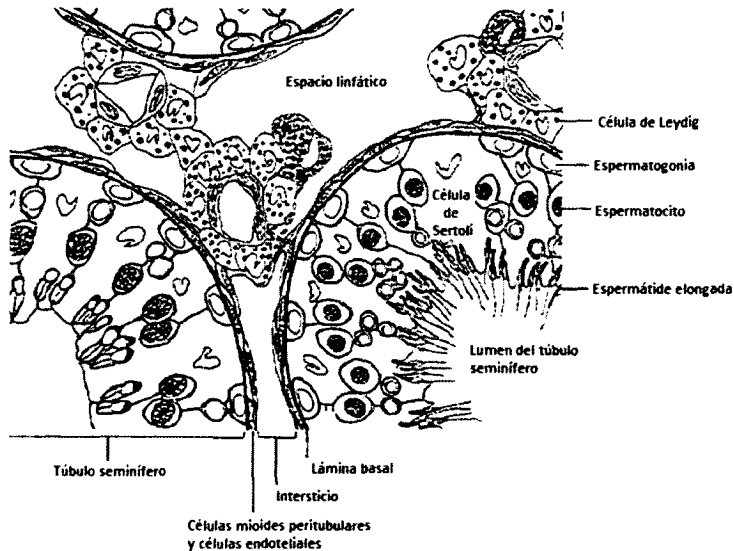


Figura 2. Representación sistemática de una sección transversal a través de parte de un testículo de rata. Modificada de Jacobus, 1992.

Las células germinales, comprenden las espermatogonias, espermaticitos I y II, espermátides y espermatozoides (Marina, 2003) y se organizan entre las células de Sertoli, las cuales son células epiteliales somáticas fijadas a la membrana basal del tubo seminífero que en la edad adulta estimulan e inducen la espermatogénesis, estas poseen un núcleo irregular y un gran nucléolo, no sufren ningún tipo de división y forman parte del soporte estructural y de la nutrición de las células germinales en desarrollo, además tienen actividad fagocitaria de las células germinales en degeneración y cuerpos residuales (Johnson *et al.*, 2008).

Dentro de estas células se pueden encontrar receptores para la hormona foliculo estimulante (FSH) y testosterona; además, reciben estímulos endócrinos (FSH) y parácrinos procedentes de las células de Leydig, de las células mioides peritubulares y de las células germinales (Skinner, 1991). También intervienen en la producción de proteínas que regulan y/o responden a la liberación de hormonas hipofisiarias e influyen en la actividad mitótica de las espermatogonias (Johnson *et al.*, 2008)

La barrera hematotesticular es una barrera física entre los vasos sanguíneos y los túbulos seminíferos en los testículos. Ésta barrera está formada por una unión estrecha, una cavidad de salida y uniones adherentes entre las células de Sertoli. (Cheng *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

Ubicado entre los túbulos se encuentra el tejido intersticial en donde se localizan las células de Leydig, su forma es poligonal y poseen un núcleo redondeado (Marina, 2003), están involucradas en la secreción de andrógenos, principalmente testosterona, así como de otros esteroides incluyendo a los estrógenos (O'Donnell et al, 2008).

4. ESPERMATOGÉNESIS EN RATA

La espermatogénesis es un proceso que ocurre en los testículos, mediante el cual la célula germinal inmadura se divide mediante meiosis y se diferencia para dar lugar a espermátides elongadas haploides en un periodo de 48-53 días en ratas (Clermont, 1972). Este proceso es considerado cronológico y tiene lugar dentro de los túbulos seminíferos del testículo (O'Donnell *et al.*, 2008).

Las espermatogonias son las células germinales más inmaduras en el testículo e incluyen a la espermatogonia tipo A, una espermatogonia intermedia (exclusiva de roedores) y la espermatogonia tipo B (Clermont, 1972); éstas se someten a numerosos procesos mitóticos para producir un gran número de células germinales disponibles para entrar en un proceso meiótico. Después de la última mitosis ocurrida en la espermatogonia tipo B, se forman los espermatocitos primarios, éstos experimentan un proceso de división meiótica, con sus respectivas fases, lo que los convierte en espermatocitos preleptotenos (Russell *et al.*, 1990), es así como en la fase de cigoteno, ocurre un emparejamiento de los cromosomas homólogos; los espermatocitos paquitenos serán células con un par completo de cromosomas; continúa una fase de diploteno, en donde los pares de cromosomas se separan parcialmente y las células se someten a la primera fase de división meiótica para producir espermatocitos secundarios, estas células se someten rápidamente a una segunda división meiótica para producir espermátides haploides (O'Donnell *et al.*, 2008).

El desarrollo de la morfología celular en el epitelio germinal constituye el ciclo del epitelio seminífero, dicho desarrollo está asociado íntimamente con las células de Sertoli y cada asociación particular de las células germinales se refiere a una etapa del ciclo. El número de etapas de la espermatogénesis está definida por el número de células germinales morfológicamente reconocidas en el testículo, en la rata existen 14 etapas (Figura 3) (Russell *et al.*, 1990).

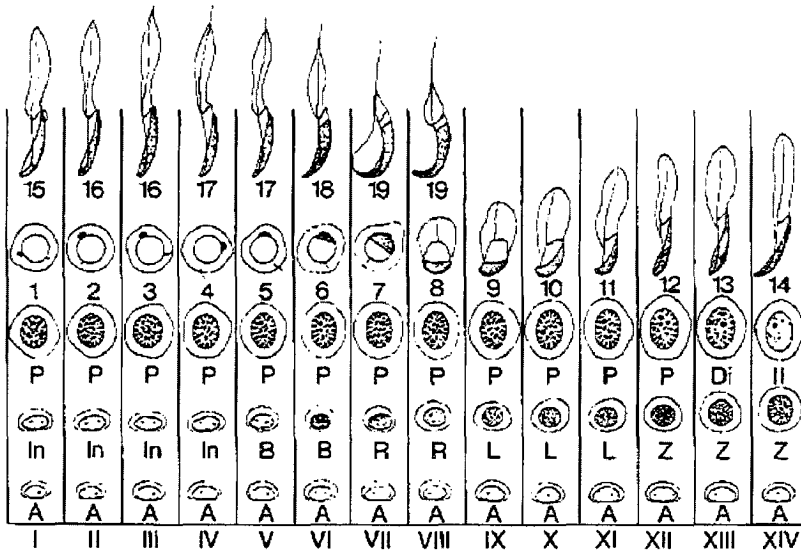


Figura 3. Diagrama que ilustra la asociación celular de las 14 fases del ciclo del epitelio seminífero en la rata. A= espermatogonia tipo A; In= espermatogonia intermedia; B= espermatogonia tipo B; R= espermatozoides preleptoteno; L= espermatozoides leptoteno; Z= espermatozoides zigoteno; P= espermatozoides paquíteno; Di= espermatozoides primario en la etapa diploteno; II= espermatozoides secundario; 1-19= espermátides en las fases sucesivas de la espermiogénesis (Dym y Clermont, 1970).

Las etapas de la espermatogénesis requieren de una progresión continua del ciclo celular, por lo que las células germinales se vuelven susceptibles a un proceso celular activo llamado apoptosis (Royere *et al.*, 2004) que se caracteriza por una condensación nuclear y una fragmentación enzimática de DNA (Kerr *et al.*, 1972; Whyllie *et al.*, 1992; Homma-Takeda *et al.*, 2001).

Las células apoptóticas sufren cambios morfológicos, especialmente en la superficie de la célula y en el núcleo y el proceso puede ser iniciado por estímulos externos (vías extrínsecas) o internos (vías intrínsecas), que incluyen la unión de la superficie de la célula a receptores, tratamientos con agentes citotóxicos, daño en el DNA o estrés oxidativo (Martí *et al.*, 2008) así como de factores etiológicos que incluyen el criptorquidismo, exposición al calor, irradiación y la restricción de gonadotropinas (Sakkas *et al.*, 2003).

La vía extrínseca requiere de una unión entre los receptores de muerte encontrados en la superficie de la membrana celular y sus respectivos ligandos (Scaffidi *et al.*, 1998; Indrant *et al.*, 2011). Los receptores involucrados en esta vía son los pertenecientes a la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF)

tales como el CD95 (Fas) y el NF-relacionado con apoptosis que inducen a los receptores ligando (TRAIL). Estos receptores tienen un dominio extracelular para acoplarse a los ligandos y un dominio citoplasmático intracelular que también se conoce como el dominio de muerte. El dominio de muerte es responsable de transmitir la señal de la muerte de la superficie a las vías de señalización intracelular (Aschkenazi y Dixit, 1998; Indrants *et al.*, 2011).

La activación de los receptores CD95 o TNF conducen al reclutamiento intracelular de proteínas en un complejo de señal de muerte inducida (DISC) que activa una caspasa iniciadora (procaspasa 8), que a su vez activa la fase de ejecución de la apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 (Hengartner, 2000); dichas caspasas pueden inducir un daño mitocondrial y controlar la intensidad de la señal de muerte al facilitar la salida de proteínas amplificadoras de muerte del espacio intermembranal mitocondrial (Elmore, 2007).

Por su parte, la vía intrínseca puede ser activada por una variedad de estímulos independientes del receptor tales como la radiación, los radicales libres, infecciones virales, etc; estos factores dan lugar a cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna debido a la apertura de la permeabilidad de transición mitocondrial (MPT) del poro. Las principales consecuencias de este cambio de permeabilidad son la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de proteínas pro-apoptóticas y la interrupción de la función bioenergética de los organelos. Las proteínas liberadas pueden clasificarse en dos categorías: La primera categoría se compone de proteínas que pueden activar la vía dependiente de caspasa, este grupo incluye proteínas como el citocromo C (CYTC) y Smac/DIABLO (segundo activador derivado de mitocondrias de las caspasas). El holocitocromo C induce a la oligomerización de Apaf-1, que conduce a la activación de la caspasa 9. Este complejo de citocromo activo c/ Apaf-1/caspasa 9 forma al apoptosoma que a su vez activa las caspasas 3 y 7 resultando el desmantelamiento de la célula a través de la fragmentación nuclear (Gross *et al.*, 1999; Hengartner, 2000). El Smac / DIABLO une a los inhibidores de proteínas apoptosis (PAI) y los desactiva, evitando así que el proceso de apoptosis sea detenido y permita la progresión del mismo (Scaffidi *et al.*, 1998; Indrants *et al.*, 2011). La segunda categoría incluye otras proteínas pro-apoptóticas como el factor de inducción de la apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (Endo G). La liberación de estas proteínas es un evento tardío en la apoptosis, que se produce una vez que las células se comprometen a morir. Tras la liberación del AIF, se transloca el núcleo donde se promueve la fragmentación de DNA. Tanto el AIF como la Endo G actúan de manera independiente de las caspasas al ejecutar la muerte celular (Jaza *et al.*, 2001).

El proceso de apoptosis es necesario para el desarrollo de la espermatogénesis a partir de las células germinales para mantener un balance entre éstas y las células de Sertoli (Martí *et al.*, 2008) y ocurre principalmente en las etapas XII-XIV y I de la espermatogénesis durante la diferenciación de la espermatogonia tipo A, espermátocitos cigoteno y paquiteno y la división meiótica de las células (Allan *et al.*, 1992; Jahnukainen *et al.*, 2004).

La diferenciación de las espermátides redondeadas a espermátides maduras elongadas toma lugar, sin más división, durante la espermiogénesis la cual involucra la formación y desarrollo del acrosoma y flagelo así como la condensación de la cromatina, remodelación y elongación de los núcleos y la remoción del citoplasma liberado de la espermátida durante la espermiación (Leblond y Clermont 1952; Russell *et al.*, 1990; O'Donnell *et al.*, 2008).

La espermiación es el paso final de la espermatogénesis e involucra la liberación de las espermátides elongadas maduras de las células de Sertoli a través del túbulo seminífero las cuales pasan hacia el lumen del túbulo seminífero y a través del sistema de conductos excluyente conocido como la rete de testis, llegan hasta al epidídimo por vía de los conductos eferentes (Russell, 1993; Schlatt y Ehmcke, 2014).

Además de la producción de espermatozoides, los testículos se encargan de la producción de hormonas (Figura 4), estas son requeridas para el desempeño de funciones sexuales secundarias así como de la retroalimentación positiva en el hipotálamo y la glándula pituitaria para el control de la secreción de gonadotropinas como lo son la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo estimulante (FSH). La LH estimula la secreción de andrógenos (testosterona) en las células de Leydig que actúan en los receptores androgénicos en el epitelio seminífero controlando la acción de la periferia; la FSH actúa específicamente sobre las células de Sertoli e influye directamente con la proliferación celular; son las mayores reguladoras endócrinas de la espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1993; Sharpe, 1994; McLachlan *et al.*, 1996; O'Donnell *et al.*, 2008).

También existen retroalimentaciones negativas, donde los andrógenos, estrógenos e inhibina influyen en la secreción de gonadotropina para disminuir y regular la liberación de FSH y LH en el hipotálamo (Finkelstein *et al.*, 1991; Bagatelle *et al.*, 1994; Hayes *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2001; O'Donnell *et al.*, 2008) (Figura 4).

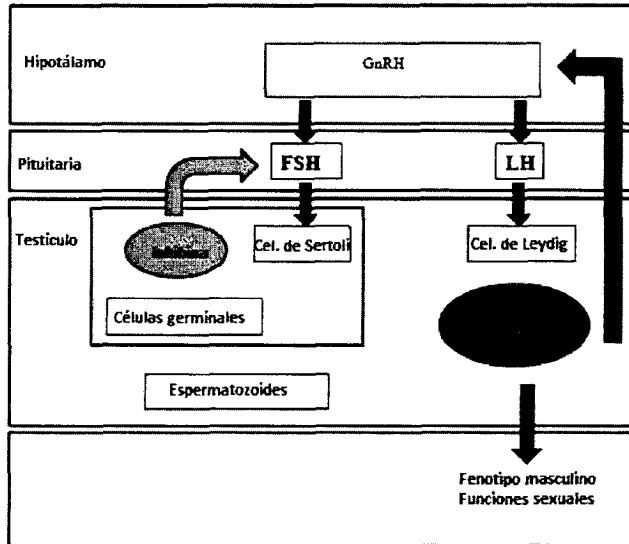


Figura 4. Diagrama esquemático ilustrando un modelo para el control hormonal de la función testicular. Fuente: Schlatt y Ehmcke, 2014

5. FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos son sustancias producidas por las plantas con una estructura similar al estradiol-17 β , por lo que imitan la acción de los estrógenos e ingresan a las células blanco. Se dividen de acuerdo a su estructura química en varios grupos o familias: isoflavonas, flavonas, lignanos y los coumestanos; existen puntos de concordancia entre ellos con respecto a su estructura química, uno de ellos es la posición de los grupos hidroxilo, que es una característica química importante para la actividad estrogénica como se muestra en la Figura 5 (Pérez-Rivero, 2009).

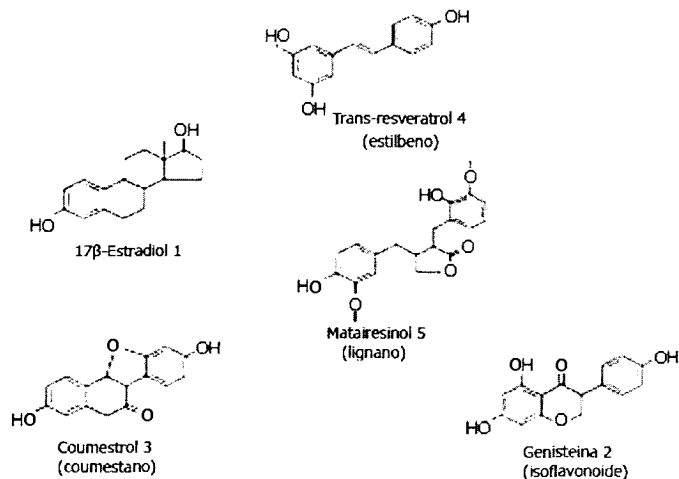


Figura 5. Estructura química de los principales compuestos fitoestrogénicos. Adaptado de Lenis *et al.*, 2010).

Éstos se comportan imitando la acción de los estrógenos, es decir, ingresando a las células blanco (testículos, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, próstata, ovarios, glándula pineal, tiroides, epitelio intestinal, etc.) las cuales presentan receptores estrogénicos (Mosselman *et al.*, 1996; Weihua *et al.*, 2003; Lenis *et al.*, 2010) y debido a que los estrógenos poseen la capacidad de unirse a la forma citoplasmática del receptor nuclear, tienen el potencial de afectar la síntesis de esteroides y el metabolismo a través de diversas vías (Wang *et al.*, 1994).

Los testículos son capaces de sintetizar y responder ante los estrógenos (O'Donnell, 2008) por lo que los fitoestrógenos, al presentar una estructura similar a los estrógenos, compiten contra la unión estrogénica en los ER, además se ha descrito que pueden disminuir los niveles de estrógeno a través de la inhibición de la actividad de la aromatasa (Le Bars *et al.*, 1990; Valderrabano, 1992; Lenis *et al.*, 2010) a lo que se atribuyen las alteraciones en los túbulos seminíferos (Serrano *et al.*, 2014), ya que en perros (Juniewicz *et al.*, 1988) y en ratas (Turner *et al.*, 2000) se ha reportado que la administración de inhibidores de la aromatasa causan un incremento en suero de LH y testosterona así como un incremento en la FSH circulante.

La administración o deficiencia de estrógenos puede afectar el desarrollo y/o el mantenimiento del eje hipotálamo-pituitaria-testículos del cual depende la espermatogénesis, así que un balance adecuado de los estrógenos es una

consideración importante para evitar problemas reproductivos (Weinbauer y Nieschlag, 1993; Sharpe, 1994; McLachlan *et al.*, 1996; O'Donnell *et al.*, 2008).

6. RECEPTORES ESTROGÉNICOS

A fin de cumplir su rol biológico, los estrógenos testiculares deben interactuar con receptores estrogénicos (ERs) (Carreau *et al.*, 2007). Los ERs son miembros de la familia de los receptores nucleares activados por ligandos, de los que también forman parte receptores para hormonas esteroidales, hormona tiroidea, vitamina D, etc. (Mangelsdorf *et al.*, 1995) y junto con la aromatasa, se encuentran en todas las fases del desarrollo testicular de los roedores (Gustafson y Donahoe, 1994; Hughes, *et al.*, 1999; Capel, 2000).

En 1996 se reportó una nueva forma de receptor estrogénico en especies que incluían a los ratones, ratas y humanos (Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996; O'Donnell *et al.*, 2008). A esta nueva forma se le denominó como receptor estrogénico beta (ER β) mientras que el receptor estrogénico "clásico" se le renombró como receptor estrogénico alfa (ER α) (O'Donnell *et al.*, 2008) (Figura 6).

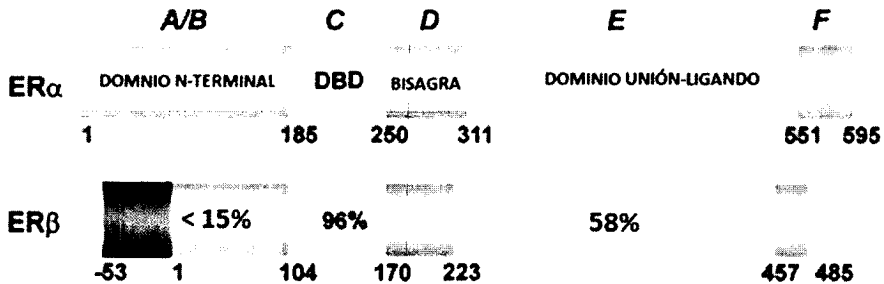


Figura 6. Comparación de la estructura de ER α y ER β . Dominios funcionales A-F y se muestra el porcentaje de homología de los ER β comparados con los ER α . Se muestra el dominio N-terminal (A/B), dominio de unión al DNA (DBD) (C), la región de bisagra (dominio D), dominio de unión del ligando (E) y la región terminal (F). Adaptado de O'Donnell *et al.*, 2008.

Existe especificidad en el tejido en cuanto a la expresión del ER α y del ER β ; el ER α se expresa en útero, hígado, músculo esquelético, pituitaria e hipotálamo; mientras que el ER β se expresa de mayor forma en ovarios, testículos y próstata, así como en regiones del cerebro que incluyen el sistema límbico y la corteza cerebral (Couse *et al.*, 1997; Shughrue y Merchenthaler, 2000). La base molecular de la acción específica en el tejido es una compleja interacción de los receptores estrogénicos (ER) los cuales tienen dominios coactivadores, los cuales se encuentran

involucrados en la activación del mecanismo de transcripción (Diel *et al.*, 2002), en donde el ligando se une a los ER (Gee *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1997).

Éstos receptores se encuentran de forma inactiva en el citoplasma celular y están unidos a dos proteínas de choque térmico (hsp70 y hsp90) que actúan como chaperonas; dichas proteínas se disocian del receptor cuando este se une a la hormona, es decir al ligando específico, lo que permite que el receptor cambie su conformación y morfología para que queden disponibles regiones del receptor que no lo estaban lo que le permitirá ser transportado hacia el núcleo para unirse al elemento de respuesta a la hormona e iniciar la transcripción (Hughes *et al.*, 2001).

Los ER están compuestos por seis dominios funcionales nombrados de la A-F; el dominio A/B, amino terminal (N-terminal), contiene la región de función de activación 1 (TAF1) para la transcripción; en el dominio C se encuentran los dedos de zinc, donde se llevará a cabo la unión de la secuencia específica del DNA (O'Donnell *et al.*, 2008); la bisagra (dominio D) contiene la secuencia de localización nuclear (NIF), la cual guía al receptor desde el citoplasma al núcleo (Pérez-Rivero *et al.*, 2005); el dominio E, o dominio de unión al ligando le confiere especificidad al mismo (O'Donnell *et al.*, 2008), posee el sitio de activación 2 (TAF2) o región F, y dependiendo de la naturaleza del ligando, este puede activarse de manera agonista o antagonista, lo que determinará la conformación del TAF2 como coactivador o como correpresor (Wilson, 2003).

En general, la acción estrogénica de los ER involucra a la unión del ligando, la disociación de los complejos que actúan como chaperones, fosforilación y dimerización del receptor, translocación nuclear, interacción con cofactores y la modulación de la actividad transcripcional (O'Donnell *et al.*, 2008)

La localización de los ER α , ER β demuestran que la acción de los estrógenos es importante para el desarrollo y función de las células de Leydig, células de Sertoli y las células germinales ya son capaces de sintetizar y responder a los estrógenos a través de los ER β , lo que sugiere que las reacciones parácrinas son importantes para su desarrollo (O'Donnell, 2008).

7. COUMESTROL

El coumestrol (COU), de acuerdo a su estructura química, pertenece a la familia de fitoestrógenos de los coumestanos y es ingerido como 4' metoxi coumestrol (forma inactiva) (Setchell *et al.*, 1981; Glitso *et al.*, 2000; Lenis *et al.*, 2010). El coumestrol es un fitoestrógeno que al unirse a receptores estrogénicos α y β como antagonista, produce alteraciones en el aparato reproductor de los machos, y su respuesta es dependiente de la dosis aplicada (Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

La capacidad del COU para unirse a los ER α y ER β es conocida (Murkies *et al.*, 1998; Pérez-Rivero *et al.*, 2009); ambos tipos de receptores se hallan en los testículos. Ésta interacción COU-ER induce a una modificación en la reabsorción de fluidos a nivel de los conductos deferentes y a su vez a una reducción en el número de espermatozoides que ingresan al epidídimo. Como resultado de la alteración dinámica de los fluidos, dichos fluidos se acumulan a nivel testicular dañando el epitelio germinal de los conductos seminíferos produciendo alteraciones en el desarrollo de los espermatozoides (Hess *et al.*, 2001).

La evidencia de que el COU puede causar perturbaciones a nivel reproductivo en mamíferos fue reportada desde 1946 por Bennets *et al.*, indicando que la ingestión de pastura de trébol rica en coumestrol causa infertilidad en la oveja.

Observaciones similares se han notificado 40 años después, en vacas con perturbaciones reproductivas como resultado de la ingesta de trébol rojo (Kallela *et al.*, 1984; Reinhart *et al.*, 1999; Woclawek-Potoca *et al.*, 2013).

La alfalfa (*Medicago sativa*) presenta bajas concentraciones en condiciones normales; pero cuando es atacada por hongos patógenos, principalmente por *Pseudopeziza medicaginis* (Romero *et al.*, 1997; Lenis, 2010) produce una mayor cantidad de coumestrol (Adams, 1995; Jacob *et al.*, 2001). Está comprobado que concentraciones de 20 a 50 mg de COU por kg de alfalfa pueden inducir manifestaciones estrogénicas en los animales (Le Bars *et al.*, 1990; Valderrabano, 1992; Lenis *et al.*, 2010), por lo que un alto consumo de heno de alfalfa la cual contiene 37 mg/kg de coumestrol, puede afectar la reproducción animal o causar una enfermedad hormona-dependiente (Lookhart, 1980; Moravcová *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha descrito que la ingestión de pasturas que contienen COU, en machos bovinos, ocasiona metaplasia glandular y epitelial, tanto en las glándulas bulbo-uretrales como en la próstata, presentándose un mayor número de espermatozoides inmaduros que muestran una significativa disminución en la movilidad (Romero *et al.*, 1997; Lenis *et al.*, 2010).

En cuanto a mamíferos más pequeños, se reporta que la administración de COU en ratas macho Wistar produce un efecto de disminución del lumen de los túbulos seminíferos e incrementa el índice apoptótico de las células germinales (Lenis *et al.*, 2010). Coinciden con Pérez-Rivero *et al.*, en 2014, en donde se evaluó el efecto del coumestrol administrado vía oral (5 μ g por g de peso corporal) durante 30 días en vampiro (*Desmodus rotundus*). Se examinaron muestras de tejido testicular y se pudo observar una reducción en el grosor del epitelio germinal y una reducción en el diámetro de los túbulos seminíferos al igual que sucedió con la rata. Otros tratamientos en perros con COU vía oral tuvieron efecto dañino a nivel histológico en los túbulos seminíferos, además ningún espermatozoide se pudo distinguir en el lumen del tejido (Serrano *et al.*, 2008). Se analizó el efecto en semen de perro; el fitoestrógeno fue administrado mediante pellets con una concentración de 300 μ g durante 4 semanas; se contabilizaron 20×10^6 células espermáticas, mostrando un

descenso abrupto siendo que con los animales control se contabilizaron 352×10^6 células espermáticas (Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

En murciélagos alimentados con sangre de bovino con 200 μg de COU por un periodo de 30 días el lumen de los túbulos no era visible, las células de Leydig no estaban presentes y no fue posible detectar células espermáticas maduras (Serrano *et al.*, 2007).

El efecto del coumestrol también fue estudiado en ratas macho recién nacidos expuestos al fitoestrógeno mediante la dieta (100 ppm). Estos animales mostraron déficit en su conducta sexual al llegar a la etapa adulta, así como una tasa de eyaculación de 70%, en comparación con los machos control que mostraron una tasa de diferencia 86% (Whitten *et al.*, 2002).

8. QUITOSÁN

Actualmente se ha prestado mucha atención a los polisacáridos debido a sus propiedades tanto físicas como biológicas (Liu *et al.*, 2008). La quitina es un polisacárido distribuido en la naturaleza como principal componente del exoesqueleto de los crustáceos (Şenel y Mclure, 2004).

El quitosán es un polímero de acetil-glucosamina obtenido de una desacetilación termoalcalina heterogénea de la quitina (Hernández-Cocoltzi *et al.*, 2009) y tiene la habilidad de formar geles en pH ácidos por su naturaleza policatiónica en este tipo de medios; es hidrófilo y puede retener agua en su estructura (Şenel y Mclure, 2004).

No se reportan reacciones inflamatorias o alérgicas en su implantación, inyección o aplicación tópica (Chatelet *et al.*, 2001).

Su biodegradación lleva a la liberación de aminoazúcares, que se incorporan a las vías metabólicas de las glicoproteínas o se excretan (Zhang y Neau, 2002).

Se ha utilizado en gran medida para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (Kumar *et al.*, 2004), regeneración de tejidos, cicatrización de heridas, coagulación de la sangre, y la inmunoestimulación (Mei-Chin *et al.*, 2011) debido a su abundante disponibilidad, capacidad única de adhesión a la mucosa, a sus propiedades farmacológicas inherentes, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y baja inmunogenicidad (Kumar *et al.*, 2004).

Además, gracias a su naturaleza catiónica única y la capacidad de manejarse en forma de gel o de película, puede ser moldeado en diversas formas como por ejemplo en estructuras porosas o tubulares y permite el crecimiento de células y la conducción nerviosa (Venkatesan y Kim, 2010).

Los implantes de dicho polisacárido son biodegradables y pueden evitar problemas asociados durante la recuperación ya que eliminan la necesidad de una segunda operación quirúrgica para retirarlo; por lo tanto, el quitosán ha sido considerado como un material prometedor para el desarrollo de dispositivos médicos (Mei-Chin *et al.*, 2011).

Puede ser aplicado a una variedad de terapias contra el cáncer para mejorar su seguridad y eficacia (Vinoth-Kumar *et al.*, 2011), se han utilizado nanopartículas a base de quitosán (CNP) que de manera eficiente y biocompatible han podido encapsular fármacos para la quimioterapia de tipo hidrofóbico en sus núcleos interiores y en comparación con una formulación de fármaco libre, el CNP mostró un prolongado periodo de tiempo de circulación en la sangre, así como especificidad tumoral mejorada y una mejor eficacia terapéutica (Min *et al.* 2008).

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo general

Comparar y cuantificar los cambios histológicos a nivel de parénquima testicular entre animales tratados por vía subcutánea con implantes de quitosán-coumestrol y animales no tratados.

9.2 Objetivos específicos

- Identificar y cuantificar las células del parénquima testicular entre animales no tratados y animales implantados con coumestrol-quitosán.
- Valorar la presencia de COU unido a su receptor en el parénquima testicular.
- Valorar la presencia o ausencia de apoptosis y calcular el índice apoptótico en el parénquima testicular de animales tratados con un implante de quitosán-coumestrol.

10. HIPÓTESIS

La administración del COU vía parenteral, utilizando al quitosán como vehículo, afectará el tejido testicular de ratas macho (*Rattus rattus*) de tal manera que causará daños a nivel reproductivo.

11. METODOLOGÍA

Se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-XOC) ubicada en Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México.

Se utilizaron 45 ratas macho raza Wistar de 9 semanas de edad, provenientes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-bioterio) de la UAM-XOC, las cuales fueron asignadas a 3 grupos de manera aleatoria, cada grupo conformado por 15 animales. Al grupo 1, correspondieron los animales control; al grupo 2 a los animales implantados con 800 μ l de coumestrol/ 300 μ l quitosán vía subcutánea y al grupo 3 a los animales implantados con 1600 μ l de coumestrol/ 300 μ l de quitosán vía subcutánea.

Para la aplicación del implante, los animales fueron inducidos uno por uno, vía inhalatoria, a anestesia general con isoflurano a una concentración del 3% y se monitorearon con pulsoxímetro. Una vez inducidos se rasuró la zona a implantar (área de la cruz) y se realizó la asepsia y antisepsia de los mismos.

El implante se preparó mezclando la concentración correspondiente de COU (800 μ l o 1600 μ l) con 300 μ l de quitosán con ayuda de un agitador tipo vortex hasta que estuvieron completamente homogeneizados, Los animales fueron implantados por vía subcutánea con jeringas de insulina y agujas de calibre 23.

Los animales se alojaron en jaulas individuales y se mantuvieron con el implante por cuatro semanas, a partir de la semana 5 se realizó eutanasia a 3 animales de cada grupo por semana hasta finalizar en la semana 9. La distribución de los grupos quedó de la siguiente manera:

SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8	SEMANA 9
Control	Control	Control	Control	Control
Control	Control	Control	Control	Control
Control	Control	Control	Control	Control
TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU
TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU
TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU	TX 800 μ g COU
TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU
TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU
TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU	TX 1600 μ g COU

Se obtuvieron los testículos y se fijaron en formol buferado al 10%. El procesamiento histológico de los testículos se realizó dentro del Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la UAM-XOC y se utilizó la técnica de inmersión en parafina, realizando cortes de 5 micrometros y tinciones con Hematoxilina y Eosina según el Manual “Métodos de Laboratorio en Histotecnología” (Armed Forces Institute of Pathology, 1994).

Una vez obtenidas las laminillas con los tejidos testiculares, se tomaron microfotografías de las preparaciones histológicas con una cámara digital especializada para microscopio OPT900 realizando la medición del área, diámetro, epitelio germinal y el espacio intersticial de los túbulos seminíferos (3 túbulos por individuo) con el programa computacional Zeiss LSM5 Image Browser así como para realizar la morfometría celular, en donde se contaron y compararon estadísticamente el número de células de Leydig, Sertoli, espermatogonias, espermatoцитos y espermátides elongadas.

Se realizó la microscopía de fluorescencia con la técnica descrita por Serrano *et al.*, 2007 para comprobar la presencia del coumestrol en el tejido y se midió la intensidad de pixeles con el programa Zen 2 Blue edition® (Carl Zeis) para posteriormente realizar las pruebas estadísticas.

Para valorar el índice apoptótico (IA) se realizaron pruebas de inmunohistoquímica mediante el sistema de TUNEL según el boletín técnico DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System Promega, 2009. Se tomaron fotografías con un aumento de 20x a 10 túbulos seminíferos de cada laminilla teñida con la prueba. Fueron consideradas como células apoptóticas (+) las células cuyo núcleo apareció más oscuro.

El número de células + en 10 túbulos seminíferos entre el total de número de células se refiere al porcentaje de índice apoptótico (I.A.) es decir: $I.A. = \frac{TUNEL (+) \text{ número de células}}{\text{número total de células}} \times 100$ (Potten, 1996; Hanci *et al.*, 2013).

Se obtuvieron los promedios generales de las 9 semanas de tratamiento del grupo control y cada uno de los tratamientos así como el promedio por semana de todos los grupos para posteriormente realizar las pruebas comparativas correspondientes. Se analizaron los resultados estadísticamente de manera independiente por semana para conocer la relación que existe entre tratamientos con pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney tomando como valor de significancia $p < 0.05$.

12. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

12.1 Toma de muestras

Orquiectomía. Se anestesió al individuo con isoflourano y se mantuvo en posición decúbito dorsal con los miembros posteriores extendidos; se efectuó una incisión en el escroto y se acercó uno de los testículos hacia la herida para tener acceso al mismo, mediante una incisión en la túnica vaginal se extrajo el órgano, posteriormente se realizaron 2 ligaduras en el paquete testicular; una proximal al anillo inguinal y otra contigua posterior a la primera. Se precedió a cortar entre ambas ligaduras para obtener el testículo. El procedimiento se realizó de la misma manera para ambos testículos.

12.2 Fijación de tejidos

La fijación preserva los tejidos deteniendo la autólisis, permitiendo que permanezcan sin cambios. Los tejidos se endurecen ligeramente, pero no son frágiles, dejando estructuras de tejido en un estado real lo más natural posible, con una contracción mínima. El formol bufferado al 10% es considerado el mejor fijador ya que preserva una amplia gama de estructuras, requiere un tiempo de fijación relativamente corto y se puede utilizar para el almacenamiento a largo plazo ya que penetra rápida y uniformemente (Prophet, 1994).

Los tejidos se mantuvieron en fijación durante 2 semanas para posteriormente procesarlos.

12.3 Procesamiento de tejidos

Las tres etapas para el procesamiento de tejidos son: deshidratación, aclaramiento e infiltración, son pasos secuenciales designados para remover el agua extraíble de los tejidos y reemplazarla con medio (parafina) que solidifique y permita el seccionamiento del mismo (Prophet, 1994).

Para el procesamiento de tejidos se realizó un corte transversal de cada uno de los testículos. El procesamiento se llevó a cabo en un procesador automatizado de tejidos o histoquinete marca Leica, modelo TP1020, el cual utilizó para la deshidratación alcoholes en diferentes concentraciones, comenzando con la menor concentración; la impregnación de parafina se inició por medio de baños con benceno y la infiltración del tejido con parafina especializada para tejidos. La duración de dicho proceso es de 19hrs.

Una vez finalizado el procesamiento se embebieron los tejidos, es decir, se impregnaron con parafina líquida para facilitar el corte del tejido en secciones muy

delgadas. Para esto se utilizaron moldes en forma de cubo en los cuales se vertió la parafina líquida y después se acomodó la sección del tejido (Hall, 1994).

12.4 Microtomía

Una vez obtenidos los cubos de parafina se procedió a realizar los cortes con ayuda de un micrótopo el cual mediante una cuchilla de acero realiza cortes finos con un grosor de 5 micrómetros. Los cortes obtenidos se encontraron en forma de cintas y arrugados mostrando un área menor que la que poseen en la inclusión, por lo que fue necesario extenderlos y luego adherirlos al portaobjetos. Los cortes se extendieron al depositarlos sobre un espejo de agua, en la cual se diluye la gretina contenida en un "baño de flotación" que mantuvo la temperatura a 45°C. Las secciones se depositaron en el líquido procurando que la superficie correspondiente al filo de la navaja se pusiera en contacto con el agua. Con un portaobjetos de vidrio se tomaron las laminillas, escurrieron y colocaron sobre una platina a una temperatura de 57°C para que se derritiera la parafina y se adhiriera el tejido al portaobjetos. Trascorridos 10 min, se retiraron y rotularon las laminillas para continuar con el proceso de tinción (Montalvo, 2010).

12.5 Tinción

Se utilizó un método de tinción con hematoxilina de Harris junto con eosina, el cual tiñó todas las estructuras tisulares como el núcleo, citoplasma y tejido conectivo en tonos azul y púrpura debido a la característica catiónica o básica de la hematoxilina, la cual tiñe estructuras ácidas (basofilas), la eosina tiñó los componentes básicos (acidofilas) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma (Allen, 1994).

Dicho procedimiento se llevó a cabo mediante un tren de tinción el cual inició sumergiendo los tejidos en xilol 10 veces para desparafinizar los tejidos, después se sumergieron 10 veces en diferentes concentraciones de alcohol (absoluto, 80%, 70%, 50%) para rehidratar los tejidos, se lavaron en agua destilada para eliminar el exceso de alcohol y se sumergieron en hematoxilina durante 3 minutos, se lavó en agua corriente para eliminar excesos y se pasó rápidamente por alcohol ácido realizando un lavado nuevamente, posteriormente se sumergieron en agua amoniacal al 5% para intensificar el color basofílico, de nuevo se lavó con agua corriente y se sumergió durante 1:30 min en eosina; finalmente se pasó por otra serie de alcoholes (96%, 96% y absoluto) para eliminar los excesos del colorante y por último se deshidrató la muestra en baños de xilol para que se pudiera realizar el montaje con un pegamento no soluble en agua (Procedimiento adaptado de Armed Forces Institute of Pathology, 1994).

13. MORFOMETRÍA

Se utilizó la técnica descrita por Kurowicka *et al.*, 2015, en donde secciones del órgano reproductivo, es decir, los túbulos seminíferos, fueron el objeto de estudio. Se seleccionaron los túbulos más redondos y se tomaron microfotografías, posteriormente se midió el diámetro de los túbulos (10 túbulos por individuo) para obtener el área, el grosor del epitelio germinal y el espacio intersticial con el programa computacional LSM 5® (Carl Zeiss), además se contaron las células de Sertoli, Leydig, espermatogonias, espermatoцитos y espermátides elongadas.

14. PRUEBA DE TUNEL. DETECCIÓN DE APOPTOSIS.

El método de TUNEL (*Trasferase-mediated dUTP Nick End Labeling*), es un método inmunohistoquímico que por medio de microscopía permite determinar la presencia de fragmentación del ADN en células individuales al darnos a conocer la cantidad de células apoptóticas totales. Éste es un método de marcaje de ADN en hebras sencillas por medio de una tranferasa terminal recombinante (rTdT) que adiciona bionucleótidos marcados al ADN en los extremos 3'-OH; posteriormente, el Streptavidin HRP (*horseradish peroxidase-labeled streptavidin*) se liga a los bionucleótidos que son detectados por medio de un sustrato de peroxidasa, peróxido de hidrógeno que bloquea las peroxidasas endógenas; finalmente para que se produzca una reacción café en los núcleos con ADN fragmentado, es decir apoptóticos, se utiliza un cromógeno estable, diaminobenzidina (DAB) (Alfaro *et al.*, 2000).

Se utilizó el kit de detección de apoptosis DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System marca Promega para 40 reacciones.

14.1 Procedimiento para el análisis de apoptosis

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del boletín técnico del kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System.

Se comenzó desparafinizando los tejidos con inmersiones en xilol durante 5 min a temperatura ambiente, repitiendo la acción 2 veces, las laminillas se lavaron en alcohol absoluto durante 5 min y se repitió el lavado durante 3 min, las muestras se rehidrataron mediante un lavado en etanol al 95%, 85%, 70% y 50% durante 3 min y posteriormente se lavaron en inmersiones de NaCl al 0.85% durante 5 min y en inmersiones de PBS durante 5 min.

Se fijó el tejido sumergiendo las laminillas en formol bufferado en PBS al 10% durante 15 min y se enjuagaron en una solución tampón de fosfato salino (PBS) durante 5 min.

El líquido del tejido se removió y se colocaron las laminillas sobre una superficie plana, mientras tanto se preparó una solución de 20 µg/ml de Proteinasa K, la cual ayudó a permeabilizar los tejidos, diluyendo 1:500 en PBS, y se agregaron 100 µl de los 20 µg/ml de la solución de Proteinasa K a cada laminilla cubriendo el tejido para inocular las laminillas de 10-30 min a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo indicado, se lavaron las laminillas en PBS durante 5 min y se volvió a fijar el tejido sumergiendo las laminillas en formol bufferado en PBS al 10% durante 5 min y se realizó de nuevo un lavado en PBS para eliminar residuos de formol.

Se cubrió el tejido con 100 µl de buffer equilibrado, mientras tanto, se preparó la reacción de tranferasa terminal recombinante (rTdT) y con 100 µl de reacción mezclada se cubrió adecuadamente la sección del tejido, teniendo cuidado de mantenerlas húmedas y así cubrir las secciones con cubiertas plásticas para garantizar la distribución del reactivo. Se incubaron las laminillas a 37 °C durante 1 hora dentro de una cámara húmeda para permitir que la reacción marcadora ocurriera.

Se realizó una dilución de citrato salino de sodio (2X SSC) de 1:10 con agua desionizada, y una vez transcurrido el tiempo de incubación, se removieron las cubiertas plásticas para terminar las reacciones sumergiendo las laminillas en 2X SSC durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron las laminillas sumergiéndolas en PBS durante 5 min y se repitió el lavado dos veces para remover los nucleótidos de biotina no incorporados.

Las laminillas se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 3-5 min para bloquear las peroxidases endógenas y se lavaron sumergiéndolas en PBS durante 5 min.

La solución de peroxidasa para detectar la biotina, "Streptavidin HRP" (horseradish peroxidase-labeled streptavidin) se diluyó 1:500 en PBS y se agregaron 100 µl a cada laminilla para incubarlas durante 30 min a temperatura ambiente.

Trascurrido el tiempo se lavaron las laminillas sumergiéndolas en PBS durante 5 min y se combinaron los componentes de la diaminobenzidina, DAB, (50 µl del substrato DAB 20X bufferado a 950 µl de agua desionizada, 50 µl de DAB 20X Chromogen y 50 µl del peróxido de hidrógeno 20X) justo antes de usarse, se añadieron 100 µl de solución a cada laminilla hasta que se desarrolló un fondo de color marrón. Se enjuagaron las laminillas varias veces en agua desionizada y se

montaron con un medio de montaje permanente, para observar la tinción con un microscopio de luz.

15. DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA

A la radiación emitida por una molécula, o un átomo, después de que ha absorbido energía para colocarse en un estado de excitación se le llama fluorescencia, ésta ocurre cuando la luz de ciertas longitudes de onda se absorbe por una sustancia de acuerdo a su estructura molecular, dicha absorción de la energía de la luz se presenta como resultado de la incidencia de un fotón que promueve la transición de un electrón de un estado de menor a mayor energía (Martínez *et al.*, 2006).

El COU es un fitoestrógeno que fluoresce naturalmente, la unión a receptores estrogénicos proporciona un ambiente hidrofóbico estable, lo que resulta en un aumento del rendimiento de fluorescencia (Wang *et al.*, 2014).

El COU se excita con luz azul a una longitud de onda de 390-400 nanómetros y emite una luz verde a una longitud de onda de 532-559 nanómetros, esta emisión fue microfotografiada en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, sede Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS a los tratamientos control y de 800 µg de COU.

Se midió la intensidad de pixeles con el programa computacional Zen 2 Blue edition® (Carl Zeiss).

16. RESULTADOS

16.1 MORFOMETRÍA CELULAR

Espermatogonias (ESG).

Se presentó una disminución significativa ($p < 0.01$) entre las medias generales del grupo control y los tratamientos durante las 9 semanas de duración del mismo. El grupo control presentó un promedio general de 51.08 ± 2.01 ESG; el grupo que recibió el tratamiento de $800 \mu\text{g}$ de COU presentó un promedio general de 43.84 ± 2.27 ESG, mientras que del grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU presentó un promedio general de 42.35 ± 2 ESG (Tabla 1).

Por otra parte, el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU inició con una media de 61.33 ± 3.31 ESG en la semana 5 y finalizó con un promedio de 36 ± 3.22 ESG en la semana 9; en lo que respecta a los animales tratados con $1600 \mu\text{g}$ de COU, el valor promedio durante la semana 5 fue de 32.33 ± 3.2 ESG mientras que en la semana 9 el valor promedio fue de 44.11 ± 3.94 ESG. Comparando el número de ESG por semana entre los dos tratamientos y el grupo control, se muestra un decremento significativo ($p < 0.05$) en el número de ESG entre el grupo control y el tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ de COU en la semana 5, así como en la semana 8 entre el grupo control y ambos tratamientos como se muestra en la tabla 2.

Espermatocitos (ESP).

A lo largo de las 9 semanas de tratamiento, se presentó un promedio general de espermatocitos de 177.06 ± 5.79 en el grupo control; un promedio de 78.4 ± 7.39 ESP en el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU y un promedio de 73.62 ± 7.11 ESP en el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU. Se observa una disminución significativa ($p < 0.01$) en el número de ESP entre el grupo control y ambos tratamientos (tabla 1).

El grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU presentó un promedio inicial de 130 ± 14.02 ESP en la semana 5 y un promedio final en la semana 9 de 47.22 ± 7.40 ESP; el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU inició con una media de 85 ± 12.02 ESP en la semana 5 y finalizó con un promedio de 64.44 ± 11.17 ESP en las semana 9. Al comparar el número de ESP por semana entre los tratamientos y el grupo control, se muestra una disminución significativa ($p < 0.05$) a partir de la semana 5 y hasta la semana 9, como se observa en la tabla 2.

Espermátides Elongadas (EE). El grupo control presentó una media general de 111.84 ± 2.64 EE a lo largo de las 5 semanas de tratamiento mientras que el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU presentó una media de 62.44 ± 2.89 EE, por último, el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU presentó una media de 63.73 ± 3.01 EE. Como se muestra en la tabla 1, existe una disminución en el número de EE, la cual es significativa ($p > 0.01$), entre el grupo control y ambos tratamientos.

En la tabla 2, se puede observar un decremento significativo ($p>0.05$) a lo largo de todas las semanas de tratamiento entre el grupo control y los grupos tratados con diferentes dosis de coumestrol.

Células de Sertoli (CS). Como se muestra en la tabla 1, el grupo control presentó una media general de 13.24 ± 0.35 CS a lo largo de las 5 semanas de tratamiento mientras que el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU presentó una media de 8.86 ± 0.46 CS, por último, el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU presentó una media general de 10.08 ± 0.62 CS. Se puede observar una disminución significativa ($p>0.01$) en el número total de CS entre el grupo control y ambos tratamientos.

En la tabla 2 se muestra que durante la semana 5 el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU inició con un promedio de 10.22 ± 0.57 CS y finalizó con un promedio de 9.44 ± 0.68 CS en la semana 9, mientras que el tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ de COU inició con una media de 13.67 ± 1.47 CS para finalizar con una media de 11.56 ± 1 células. Se pueden observar diferencias significativas ($p>0.05$) entre el grupo control y cada uno de los grupos, por su parte solo en la semana 5 existe diferencia entre los dos grupos tratados.

Células de Leydig (CL). Hubo una disminución significativa ($p>0.01$) entre el promedio general del grupo control y el promedio general de ambos tratamientos a lo largo de las 9 semanas de tratamiento. El grupo control presentó un promedio de 11.62 ± 0.66 CL; el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU un promedio de 8.55 ± 0.78 CL y el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU un promedio de 9.51 ± 0.71 CL (tabla 1).

Por otro lado, en la semana 5 el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU inició con un promedio de 15.44 ± 1.46 CL y finalizó con un promedio de 6.44 ± 0.89 CL en la semana 9, mientras que el tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ de COU inició con una media de 16.56 ± 0.89 CL para finalizar con una media de 7 ± 0.74 CL. Como se muestra en la tabla 2, existe una disminución significativa ($p>0.05$) entre el grupo control y el tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ de COU durante las 5 semanas de tratamiento.

Diámetro del túbulo seminífero (d). A lo largo de las 5 semanas de tratamiento, el grupo control presentó una media general de $151.41 \pm 9.80 \mu\text{m}$ de diámetro, el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU presentó una media general de $304.88 \pm 11.01 \mu\text{m}$ de diámetro y el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU una media general de $288.3 \pm 9.27 \mu\text{m}$ de diámetro como se muestra en la tabla 3, se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el grupo control y los tratamientos con $800 \mu\text{g}$ y $1600 \mu\text{g}$ de COU.

Como se puede observar en la tabla 4, el tratamiento de $800 \mu\text{g}$ de COU inició con un diámetro de $359.44 \pm 8.09 \mu\text{m}$ en la semana 5 para finalizar en la semana 9 con un diámetro de $240.83 \pm 12.60 \mu\text{m}$; el tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ de COU comenzó con una medida de $356.66 \pm 11.30 \mu\text{m}$ de diámetro en la semana 5 y finalizó con una medida de $223.55 \pm 3.86 \mu\text{m}$ de diámetro. Al verse aumentado el diámetro de los túbulos seminíferos se hallaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre el grupo

control, y ambos tratamientos durante la semana 6; durante las semanas 5, 7 y 9 existen diferencias significativas entre los tratamientos, y el grupo control.

Área del túbulo seminífero (A). El grupo control presentó una media general del área del túbulo seminífero de $40982 \pm 6231.96 \mu\text{m}^2$ durante las 5 semanas de tratamiento; el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU presentó una media general del área de $148464 \pm 10694.9 \mu\text{m}^2$ por su parte el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU presentó una media general del área de $172221 \pm 29452.8 \mu\text{m}^2$ de diámetro, presentando diferencias significativas ($p < 0.01$), como se muestra en la tabla 3.

Se hallaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y el grupo control, en la semana 8 el tratamiento con mayor concentración de COU ($1600 \mu\text{g}$) y el grupo control presentaron un área similar, la cual no es significativa. El tratamiento de $800 \mu\text{g}$ de COU presentó una reducción del área de los túbulos seminíferos a lo largo de las semanas, el túbulo inició con un área de $209608.77 \pm 4289.15 \mu\text{m}^2$ en la semana 5 y finalizó con área de $87465.22 \pm 5965.66 \mu\text{m}^2$ en la semana 9; similar situación se presentó con el tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ de COU, el cual inició con un área de $214846.11 \pm 6813.23 \mu\text{m}^2$ en la semana 5 y terminó con un área de $82725.12 \pm 4678.99 \mu\text{m}^2$, como se muestra en la tabla 4.

Espacio Intersticial (EI). Durante las 5 semanas de tratamiento, el grupo control presentó un promedio general del EI de $5.07 \pm 0.26 \mu\text{m}$; el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU presentó un promedio general del EI de $11.30 \pm 0.75 \mu\text{m}$, mientras que el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU presentó un promedio general del EI de $9.01 \pm 0.72 \mu\text{m}$. Se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los 3 grupos en la tabla 3.

Como se muestra en la tabla 4, a lo largo de todas las semanas de tratamiento, a excepción de la semana 8, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control y el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU en donde la distancia entre los túbulos seminíferos incrementa a lo largo del tratamiento.

Epitelio Germinal (EG). El grupo control presentó un promedio general del EG de $37.04 \pm 1.14 \mu\text{m}$ a lo largo de las 5 semanas de tratamiento; el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU presentó un promedio general del EG de $58.57 \pm 2.55 \mu\text{m}$, mientras que el grupo tratado con $1600 \mu\text{g}$ de COU presentó un promedio general del EG de $68.69 \pm 3.91 \mu\text{m}$. Como se muestra en la tabla 3, existen diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el grupo control y ambos tratamientos.

A lo largo de todas las semanas de tratamiento existe un aumento significativo ($p < 0.05$) del grosor del epitelio germinal entre el grupo control y el grupo tratado con $800 \mu\text{g}$ de COU; como se puede apreciar en la tabla 4.

Tabla 1. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE CUANTIFICACIÓN CELULAR DURANTE LAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO (Número de células)

	CONTROL	TX 800 µg COU	TX 1600 µg COU
Espermatogonias	51.08 ± 2.01 ^a	43.84 ± 2.27 ^b	42.35 ± 2 ^b
Espermatocitos	177.06 ± 5.79 ^a	78.4 ± 7.39 ^b	73.62 ± 7.11 ^b
Células de Leydig	11.62 ± 0.66 ^a	8.55 ± 0.78 ^b	9.51 ± 0.71 ^b
Células de Sertoli	13.24 ± 0.35 ^a	8.86 ± 0.46 ^b	10.08 ± 0.62 ^b
Espermátides Elongadas	111.84 ± 2.64 ^a	62.44 ± 2.89 ^b	63.73 ± 3.01 ^b

Tabla 2. COMPARACIÓN SEMANAL DE MEDIAS DE CUANTIFICACIÓN CELULAR. (Número de células)

	Semana	Control	800 µg COU	1600 µg COU
Espermatogonias	5	65.78 ± 2.95 ^a	61.33 ± 3.31 ^a	32.33 ± 3.2 ^b
	6	46.33 ± 2.89 ^a	38.56 ± 7.05 ^a	53 ± 5.22 ^a
	7	43.33 ± 3.10 ^a	41.44 ± 1.91 ^a	40.78 ± 4.42 ^a
	8	60.22 ± 3.96 ^a	41.89 ± 4.07 ^b	41.56 ± 3.13 ^b
	9	39.78 ± 2.39 ^a	36 ± 3.22 ^a	44.11 ± 3.94 ^a
Espermatocitos	5	216.44 ± 7.18 ^a	130 ± 14.02 ^b	85 ± 12.02 ^b
	6	175.78 ± 7.40 ^a	101.89 ± 16.63 ^b	126.22 ± 10.81 ^b
	7	147.67 ± 13.58 ^a	50.89 ± 16.04 ^b	43.65 ± 17.97 ^b
	8	203.78 ± 6.23 ^a	62 ± 8.14 ^b	48.89 ± 11.02 ^b
	9	141.67 ± 6.83 ^a	47.22 ± 7.40 ^b	64.44 ± 11.17 ^b
C. Leydig	5	13.89 ± 0.51 ^a	15.44 ± 1.46 ^{a,b}	16.56 ± 0.89 ^b
	6	6.89 ± 0.71 ^a	8 ± 1.31 ^a	10.78 ± 1.17 ^b
	7	8.67 ± 0.68 ^a	6.33 ± 1.35 ^{a,b}	5.33 ± 0.50 ^b
	8	16.56 ± 1.71 ^a	5.56 ± 0.33 ^b	7.89 ± 1.19 ^b
	9	12.11 ± 0.61 ^a	6.44 ± 0.89 ^b	7 ± 0.74 ^b
C. Sertoli	5	16 ± 0.52 ^a	10.22 ± 0.57 ^b	13.67 ± 1.47 ^c
	6	10.89 ± 0.51 ^a	11.56 ± 0.76 ^a	11.67 ± 0.62 ^a
	7	12 ± 0.48 ^a	5 ± 1.01 ^b	4.22 ± 0.46 ^b
	8	13.89 ± 0.73 ^a	8.11 ± 0.69 ^b	9.33 ± 0.52 ^b
	9	13.44 ± 0.50 ^a	9.44 ± 0.68 ^b	11.56 ± 1 ^{a,b}
Espermátides Elongadas	5	119 ± 4.5 ^a	51.89 ± 7.13 ^b	44.89 ± 5.74 ^b
	6	123.11 ± 3.79 ^a	71.22 ± 5.93 ^b	73.67 ± 4.50 ^b
	7	116.2 ± 5.99 ^a	67 ± 4.40 ^b	59 ± 5.55 ^b
	8	89.33 ± 3.65 ^a	53.11 ± 8.65 ^b	72.78 ± 8.3 ^b
	9	111.56 ± 4.56 ^a	69 ± 2.82 ^b	68.33 ± 4.91 ^b

Tabla 3. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE MORFOMETRÍA ESTRUCTURAL DURANTE LAS 9 SEMANAS DE TRATAMIENTO. MEDICIONES

	CONTROL	TX 800 µg COU	TX 1600 µg COU
Diámetro del túbulo seminífero (µm)	151.41 ± 9.80 ^a	304.88 ± 11.01 ^b	288.3 ± 9.27 ^b
Área del túbulo seminífero (µm ²)	40982 ± 6231.96 ^a	148464 ± 10694.9 ^b	172221 ± 29452.8 ^b
Grosor Epitelio Germinal(µm)	37.04 ± 1.14 ^a	58.57 ± 2.55 ^b	68.69 ± 3.91 ^b
Espacio Intersticial(µm)	5.07 ± 0.26 ^a	11.30 ± 0.75 ^b	9.01 ± 0.72 ^c

Tabla 4. COMPARACIÓN SEMANAL DE MEDIAS DE MORFOMETRÍA ESTRUCTURAL. MEDICIONES

	Semana	Control	800 µg COU	1600 µg COU
Área del túbulo seminífero (µm ²)	5	24758.22 ± 917.98 ^a	209608.77 ± 4289.15 ^b	214846.11 ± 6813.23 ^b
	6	20948.11 ± 1615.05 ^a	239807.44 ± 16348.41 ^b	218650.22 ± 19439.28 ^b
	7	20507.08 ± 899.05 ^a	124055.03 ± 11915.55 ^b	245844.37 ± 143088.55 ^b
	8	119234.87 ± 10218.78 ^a	81381.40 ± 8359.71 ^b	99038.77 ± 9489.50 ^{a,b}
	9	19461.44 ± 734.68 ^a	87465.22 ± 5965.66 ^b	82725.12 ± 4678.99 ^b
Diámetro (del túbulo seminífero µm)	5	125.66 ± 4.39 ^a	359.44 ± 8.09 ^b	356.66 ± 11.30 ^b
	6	120.44 ± 6.91 ^a	390 ± 15.77 ^b	342 ± 10.80 ^c
	7	111.99 ± 3.97 ^a	286.80 ± 16.05 ^b	264.05 ± 14.97 ^b
	8	273.44 ± 13.87 ^a	237.34 ± 15.37 ^a	254.56 ± 13.79 ^a
	9	125.58 ± 5.29 ^a	240.83 ± 12.60 ^b	223.55 ± 3.86 ^b
Epitelio Germinal (µm)	5	28.42 ± 0.63 ^a	82.86 ± 4.09 ^b	152.30 ± 3.03 ^c
	6	29.76 ± 0.96 ^a	104.83 ± 2.90 ^b	101.19 ± 3.90 ^b
	7	30.58 ± 0.81 ^a	43.09 ± 2.39 ^b	29.40 ± 1.55 ^a
	8	64.73 ± 1.84 ^a	37.27 ± 2.16 ^b	29.43 ± 1.65 ^c
	9	31.45 ± 0.80 ^a	24.81 ± 1.11 ^b	32.15 ± 1.69 ^a
Espacio Intersticial (µm)	5	3.76 ± 0.16 ^a	11.05 ± 1.11 ^b	6.52 ± 0.97 ^c
	6	3.73 ± 0.20 ^a	16.67 ± 3.70 ^b	4.22 ± 0.56 ^a
	7	3.57 ± 0.31 ^a	10.68 ± 0.54 ^b	10.35 ± 0.52 ^b
	8	10.76 ± 0.99 ^a	9.23 ± 0.46 ^a	14.80 ± 2.71 ^a
	9	3.51 ± 0.23 ^a	10.25 ± 1.99 ^b	10.87 ± 2.69 ^c

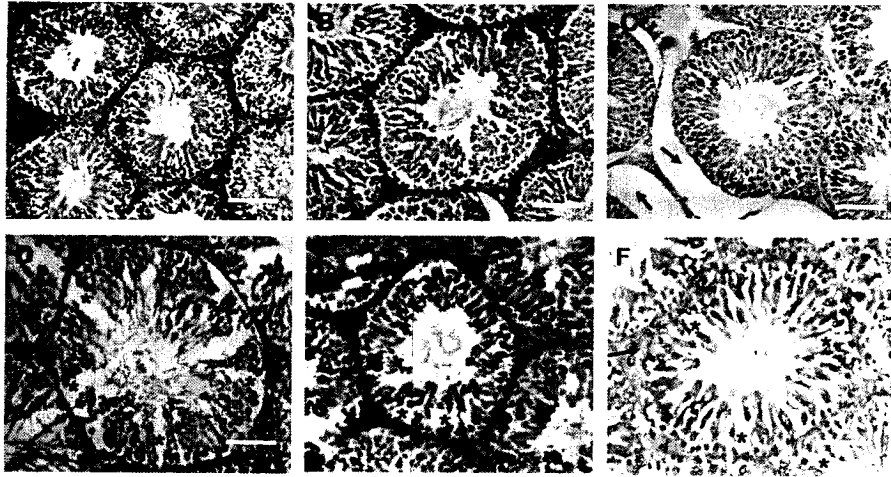


Figura 1. Imágenes representativas del tejido testicular del grupo control (A) y correspondientes al tratamiento de 800 µg de COU, (B) semana 5, (C) semana 6, (D) semana 7, (E) semana 8, (F) semana 9. Se puede observar la presencia de vacuolas (*) dentro del túbulo seminífero a partir de la semana 5 (B) así como el decremento en la cantidad de células germinales y su regeneración a partir de la semana 8 (E) además del espacio intersticial (flechas). Barra 100 µm.

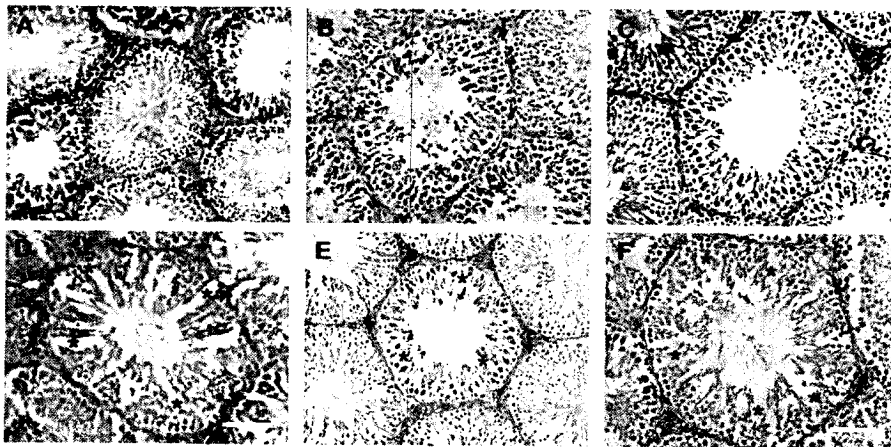


Figura 2. Imágenes representativas del tejido testicular del grupo control (A) y correspondientes al tratamiento de 1600 µg de COU, (B) semana 5, (C) semana 6, (D) semana 7, (E) semana 8, (F) semana 9. Al igual que con el tratamiento de 800 µg de COU, se puede observar una reducción en la cantidad de células germinales a partir de la semana 5 (B) así como la formación de vacuolas (*) dentro del túbulo seminífero además del espacio intersticial (flechas). Barra 100 µm.

16.2 APOPTOSIS

El índice apoptótico en el tejido testicular de los animales control fue de 11.10%, mientras que en los animales tratados con 800 μg de COU fue de 48.19% y el de los animales tratados con 1600 μg de COU fue de 50.10% como se muestra en la Figura 9.

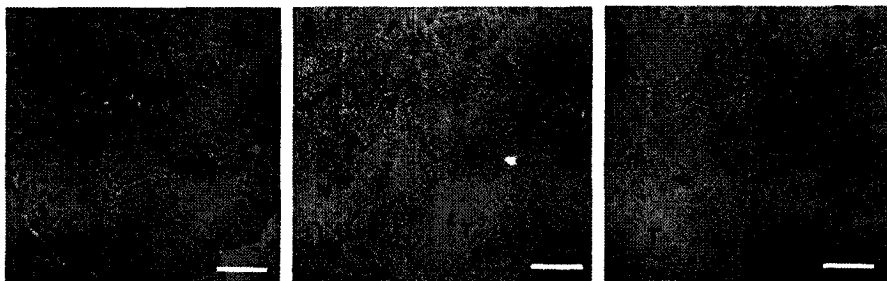


Figura 9. Fotomicrografías de (A) TUNEL (+) células de tejido testicular dentro de los túbulos seminíferos (T) del grupo control (flecha). (B) TUNEL (+) células de tejido testicular dentro de los túbulos seminíferos del grupo tratado con 800 μg de COU (flecha). (C) TUNEL (+) células de tejido testicular dentro de los túbulos seminíferos del grupo tratado con 1600 μg de COU (flecha). Barra 100 μm .

16.3 FLUORESCENCIA

La intensidad de la fluorescencia expresada en pixeles en el espacio intersticial de los testículos de los animales del grupo control fue de 48.46 ± 2.23 , siendo de 107.58 ± 4.59 en los animales del grupo tratado con 800 μg de COU $p < 0.01$ (Mann-Whitney).

En lo que respecta al epitelio germinal, los animales del grupo control presentaron una intensidad de fluorescencia de 25.46 ± 0.93 pixeles, por su parte los animales del grupo tratado con 800 μg de COU presentaron una intensidad de fluorescencia de 59.05 ± 2.08 $p < 0.01$ (Mann-Whitney).

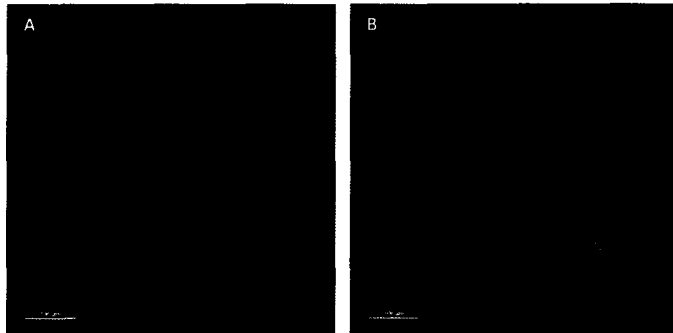


Figura 10. Fotomicrografías de (A) Fluorescencia de tejido testicular del grupo control. (B) Fluorescencia de tejido testicular del grupo de animales tratados con 800 µg de COU

17. DISCUSIÓN

Una de las funciones principales de las células somáticas en el testículo, como lo son las células de Sertoli y las células de Leydig, es la de recibir señales endócrinas a través del torrente sanguíneo y transmitir las de manera apropiada para el desarrollo de las células germinales. Tanto en las CL como en las CS se encuentran receptores estrogénicos, lo que sugiere que estas células son capaces de responder a los estrógenos.

Los estrógenos son producidos en los testículos e incitan a una acción parácrina dentro de la espermatogénesis, sin embargo, los estrógenos también pueden generar un impacto en la función testicular a través de los mecanismos de retroalimentación endócrina que regulan la espermatogénesis y el desarrollo de las células germinales los cuales han sido mencionados anteriormente (O'Donnell *et al.*, 2006).

Actualmente se han evaluado nuevas estrategias dentro de la tecnología farmacéutica para aumentar la eficiencia en la administración de compuestos con propiedades terapéuticas mediante vehículos naturales como el quitosán (Castillo *et al.*, 2014) cuyas propiedades permiten mezclarse con otros polímeros lo que ha llevado al desarrollo de numerosas aplicaciones de quitosán y sus derivados en biomedicina, matrices de micro-esferas y / o microcápsulas y la administración de fármacos para una liberación sostenida con el fin de mejorar el rendimiento de estos (Pedro *et al.*, 2009; Vivek *et al.*, 2013).

En el presente estudio se pudieron determinar distintos cambios morfométricos e histométricos en el parénquima testicular entre un grupo de animales control y dos grupos de animales tratados con distintas dosis de COU (800 µg y 1600 µg) utilizando al quitosán como vehículo para la administración de este fitoestrógeno por vía subcutánea.

Dentro de los cambios se encontró la disminución en el número total de células germinales y espermatídes elongadas, así como la disminución del grosor del epitelio germinal, el aumento del espacio intersticial entre los túbulos seminíferos y la formación de vacuolas a nivel epitelio germinal en los tejidos de los animales tratados con diferentes dosis de COU, resultando en el aumento del área y diámetro tubular.

Se sabe que la espermatogénesis de los roedores está bajo control de los estrógenos (Carreau *et al.*, 2003), la biosíntesis de estos es catalizada por un miembro de la superfamilia de citocromo P450, la aromatasa (O'Donnell *et al.*, 2001), convirtiendo la testosterona y la androstenediona a estrógenos aromáticos como el estradiol y la estrona respectivamente (Mosselman *et al.*, 1996; Karkola y Wähälä, 2009). La presencia de esta enzima es mucho mayor en las células germinales en comparación con las células de Leydig (Janulis *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2001) y se ha reportado la actividad de la P450 durante la división meiótica en células germinales y maduración de las mismas en espermatídes elongadas (Levallet *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2001).

El COU, tiene la capacidad de unirse a la aromatasa e inhibir la formación de los estrógenos (Karkola y Wähälä, 2009), lo que puede estar relacionado con el control de la división de las células germinales y alterar su función, ya que estudios demuestran que en los hombres, la deficiencia de esta enzima, producida por la mutación del gen P450aro, conduce a la esterilidad (Morishima *et al.*, 1995; Carani *et al.*, 1997; Carreau *et al.*, 2003).

Por otra parte, la acción genómica del COU ocurre mediante la unión directa a cualquiera de los receptores estrogénicos α o β , interfiriendo con la unión de los estrógenos a los receptores estrogénicos modificando la respuesta a nivel tisular de esta unión (Serrano *et al.*, 2014).

Como consecuencia a la ausencia de estrógenos, la gametogénesis se ve afectada por un incremento en la apoptosis de las células germinales (Laurentino *et al.*, 2001), ésta juega un papel crítico en la homeostasis de la espermatogénesis pudiendo resultar en alteraciones del túbulo seminífero (Qu *et al.*, 2011).

En este estudio, en los tejidos de los animales tratados con COU, se pudo observar la formación de vacuolas, la ampliación del espacio intersticial entre los túbulos seminíferos, y el incremento de la señal fluorescente a nivel epitelio germinal, lo que

sugiere que el COU pudo traspasar la barrera hemato-testicular, causar efectos tóxicos y desencadenar daños a nivel tisular en los testículos, situación que concuerda con lo encontrado por Zhang *et al.*, (2016) quien menciona que la destrucción de la integridad de la estructura de la barrera hemato-testicular se caracteriza por la separación de la unión estrecha y vacuolas en el tejido testicular, dicha destrucción es provocada por un mecanismo tóxico reproductivo que causa daño en la membrana de las células germinales e incrementa el espacio intersticial entre los túbulos seminíferos.

Por otra parte, se encontró incremento en el volumen testicular, este se puede explicar debido a que las deficiencias de estrógenos, ya sea por deleción de los receptores estrogénicos o por deficiencias a nivel del citocromo P450 α , alteran la espermatogénesis produciendo retención de líquidos, el fluido secretado por el epitelio seminífero no es reabsorbido y se acumula en conductos eferentes, rete testis y los túbulos seminíferos produciendo un aumento en el peso de los testículos que como consecuencia incrementa el volumen testicular lo que favorece al aumento de los espacios intertubulares a nivel tisular (Hess, *et al.*, 2001; Carreau, *et al.*, 2007; Pérez-Rivero *et al.*, 2014)

Una vez que la molécula del COU se une a cualquiera de los receptores estrogénicos ya mencionados puede emitir una señal fluorescente (Miksicek., 1993). En el presente estudio, se detectó dicha señal con mayor intensidad en el espacio intersticial del tejido testicular así como en las células germinales de los animales tratados con COU, lo que confirma que el COU es absorbido y se une a los receptores estrogénicos presentes en el tejido testicular, lo cual ya ha sido detectado por Pérez-Rivero *et al.* (2005) en fragmentos de tejido testicular de murciélagos adultos con COU administrado por vía oral.

La importancia de este proyecto radica en la generación y administración de un método eficaz e innovador de liberación prolongada para el control de la fauna feral que no requiera de intervenciones quirúrgicas, es decir, que sea de fácil aplicación y que a su vez no cause estragos en la salud de los animales; es por eso que se utilizaron sustancias de origen natural que el organismo degrada fácilmente. De esta manera se pretende aportar un método auxiliar en el control de la sobrepoblación de la fauna feral que propicia problemas de salud pública.

18. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que ambos tratamientos (800 µg de COU y 1600 µg de COU) provocan daños en el tejido testicular de ratas macho Wistar al ser administrados vía subcutánea utilizando al quitosán como vehículo.

Este trabajo aporta evidencia de que la administración del complejo COU-quitosán por vía subcutánea, permite obtener una distribución importante del fitoestrógeno en los tejidos reproductivos, lo cual fue comprobado mediante microscopía de fluorescencia al observarse una mayor intensidad de fluorescencia en el tejido de los individuos tratados, y ejercer efectos biológicos similares a los observados con la administración oral de COU por vía oral en otros mamíferos.

Se generó una disminución en el número total de espermatogonias, espermátides elongadas y espermatoцитos, teniendo un efecto más agudo en el tratamiento de 1600 µg de COU, que conforme avanzaron las semanas disminuyó su efecto en contraste con el tratamiento de 800 µg de COU donde se observó un efecto inicial más lento sin mostrar evidencia de recuperación.

En lo referente a la cantidad de CL en ambos tratamientos los efectos fueron similares, se mostró una disminución significativa ($p > 0.01$) entre el promedio del grupo control y el promedio de ambos tratamientos a lo largo de las 9 semanas de tratamiento; por otra parte, en las CS se observó una disminución significativa ($p > 0.01$) en el número total de células entre el grupo control y ambos tratamientos durante la duración total del tratamiento.

En lo referente al epitelio germinal, diámetro y área de los túbulos seminíferos, se presentó un aumento significativo entre los diferentes tratamientos y el grupo control que durante el transcurso de duración del tratamiento fue disminuyendo, situación que coincide con la recuperación de las células germinales.

La información recabada a lo largo del proyecto permite concluir que la administración de COU por vía parenteral utilizando al quitosán como vehículo, produce daños en el tejido testicular que pudieran verse reflejados en el individuo causando infertilidad, el cual cumple con el objetivo de este estudio. La liberación del COU se puede considerar prolongada debido a que se muestran cambios durante las primeras semanas del tratamiento, sin embargo, existe una recuperación del tejido, lo que impide que este tratamiento sea utilizado como control de fauna feral debido a que a pesar de que la administración del mismo sea sencilla, se necesitaría de varias aplicaciones para mantener la infertilidad, por lo que su uso podría beneficiar a animales domésticos cuyos propietarios no deseen que sean intervenidos quirúrgicamente.

Con el uso de los implantes de quitosán-COU, aun siendo utilizados en animales domésticos, la sobrepoblación de fauna feral, misma que conlleva a problemas de salud pública, puede verse disminuida al controlar la natalidad de animales, que en su mayoría, se encontrarán en situación de calle.

19. REFERENCIAS

- Achstetter V.A., 1994. Microtomy. Chapter 8. En: Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology. Washington D.C.
- Adams N.R., 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 73(5): 1509-1515.
- Allan D.J., Harman B.V., Kerr J.F.R., 1992. Cell death in spermatogenesis: In: Potten CS (ed.). *Perspectives on Mammalian cell death*. London: Oxford University Press: 229-258.
- Allen T.C., 1994. Hematoxylin and eosin. Chapter 9. En: Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology. Washington D.C.
- Allen, W.E., 1992. Fertilidad y Obstetricia Canina. Ed. Acribia. España; pp. 33-41, 195-198.
- Armed Forces Institute of Pathology, 1994. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology. Washington D.C.
- Ashkenazi A., Dixit V.M., 1998. Death receptor: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Bagatelle C.J., Dahl K.D., Bremner W.J., 1994. The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men partially mediated by aromatization to estradiol. *J. Androl* 15:15-21.
- Bennets H.W., Underwood E.J. and Skier F.L., 1946. A breeding problem of sheep in the south-west division of Western Australia. *Journal of Agriculture, Western Australia*, vol23, pp.1-12. 1946.
- Benson G.S., 1988. Male sexual function: Erection, emission and ejaculation. En: Knobil E. y Neill J. (eds). *The physiology of reproduction* Raven Press. N.Y., 1121-1139.
- Buzarco, O., Martínez, M.J., 2011. La valoración preanestésica. *Riesgo Anestésico*. Zaragoza. *Consulta Difus. Vet.* 9 (78); 49-62.
- Calvo, T., M. de los A., Arosamena, A., E., L., 2009. Zoonosis más importantes en perros. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad y Anatomía Animal. Universidad Autónoma de Barcelona. pp 1-19.
- Capel B., 2000. The battle of the sexes. *Mech Dev* 92:89-103.

- Carani C., Qin K., Simoni M., Faustini-Fustini M., Serpente S., Boyd J., Korach K.S., Simpson E.R., 1997. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *New Engl J Med.*, 337: 91-95
- Carreau S., Bourguiba S., Lambard S., Galeraud-Denis I., Genissel C., Levallet J., 2002. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193 (1-2): 137-143.
- Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C., 2011. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis* 1: 90-94.
- Carreau S., Lambard S., Delalande C., Denis-Galeraud I., Bilinska B., Bourguiba S., 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1:35
- Carreau S., Silandre D., Bourguiba S., Hamden K., Said L., Lambard S., Galeraud-Denis I., Delalande C., 2007. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 761-768.
- Castillo, D., Paredes, C., Zañartu, C., Castillo, G., Mercado, R., Muñoz, V., Schenone H., 2000. "Contaminación ambiental por huevos de *toxocara spp.* En algunas plazas y parques públicos de Santiago de Chile" *Boletín Chileno de Parasitología* 55:1-8.
- Castillo E, Jiménez G, Gómez-Gaete C, von Plessing C. (2014). Desarrollo de un carrier nanoparticulado como estrategia de transporte a través del sistema nervioso. *Rev. Farmacol. Chile* 7: 17-24.
- Cheng C.Y., Wong E.W., Lie P.P., Li M.W., Mruk D.D., Yan H.H., Mok K.W., Mannu J., Mathur P.P., Lui W.Y., Lee W.M., Bonanomi M., Silvestrini B., 2011. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. *Spermatogenesis*. 1(2):105-115
- Chetelet C., Damour O., Domard A., 2002. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 22:261-268.
- Clermont Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol REv* 52:198-236.
- Couse J.F, Lindzey J., Grandiend K., Gustafsson J.A., Korach K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER- α -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621.
- Cruz-Reyes, A., 2009. CAPÍTULO EN LIBRO: Fauna feral, fauna nociva y zoonosis. In: Lot, A. y Cano-Santana, Z. (Eds.). *Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel*. Sección: Restauración, conservación y manejo. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 453-461.

Diel P., Olf S., Schmidt S., Michna H., 2002. Effects of the environmental estrogens bisphenol A, *o,p'*- DDT, *p-tert*-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80: 61-70.

Dym M., Clermont Y., 1970. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat.*, 128:265-282.

Elmore S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35: 495-516.

Fernández-Soto C., 2012. Efecto de un inhibidor de la aromatasa sobre la espermatogénesis, la conducta sexual y la fertilidad de la rata macho adulta. Tesis para obtener el grado de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. *Biología Experimental*.

Finkelstein J.S., O'Dea L.S., Withcomb R.W., Crowley Jr. W.F., 1991. Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II. Effects of estradiol Administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *J. Clin Endocrinol Metab* 73: 621-628.

Gaceta Oficial del Distrito Federal, 2013. Órgano de difusión del Gobierno del Distrito Federal. Décima Séptima Época. No.1684. pp. 10-20.

Gee A.C., Carlson K.E., Martini P.G., Katzenellenbogen B.S., Katzenellenbogen J.A., 1999. Coactivator peptides have a differential stabilising effect on the binding of estrogens and antiestrogens with the estrogen receptor, *Mol.Endocrinol.* 13(11): 1912-1923.

Geneser F., 2007. *Histología. Sobre beses biomoleculares 3ª. Edición.* Editorial Médica Panamericana, 613-638.

Giangaspero, A., Berrilli, F., Brandonisio, O., 2007. Giardia and Cryptosporidium and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitology Research*, 101: 1169-1182.

Glitsso L.V., Mazur W., Adlercreutz K., Wahata K., Makela T., Sandstrom B., Wahala K., 2000. Intestinal metabolism of rye lignans in pigs. *British Journal of Nutrition* 84: 429-437.

Gross A., Mc Donnell J.M, Korsmeyer S.J, 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13: 1899-1911.

Gustafson M.L., Donahoe P.K., 1994. Male sex determination: current concepts of male sexual differentiation. *Annu Rev Med* 45:505-524.

Hall J., 1994. Embedding. Chapter 7. En: Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology. Washington D.C.

Hanci H., Odaci E., Kaya H., Aliyazicioğlu Y., Turan İ., Demir S., Çolakoğlu S., 2013. The effect of prenatal exposure to 900-MHZ electromagnetic field on the 21-old-day rat testicle. *Reproductive Toxicology* 42 (2013) 203-209.

Hengartner M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.

Henriksen K., Kangasniemi M., Parvane M., Kaipia A., Hakovirta H., 1996. In vitro follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. *Endocrinology* 137:2141-2149.

Hernández Cocoltzi H., Alamnza A.E., Flores A.O., Viveros N.E.L., Cassellis R.E., 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficie y vacío* 22(3) 57-60.

Hess R.A., Bunick D., Bahr J., 2001. Oestrogens, its receptors and fuction in the male reproductive tract- a review. *Mol Cell Endocrinol*; 178:29-38.

Homma-Takeda S., Kugenuma Y., Iwamuro T., Kumagai Y., Snimojo N., 2001. Impairment of spermatogenesis in rats by methylmercury: involvement of stage- and cell- specific germ cell apoptosis. *Toxicology* 169: 25-35.

Hughes I.A., Coleman N., Faisal A.S., Ng K.L., Cheng A., Lim H.N., Hawkins J.R., 1999. Sexual dimorphism in the neonatal gonad. *Acta Paediatr Suppl* 88:23-30.

Hughes I.A., Lim H.N., Martin H., Mongan N.P., Dovey L., Ahmed S.F., Hawkins J.R., 2001. Developmental aspects of androgen action. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 185:33-41.

Indran I.R., Tufo G., Pervalz S., Brenner C., 2011. Review: Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cáncer cells. *Biochimic et Biophysica Acta* 1807: 735-743.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2013. Estadísticas de la Población para 2010. Disponible en: (<http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/habitantes.aspx?tema=P>).

Jacob D.A., Temple J.L., Patisaul H.B., Young L.J., Rissman E.F., 2001. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α . *Experimental Biology and Medicine* 226(4): 301-306.

Jacobus L., B., 1992. Hormonal Control of smpermatogenesis: expression of FSH receptor and androgen receptor genes. Tesis Doctoral. Departamento de Endocrinología y Reproducción de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Erasmus de Rotterdam.

Jahnukainen K., Chrysis D., Hou M., Parvinen M., Eksborg S., Söder O., 2004. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis in stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biology of Reproduction*, 70:290-296.

Janulis L., Bahr J.M., Hess R.A., Janssen S., Osawa Y., Bunick D., 1998. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl* 19:65-71

Johnsen S.G., 1970. Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 12-25

Johnson L. Thompson J., Donald L., Dickson D., 2008. Role of Sertoli, cell number and function on reevaluation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*, 105: 23-51.

Jaza N., Susin S.A., Daugas E., Standford N.L., Cha S.K., Li C.Y., Sosaki T., Ella A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A., Haken R., Yoshida H., Komg Y.Y., Mak T.W., Zuniga-Plucker J.C., Kroemer G., Penninger J.M., 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554.

Juniewicz P.E., Oesterling J.E., Mather J.P., 1994. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors; interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 100:81-86.

Kallela K., Heinonen K. and Saloniemi H., 1984. Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. A case report. *Nordisk Veterinaermedicin*, vol. 36, no.3-4, pp.124-129.

Karkola S., Wähälä K., 2009. The binding of lignans, flavonoids and coumestrol to CYP450 aromatase: A molecular modelling study. *Molecular and cell endocrinology* 301; 235-244

Kerr J.B., Mayberry R.A., Irby D.C., 1984. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E. y Neill J. *The physiology of reproduction*. Raven Press. N.Y., 1213.

Kuiper G.G., Enmark E., Pelto-Huikko M., Milsson S., Gustafsson J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-5930.

Kumar, M. N., Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A. J., 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev* 104:6017-6084.

Kurowicka B., Dietrich G.J., Kotwica G., 2015. Effect of neonatal or adult heat acclimation on testicular and epididymal morphometry and sperm production in rats. *Reprod Biol*. 15(1):1-8

Laurentino S., Gonçalves J., Cavaco J.E., Fontes Olivera P., G. Alves M., de Sousa M., Barros A., Socorro S., 2011. Apoptosis-inhibitor Aven in downregulated in defective spermatogenesis and a novel estrogen target gene in mammalian testis. *Fertility and Sterility* Vol. 96 No.3

Le Bars J., Le Bars P., Et Brice G., 1990. Presence accumulation et devenir du coumestrol dans luzerne et ses derives. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 166(5): 463-469.

Leblond C.P., Clermont Y., 1952. Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfuric acid' technique. *Am J Anat* 90:167-206.

Lenis S.Y.Y., Gutiérrez G.M.T., Tarazona M.A.M., 2010. Efectos de los fitoestrógenos en la reproducción animal. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(2): 5555-5565.

Levallet J., Bilinska B., Mittre H., Genissel C., Fresnel J., Carreau S., 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 58:919-926

Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal, 2002. Asamblea Legislativa del Distrito Federal, IV Legislatura. Publicado en la Gaceta Oficial del Distrito Federal. pp. 1-33.

Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z., 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1650-1662.

Lookhart G.L., 1980. Analysis of coumestrol, a plant estrogen, in animal feeds by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 28 666-667.

Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.

Marina S., 2003. Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Vol. 20. No.4 pp 213-225.

Martí E., Pérez-Pé R., Colás C., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., 2008. Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 113-132

Martínez E.M.T., Moctezuma G.C.I, Stock S.R.P., 2006. Espectrofluorimetría. Métodos físico-químicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.

Martínez, H., F.C., 2006. Esterilización química en perros por medio de gluconato de zinc (neuterosol). Servicio Profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. FMVZ, Morelia, Michoacán.

McLachlan R.I., Wreford N.G., O'Donnell L., de Kretser D.M., Robertson D.M., 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136:5311-5321.

Mei-Chin Chen, Fwu-Long Mi, Zi-Xian Liao, and Hsing-Wen Sung, 2011. Chitosan: Its Applications in Drug-Eluting Devices. *Adv Polym Sci* (2011) 243: 185–230.

Miksicek R., J., 1993. In situ localization of the estrogen receptor in living cells with the fluorescent phytoestrogen coumestrol. *J Histochem Cytochem.* 41:801-810.

Min, K.H., Park, K., Kim, Y., S., Bae, S., M., Lee, S., Jo, J., 2008. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumortargeting in cancer therapy. *J Control Release* 127:208–218.

Mir, F., Fontaine E., 2010. Agonistas de la GnRH como alternativa a la esterilización quirúrgica. *Virbac. Argos. No.120. Sección: En Portada/Castración.* Disponible en: www.virbac.es/p-virbacespubes/pdf/.../Articulo_Argos_Julio_2010.pdf

Montalvo A.C.E., 2010. Técnica histológica. *Histología UNAM.* Disponible en: http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/3_tecnica_histologica.pdf

Moravcová J., Kleinová T., Loučka R., Tyrolová I., Kvasnička F., Dušek M., Čeřovský M., Matuscha P., 2004. Coumestrol content of alfalfa following ensilage. *Animal Feed Science Technology.* 115 (2004) 159-167.

Morishima A., Grumbach M.M., Simpson E.R., Fisher C, Qin K., 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab;* 80:3689–3698

Mosselman S., Polman J., Dijkema R., 1996. ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *Federation European Biochemical Societies Letters* 392(1): 49-53.

Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

O'Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E., Simpson E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev;* 22:289–318

O'Donnell L., Meachen S.J., Stanton G.P., McLachlan I.R., 2006. *Endocrine Regulation of Spermatogenesis.* Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition. Chapter 21. Price Henry's Institute of Medical REsearch, Monash Medical Centre, Victoria, Australia

O'Donnell L., Robertson K. M., Jones M.E., Simpson E.R., 2008. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22(3): 289-318.

OIE, 2009. Organización Mundial de Sanidad Animal (Oficina Internacional de Epizootias). Comisión de Normas Sanitarias de la OIE para los Animales Terrestres. Directrices sobre el control de las poblaciones de perros vagabundos. Anexo XVII. Capítulo 7.7; pp. 313-332.

Pedro A.S., Cabral-Albuquerque E., Ferreira D., Sarmento B., 2009. *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 508.

Pérez-Rivero J.J., Aguilar-Setién A., Villa-Godoy A., Serrano H., 2005. Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esferoidales. Receptores estrogénicos. *Vet. Mex.* 36: 437-452.

Pérez-Rivero J.J., Martínez-Maya J.J., Pérez-Martínez M., Aguilar-Setién A., Serrano H., 2009. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral. *Vet. Méx.*, 40 (1).

Pérez-Rivero J.J., Pérez-Martínez M., Aguilar-Setién A., 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route. *Journal of Applied Animal Research*. Volume 42, Issue 2; 208-212

Pérez-Rivero, J.J., Pérez-Martínez, M., 2011. Perros no domiciliados: aspectos de salud pública y control reproductivo de la población canina. VII congreso Internacional de Epidemiología. San Andrés Cholula, Puebla. pp.1-4.

Potten C.S., 1996. What is an apoptotic index measuring?n Acommentary. *Br J Cancer*; 1743-8.

Promega, 2009. DeanEnd™ Colorimetric TUNEL System. Technical Bulletin. Instructions. USA.

Prophet E. B., 1994. Fixation. Chapter 4. En: Armed Forces Institute of Pathology. *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology. Washington D.C.

Prophet E.B., 1994. Tissue Processing: dehydration, clearing, and infiltration. Chapter 5. En: Armed Forces Institute of Pathology. *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology. Washington D.C.

Qu J., Liu W., Huang C., Xu C., Du G., Gu A., Wang X., 2014. Estrogen receptors are involved in polychlorinated bophenyl-induced apoptosis on mouse spermatocyte GC-2 cell line. *Toxicology in Vitro* 28; 373-380

Reinhart K.C., Dubey R.K., Keller P.J., Lauper U., Rosselli M., 1999. Xeno-oestrogens and phyto-oestrogens induce the synthesis of leukaemia inhibitory factor

by human and bovine oviduct cells. *Molecular Human Reproduction*, vol. 5, no. 10. Pp.899-907.

Romero C.M., Castellanos R.T., Mendoza R.M., Reyes R.A., García A.R., 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinaria México* 28(1): 25-30.

Romero C.M., Castellanos R.T., Mendoza R.M., Reyes R.A., García A.R., 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinaria México* 28(1): 25-30.

Royere D., Guérif F., Laurent-Codoret V., Hocheureau de Reviers M.T., 2004. Apoptosis in testicular germ cells. *International Congress Series* 1266:170-176.

Russel L.D., Ettlin R.A., Sinha Hikim A.P., Clegg E.D., 1990. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, Clearwater, FL.

Russell L.D., 1993. Role in spermiation. En: Ruseel L.D., Griswold M.D (eds) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, Florida: 269-304.

Sakkas D., Seli E., Bizzaro D., Tarozzi N., Manicardi G.C., 2003. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and facility nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol 7. No.4:428-432.

Sánchez, G., Cervantes, E., Ramírez, M., Reza, J., Meléndez E., 2010. "Zoonosis transmitidas a humanos por los perros, implicaciones en la salud pública" Periódico del Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina. UNAM. Año 7. No 31.

Sánchez, G., Cervantes, E., Ramírez, M., Reza, J., Meléndez E., 2010. "Zoonosis transmitidas a humanos por los perros, implicaciones en la salud pública" Periódico del Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina. UNAM. Año 7. No 31.

Scaffidi C., Fulda A., Srinivasan C., Friesen F., Li K.J., Tomaselli K.M., Debatin P.H., Krammen M.E., Peter M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/FAS) signaling pathways, *EMBO J*.17: 1675-1687.

Schlatt S., Ehmcke J., 2014. Regulation of spermatogenesis. An evolutionary biologist's perspective. *Seminars in cells and in Developmental Biology* 29; 2-16.

Schmidt S., Michna H., Diel P., 2005. Combinatory effects of phytoestrogens and 17 β -estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94:445-449.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2016. Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. *Diario Oficial*. Primera Sección, pp:7-14.

Secretaría de Salud y Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, 2010. Esterilización de Animales de Compañía. Disponible en: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/normatividad.html>

Secretaría de Salud, 2001. Programa de Acción: Rabia. Primera Edición México D.F. pp58.

Secretaría de Salud, 2014. Servicios de Salud Pública del D.F. Oficina de Información Pública. Solicitud de Información Pública. Folio INFOMEX 0321500037814.

Şenel Seuda, McClure S.J, 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advance Durg. Delivery Reviews* 56:1467-1480.

Serrano H., Mora-Ramiro G., Peña-Corona S., León-Ortiz P., Salame-Mendez A., Mendieta-Márques E., Gómez-Olivares J.L., García-Suárez M.D., 2014. Acute oral coumestrol treatment induces sperm and sex steroid alterations in mice. *Cell Biology*. Vol. 2, No. 4, pp. 63-67.

Serrano H., Pérez-Rivero J.J., Aguilar-Setién A., De-Paz O., Villa-Godoy A., 2007. Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 470-472.

Serrano H., Pérez-Rivero J.J., Martínez Maya J.J, Aguilar-Setién A., Pérez-Martínez M., García-Suárez Ma. D., 2007. Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuroendocrinol Lett* 2008;29(6):977-980.

Serrano H., Pérez-Rivero J.J., Martínez-Maya J.J., Aguilar-Setién A., Pérez-Artínez M., García-Suárez M.D., 2008. Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuroendocrinology Lett* 29(6):977-980.

Setchell K.D., Lawson A.M., Borriello S.P., Harkness R., Gordon H., Morga D.M., Kirk D.N., Adlercreutz H., Anderson L.C., Axelson M., 1981. Lignan formation in man microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *The Lancet* 318 (8236): 4-7.

Sharpe R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The Physiology of Reproduction*, ed 2. Raven Press Ltd., New York, pp 1363-1434.

Shughrue P.J., Merchenthaler I, 2000. Estrogen is more than just a "sex hormone": novel sites of estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Front Neuroendocrinol* 21:95-101.

Skinner M. K., 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.* 1991; 12:45.

- Smith C.L., Nawaz Z., O'Malley B.W., 1997. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen 4-hydroxitamoxifen, *Mol. Endocrinol.* 11(6): 657-666.
- Traub, R. J., Robertson, I. D., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R. C. A., 2002. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in Northeastern India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 539-545.
- Troiano L., Faustini F.M., Lovato E., Frasldati A., Malorni N., Capri M., Grassilli E., Marrama P., Franceschi C., 1994. Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 202:1315-1321.
- Turner K.J., Morley M., Atanassova N., Swanston I.D., Sharpe R.M., 2000. Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *J. Endocrinol* 164: 225-238.
- Univero de Salud, 2003. "Situación actual de la rabia en el Distrito Federal y mediadas de control" Dirección de Servicios de Salud Pública del Distrito Federal. 2003-3(23): 1-3.
- Valderrabano, J. 1992. Alteraciones reproductivas asociadas al consumo de fitoestrógenos. *Investigación Agraria Producción y Sanidad Animales (España)* 7(2): 115-124
- Venkatesan, J., Kim, S. K., 2010. Chitosan composites for bone tissue engineering an overview. *Mar Drugs* 8:2252–2266.
- Vinoth-Kumar, L., Snima, K.S., Bumagardner, J.D., Shantikumar, V., Jayakumar, R., 2011. Chitosan Based Nanoparticles in Cancer Therapy, *Adv Polym Sci* (2011) 243: 55–92.
- Vivek R., Nipun Babu V., Thangam R., Subramanian K.S., Kannan S., 2013. pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 111:117– 123
- Wang D., Xie J., Zhu X., Li J., Zhao D., Zhao M., 2014. A recombinant estrogen receptor fragment-based homogenous fluorescent assay for rapid detection of estrogens. *Biosensors and Bioelectronics* 55:391-395.
- Weihua Z., Andersson S., Cheng G., Simpson E.R., Warner E.R., Gustafsson J.A., 2003. Update on estrogen signaling. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 546(1): 17-24.

Weinbauer G.F., Nieschlag E., 1993. Hormonal control of spermatogenesis. In: de Kretser Dm (ed) *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, San Diego, CA, pp 99-142.

Whitten P.L., Patisaul H.b., Young L.J., 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicology and Teratology* 24: 47-54.

Whyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1992. Cell Death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251–306

Wilson M.E., 2003. Biological function and mode of action of the androgen receptor. *Pure Appl. Chem*; 11-12:1685-1697.

Wocławek-Potocka I., Mannelli C., Boruszewska D., Kowalczyk I., Waśniewski T., Skarżyński D.J., 2013. Diverse Effects of Phytoestrogens on the REproductive Performance: Cow as a Model. Review Article. *International Journal of Endocrinology*. Volume 2013, Article ID 650984. 15 pp.

Wong E.W., Cheng C.Y., 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci.* 32(5):290-299

Zenteno, V., N., 2011. Proyecto Evaluación del comportamiento de perros machos antes y después de la esterilización química y quirúrgica. *Boletín Veterinario Oficial*, BVO No.14, II Semestre E, 2011; pp 1-5.

Zhang H., Neau S.H., 2002. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials* 23:2761-2766.

JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ADMINISTRACIÓN DE COUMESTROL MEDIANTE IMPLANTES DE QUITOSÁN Y SU EFECTO EN EL TEJIDO TESTICULAR DE RATAS WISTAR

Martínez-Munguía Mariana¹, López-Díaz Osvaldo², Pérez-Rivero Cruz y Celis Juan José³

Abstract

Fondo: Los coumestanos, es una familia a la que pertenece el coumestrol (COU), éste es un fitoestrógeno que al unirse a receptores estrogénicos α y β como antagonista, produce alteraciones en el aparato reproductor de los machos (Pérez-Rivero et al., 2009). El quitosán es un polímero obtenido de la quitina (Hernández-Cocoltzi *et al.*, 2009) con la habilidad de formar geles y así funcionar como vehículo de fármacos (Şenel y Mclure, 2004). El objetivo de este estudio fue comparar y cuantificar los cambios histológicos a nivel parénquima testicular entre animales tratados con diferentes dosis de COU (800 μg y 1600 μg) por vía subcutánea durante 5 semanas.

Resultados: Hubo una disminución tanto en el número total de espermatogonias como en el de espermatoцитos, teniendo un efecto más agudo en el tratamiento de 1600 μg de COU, en el tratamiento con 800 μg de COU se observó un efecto inicial retardado, en ambos tratamientos inician con un aumento significativo en el área y diámetro del túbulo seminífero, a través de las semanas disminuye, lo que coincide con la recuperación de las células germinales al final del tratamiento.

Conclusiones: Ambas dosis de COU causan daños a nivel del parénquima testicular que pueden ocasionar daños reproductivos.

Palabras clave: Coumestrol, fitoestrógenos, morfometría, testículos, quitosán

Introducción

El coumestrol (COU) es un fitoestrógeno perteneciente a la familia de los coumestanos, es una sustancia producida por las plantas con una estructura similar al estradiol-17 β por lo que imita la acción de los estrógenos ingresando a las células

blanco (Pérez-Rivero, 2009) (testículos, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, próstata, ovarios, glándula pineal, tiroides, epitelio intestinal, etc.) las cuales presentan receptores estrogénicos (Mosselman *et al.*, 1996; Weihua *et al.*, 2003; Lenis *et al.*, 2010). Los estrógenos poseen la capacidad de unirse a la forma citoplasmática del receptor nuclear y tienen el potencial de afectar la síntesis de esteroides y el metabolismo a través de diversas vías (Wang *et al.*, 1994).

Los testículos son capaces de sintetizar y responder ante los estrógenos (O'Donnell, 2008) por lo que el COU, al presentar una estructura similar a los estrógenos, compete contra la unión estrogénica en los ER, disminuyendo los niveles de estrógeno a través de la inhibición de la actividad de la aromatasa (Le Bars *et al.*, 1990; Valderrabano, 1992; Lenis *et al.*, 2010) lo que atribuye a alteraciones en los túbulos seminíferos (Serrano *et al.*, 2014). La administración o deficiencia de estrógenos puede afectar el desarrollo y/o el mantenimiento del eje hipotálamo-pituitaria-testículos del cual depende la espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1993; Sharpe, 1994; McLachlan *et al.*, 1996; O'Donnell *et al.*, 2008).

La evidencia de que el COU puede causar perturbaciones a nivel reproductivo en mamíferos fue reportada desde 1946 por Bennets *et al.*, indicando que la ingestión de pastura de trébol rica en coumestrol causa infertilidad en la oveja. Observaciones similares se han notificado en mamíferos más pequeños, se reporta que la administración de COU en ratas macho Wistar produce un efecto de disminución del lumen de los túbulos seminíferos e incrementa el índice apoptótico de las células germinales (Lenis *et al.*, 2010), lo que coincide con Pérez-Rivero *et al.*, en 2014, en donde se evaluó el efecto del coumestrol administrado vía oral (5 µg por g de peso corporal) durante 30 días en vampiro (*Desmodus rotundus*) y se examinaron muestras de tejido testicular pudiéndose observar una reducción en el grosor del epitelio germinal y una reducción en el diámetro de los túbulos seminíferos al igual que sucedió con la rata.

Para la aplicación del COU en este estudio se utilizará al quitosán como vehículo, ya que es un polímero de acetil-glucosamina obtenido de una desacetilación termoalcalina heterogénea de la quitina (Hernández-Cocoltzi *et al.*, 2009) y tiene la habilidad de formar geles en pH ácidos por su naturaleza policatiónica en este tipo de medios; es hidrófilo y puede retener agua en su estructura (Şenel y Mclure, 2004). Su biodegradación lleva a la liberación de aminoazúcares, que se incorporan a las vías metabólicas de las glicoproteínas o se excretan (Zhang y Neau, 2002), y se ha utilizado en gran medida para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (Kumar *et al.*, 2004), regeneración de tejidos, cicatrización de heridas, coagulación de la sangre, y la inmunoestimulación (Mei-Chin *et al.*, 2011) debido a su abundante disponibilidad, capacidad única de adhesión a la mucosa, a sus propiedades

farmacológicas inherentes, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y baja inmunogenicidad (Kumar *et al.*, 2004). Los implantes de dicho polisacárido son biodegradables y pueden evitar problemas asociados durante la recuperación ya que eliminan la necesidad de una segunda operación quirúrgica para retirarlo; por lo tanto, el quitosán ha sido considerado como un material prometedor para el desarrollo de dispositivos médicos (Mei-Chin *et al.*, 2011).

Metodología

Se utilizaron 45 ratas macho raza Wistar de 9 semanas de edad, provenientes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-bioterio) de la UAUM-XOC, las cuales fueron asignadas a 3 grupos de manera aleatoria, cada grupo conformado por 15 animales. Al grupo 1, correspondieron los animales control; al grupo 2 a los animales implantados con 800 μ l de coumestrol/ 300 μ l quitosán vía subcutánea y al grupo 3 a los animales implantados con 1600 μ l de coumestrol/ 300 μ l de quitosán vía subcutánea.

Tratamiento experimental

Los animales fueron inducidos uno por uno, vía inhalatoria, a anestesia general con isoflourano a una concentración del 3% y se monitorearon con pulsoxímetro. Una vez inducidos se rasuró la zona a implantar (área de la cruz) y se realizó la asepsia y antisepsia de los mismos. El implante se preparó mezclando la concentración correspondiente de COU (800 μ l o 1600 μ l) con 300 μ l de quitosán con ayuda de un agitador tipo vortex hasta que estuvieron completamente homogeneizados. Los animales fueron implantados por vía subcutánea con jeringas de insulina y agujas de calibre 23. Los animales se alojaron en jaulas individuales y se mantuvieron con el implante por cuatro semanas, a partir de la semana 5 se realizó eutanasia a 3 animales de cada grupo por semana hasta finalizar en la semana 9.

Morfometría celular

Se obtuvieron los testículos y se fijaron en formol buferado al 10%. El procesamiento histológico de los testículos se realizó dentro del Laboratorio de Histopatología de la UAM-XOC y se utilizó la técnica de inmersión en parafina, realizando cortes de 5 micrometros y tinciones con Hematoxilina y Eosina según el Manual "Métodos de Laboratorio en Histotecnología" (Armed Forces Institute of Pathology, 1994). Una vez obtenidas las laminillas con los tejidos testiculares, se tomaron microfotografías de las preparaciones histológicas con una cámara digital especializada para microscopio OPT900 para realizar la medición del área, diámetro, epitelio germinal y el espacio intersticial de los túbulos así como para realizar la morfometría celular, en donde se contaron y compararon estadísticamente el número de células de Leydig, Sertoli, espermatogonias, espermatocitos (I y II) y espermátides elongadas.

Análisis estadísticos

Se analizaron los resultados estadísticamente de manera independiente por semana para conocer la relación que existe entre tratamientos con pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney.

Resultados

Morfometría celular

Se pudo apreciar una disminución tanto en el número total de espermatogonias como en el de espermatocitos, teniendo un efecto más agudo pero con tendencia a la recuperación en el tratamiento de 1600 µg de COU, mientras que en el tratamiento con 800 µg de COU se observó un efecto inicial retardado en comparación con el otro tratamiento pero más perdurable ($p < 0.05$). En cuanto a las células de Leydig se refiere ambos tratamientos mostraron efectos similares ($p < 0.05$), en cambio en las células de Sertoli se pudo observar un efecto más agudo y sostenido en el tratamiento 800 µg de COU, es decir la reducción en el número de células de sertoli totales fue mucho mayor ($p < 0.05$). Por otra parte, las EE se vieron mayormente reducidas en número en el tratamiento de 1600 µg de COU, pero ambos tratamientos mostraron una tendencia a la recuperación ($p < 0.05$). (Tabla 1 y 2) (Figura 1 y 2).

Medidas del túbulo seminífero

En cuanto al diámetro y área se refiere, los túbulos seminíferos en ambos tratamientos inician con un aumento significativo que a través de las semanas va disminuyendo, lo que coincide con la recuperación de las células germinales al final del tratamiento ($p < 0.05$). La medida del espacio intersticial tuvo un incremento de casi un 50% en ambos tratamientos, pero se pudo observar la disminución del mismo a lo largo del tratamiento ($p < 0.05$); en cuanto al epitelio germinal se refiere, de manera global se nota un incremento en el mismo, el cual se reduce en las dos últimas semanas del tratamiento ($p < 0.05$) (Tabla 3 y 4).

Tabla 1. COMPARACIÓN DE MEDIAS. MORFOMETRÍAS (número de células)

	CONTROL	TX 800 µg COU	TX 1600 µg COU
Espermatogonias	51.08 ± 2.01 ^a	43.84 ± 2.27 ^b	42.35 ± 2 ^b
Espermatocitos	177.06 ± 5.79 ^a	78.4 ± 7.39 ^b	73.62 ± 7.11 ^b
Células de Leydig	11.62 ± 0.66 ^a	8.55 ± 0.78 ^b	9.51 ± 0.71 ^b
Células de Sertoli	13.24 ± 0.35 ^a	8.86 ± 0.46 ^b	10.08 ± 0.62 ^b
Espermátides Elongadas	111.84 ± 2.64 ^a	62.44 ± 2.89 ^b	63.74 ± 3.01 ^b

Tabla 2. COMPARACIÓN SEMANAL. MORFOMETRÍAS (número de células)

	Semana	Control	800 µg COU	1600 µg COU
Espermatogonias	5	65.78 ± 2.95 ^a	61.33 ± 3.31 ^a	32.33 ± 3.2 ^b
	6	46.33 ± 2.89 ^a	38.56 ± 7.05 ^a	53 ± 5.22 ^a
	7	43.33 ± 3.10 ^a	41.44 ± 1.91 ^a	40.78 ± 4.42 ^a
	8	60.22 ± 3.96 ^a	41.89 ± 4.07 ^b	41.56 ± 3.13 ^b
	9	39.78 ± 2.39 ^a	36 ± 3.22 ^a	44.11 ± 3.94 ^a
Espermatocitos	5	216.44 ± 7.18 ^a	130 ± 14.02 ^b	85 ± 12.02 ^b
	6	175.78 ± 7.40 ^a	101.89 ± 16.63 ^b	126.22 ± 10.81 ^b
	7	147.67 ± 13.58 ^a	50.89 ± 16.04 ^b	43.65 ± 17.97 ^b
	8	203.78 ± 6.23 ^a	62 ± 8.14 ^b	48.89 ± 11.02 ^b
	9	141.67 ± 6.83 ^a	47.22 ± 7.40 ^b	64.44 ± 11.17 ^b
C. Leydig	5	13.89 ± 0.51 ^a	15.44 ± 1.46 ^{a,b}	16.56 ± 0.89 ^b
	6	6.89 ± 0.71 ^a	8 ± 1.31 ^a	10.78 ± 1.17 ^b
	7	8.67 ± 0.68 ^a	6.33 ± 1.35 ^{a,b}	5.33 ± 0.50 ^b
	8	16.56 ± 1.71 ^a	5.56 ± 0.33 ^b	7.89 ± 1.19 ^b
	9	12.11 ± 0.61 ^a	6.44 ± 0.89 ^b	7 ± 0.74 ^b
C. Sertoli	5	16 ± 0.52 ^a	10.22 ± 0.57 ^b	13.67 ± 1.47 ^c
	6	10.89 ± 0.51 ^a	11.56 ± 0.76 ^a	11.67 ± 0.62 ^a
	7	12 ± 0.48 ^a	5 ± 1.01 ^b	4.22 ± 0.46 ^b
	8	13.89 ± 0.73 ^a	8.11 ± 0.69 ^b	9.33 ± 0.52 ^b
	9	13.44 ± 0.50 ^a	9.44 ± 0.68 ^b	11.56 ± 1 ^{a,b}
Espermátides Elongadas	5	119 ± 4.5 ^a	51.89 ± 7.13 ^b	44.89 ± 5.74 ^b
	6	123.11 ± 3.79 ^a	71.22 ± 5.93 ^b	73.67 ± 4.50 ^b
	7	116.2 ± 5.99 ^a	67 ± 4.40 ^b	59 ± 5.55 ^b
	8	89.33 ± 3.65 ^a	53.11 ± 8.65 ^b	72.78 ± 8.3 ^b
	9	111.56 ± 4.56 ^a	69 ± 2.82 ^b	68.34 ± 4.91 ^b

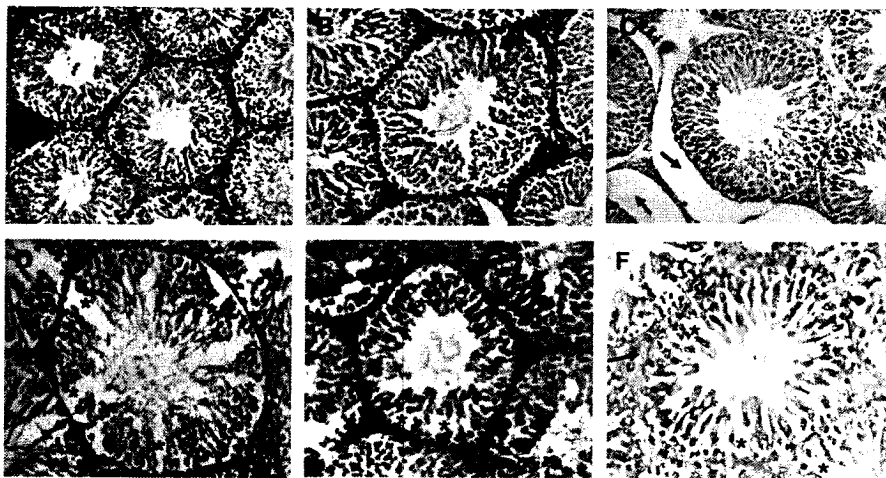


Figura 1. Imágenes representativas del tejido testicular del grupo control (A) y correspondientes al tratamiento de 800 µg de COU, (B) semana 5, (C) semana 6, (D) semana 7, (E) semana 8, (F) semana 9. Se puede observar la presencia de vacuolas (*) dentro del túbulo seminífero a partir de la semana 5 (B) así como el decremento en la cantidad de células germinales y su regeneración a partir de la semana 8 (E) además del espacio intersticial (flechas).

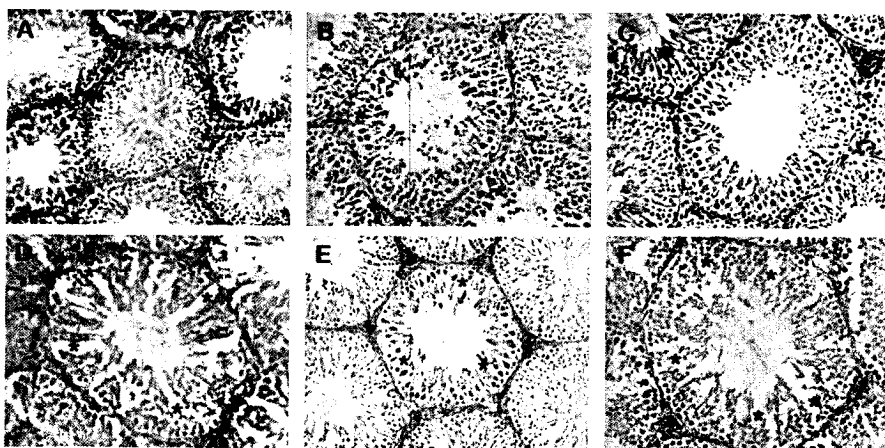


Figura 2. Imágenes representativas del tejido testicular del grupo control (A) y correspondientes al tratamiento de 1600 µg de COU, (B) semana 5, (C) semana 6, (D) semana 7, (E) semana 8, (F) semana 9. Al igual que con el tratamiento de 800 µg de COU, se puede observar una reducción en la cantidad de células germinales a partir de la semana 5 (B) así como la formación de vacuolas (*) dentro del túbulo seminífero además del espacio intersticial (flechas).

Tabla 3. COMPARACIÓN DE MEDIAS. MEDICIONES

	CONTROL	TX 800 µg COU	TX 1600 µg COU
Diámetro(µm)	151.41 ± 9.80 ^a	304.88 ± 11.01 ^b	288.3 ± 9.27 ^b
Área(µm ²)	40982 ± 6231.96 ^a	148464 ± 10694.9 ^b	172221 ± 29452.8 ^b
Grosor Epitelio Germinal(µm)	37.04 ± 1.14 ^a	58.57 ± 2.55 ^b	68.69 ± 3.91 ^b
Espacio Intersticial(µm)	5.08 ± 0.26 ^a	11.30 ± 0.75 ^b	9.01 ± 0.72 ^c

Tabla 4. COMPARACIÓN SEMANAL. MEDICIONES

	Semana	Control	800 µg COU	1600 µg COU
Área (µm ²)	5	24758.22 ± 917.98 ^a	209608.77 ± 4289.15 ^b	214846.11 ± 6813.23 ^b
	6	20948.11 ± 1615.05 ^a	239807.44 ± 16348.41 ^b	218650.22 ± 19439.28 ^b
	7	20507.08 ± 899.05 ^a	124055.03 ± 11915.55 ^b	245844.37 ± 143088.55 ^b
	8	119234.87 ± 10218.78 ^a	81381.40 ± 8359.71 ^b	99038.77 ± 9489.50 ^{a,b}
	9	19461.44 ± 734.68 ^a	87465.22 ± 5965.66 ^b	82725.12 ± 4678.99 ^b
Diámetro (µm)	5	125.66 ± 4.39 ^a	359.44 ± 8.09 ^b	356.66 ± 11.30 ^b
	6	120.44 ± 6.91 ^a	390 ± 15.77 ^b	342 ± 10.80 ^c
	7	111.99 ± 3.97 ^a	286.80 ± 16.05 ^b	264.05 ± 14.97 ^b
	8	273.44 ± 13.87 ^a	237.34 ± 15.37 ^a	254.56 ± 13.79 ^a
	9	125.58 ± 5.29 ^a	240.83 ± 12.60 ^b	223.55 ± 3.86 ^b
Epitelio Germinal (µm)	5	28.42 ± 0.63 ^a	82.86 ± 4.09 ^b	152.30 ± 3.03 ^c
	6	29.76 ± 0.96 ^a	104.83 ± 2.90 ^b	101.19 ± 3.90 ^b
	7	30.58 ± 0.81 ^a	43.09 ± 2.39 ^b	29.40 ± 1.55 ^a
	8	64.73 ± 1.84 ^a	37.27 ± 2.16 ^b	29.43 ± 1.65 ^c
	9	31.45 ± 0.80 ^a	24.81 ± 1.11 ^b	32.15 ± 1.69 ^a
Espacio Intersticial (µm)	5	3.76 ± 0.16 ^a	11.05 ± 1.11 ^b	6.52 ± 0.97 ^c
	6	3.73 ± 0.20 ^a	16.67 ± 3.70 ^b	4.22 ± 0.56 ^a
	7	3.57 ± 0.31 ^a	10.68 ± 0.54 ^b	10.35 ± 0.52 ^b
	8	10.76 ± 0.99 ^a	9.23 ± 0.46 ^a	14.80 ± 2.71 ^a
	9	3.51 ± 0.23 ^a	10.25 ± 1.99 ^b	10.88 ± 2.69 ^c

Discusión

Una de las funciones principales de las células somáticas en el testículo, como lo son las células de Sertoli y las células de Leydig, es la de recibir señales endócrinas a través del torrente sanguíneo y transmitir las de manera apropiada para el desarrollo de las células germinales. Tanto en las CL como en las CS se encuentran receptores estrogénicos, lo que sugiere que estas células son capaces de responder a los estrógenos.

Los estrógenos son producidos en los testículos e incitan a una acción parácrina dentro de la espermatogénesis, sin embargo, los estrógenos también pueden generar un impacto en la función testicular a través de los mecanismos de retroalimentación endócrina que regulan la espermatogénesis y el desarrollo de las células germinales los cuales han sido mencionados anteriormente (O'Donnell *et al.*, 2006).

Actualmente se han evaluado nuevas estrategias dentro de la tecnología farmacéutica para aumentar la eficiencia en la administración de compuestos con propiedades terapéuticas mediante vehículos naturales como el quitosán (Castillo *et al.*, 2014) cuyas propiedades permiten mezclarse con otros polímeros lo que ha llevado al desarrollo de numerosas aplicaciones de quitosán y sus derivados en biomedicina, matrices de micro-esferas y / o microcápsulas y la administración de fármacos para una liberación sostenida con el fin de mejorar el rendimiento de estos (Pedro *et al.*, 2009; Vivek *et al.*, 2013).

En el presente estudio se pudieron determinar distintos cambios morfométricos e histométricos en el parénquima testicular entre un grupo de animales control y dos grupos de animales tratados con distintas dosis de COU (800 µg y 1600 µg) utilizando al quitosán como vehículo para la administración de este fitoestrógeno por vía subcutánea.

Dentro de los cambios se encontró la disminución en el número total de células germinales y espermatídes elongadas, así como la disminución del grosor del epitelio germinal, el aumento del espacio intersticial entre los túbulos seminíferos y la formación de vacuolas a nivel epitelio germinal en los tejidos de los animales tratados con diferentes dosis de COU, resultando en el aumento del área y diámetro tubular.

Se sabe que la espermatogénesis de los roedores está bajo control de los estrógenos (Carreau *et al.*, 2003), la biosíntesis de estos es catalizada por un miembro de la superfamilia de citocromo P450, la aromatasa (O'Donnell *et al.*, 2001), convirtiendo la testosterona y la androstenediona a estrógenos aromáticos como el estradiol y la estrona respectivamente (Mosselman *et al.*, 1996; Karkola y

Wähälä, 2009). La presencia de esta enzima es mucho mayor en las células germinales en comparación con las células de Leydig (Janulis *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2001) y se ha reportado la actividad de la P450 durante la división meiótica en células germinales y maduración de las mismas en espermátides elongadas (Levallet *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2001).

El COU, tiene la capacidad de unirse a la aromatasa e inhibir la formación de los estrógenos (Karkola y Wähälä, 2009), lo que puede estar relacionado con el control de la división de las células germinales y alterar su función, ya que estudios demuestran que en los hombres, la deficiencia de esta enzima, producida por la mutación del gen P450aro, conduce a la esterilidad (Morishima *et al.*, 1995; Carani *et al.*, 1997; Carreau *et al.*, 2003).

Por otra parte, la acción genómica del COU ocurre mediante la unión directa a cualquiera de los receptores estrogénicos α o β , interfiriendo con la unión de los estrógenos a los receptores estrogénicos modificando la respuesta a nivel tisular de esta unión (Serrano *et al.*, 2014).

Como consecuencia a la ausencia de estrógenos, la gametogénesis se ve afectada por un incremento en la apoptosis de las células germinales (Laurentino *et al.*, 2001), ésta juega un papel crítico en la homeostasis de la espermatogénesis pudiendo resultar en alteraciones del túbulo seminífero (Qu *et al.*, 2011).

En este estudio, en los tejidos de los animales tratados con COU, se pudo observar la formación de vacuolas y la ampliación del espacio intersticial entre los túbulos seminíferos, lo que sugiere que el COU pudo traspasar la barrera hemato-testicular, causar efectos tóxicos y desencadenar daños a nivel tisular en los testículos, situación que concuerda con lo encontrado por Zhang *et al.*, (2016) quien menciona que la destrucción de la integridad de la estructura de la barrera hemato-testicular se caracteriza por la separación de la unión estrecha y vacuolas en el tejido testicular, dicha destrucción es provocada por un mecanismo tóxico reproductivo que causa daño en la membrana de las células germinales e incrementa el espacio intersticial entre los túbulos seminíferos.

Por otra parte, se encontró incremento en el volumen testicular, este se puede explicar debido a que las deficiencias de estrógenos, ya sea por delección de los receptores estrogénicos o por deficiencias a nivel del citocromo P450aro, alteran la espermatogénesis produciendo retención de líquidos, el fluido secretado por el epitelio seminífero no es reabsorbido y se acumula en conductos eferentes, rete testis y los túbulos seminíferos produciendo un aumento en el peso de los testículos que como consecuencia incrementa el volumen testicular lo que favorece al

aumento de los espacios intertubulares a nivel tisular (Hess, et al, 2001; Carreau, et al, 2007; Pérez-Rivero et al., 2014)

Conclusiones

El COU administrado vía subcutánea utilizando al quitosán como vehículo causó daños histológicos significativos a nivel parénquima testicular en animales tratados con diferentes dosis. Dentro de los hallazgos se encontró una disminución tanto en el número total de espermatogonias como en el de espermatoцитos, teniendo un efecto más agudo en el tratamiento de 1600 µg de COU, sin embargo el efecto fue disminuyendo conforme avanzaron las semanas. Por otro lado en el tratamiento con 800 µg de COU se observó un efecto inicial más lento en comparación con el otro tratamiento, no mostrando evidencia de recuperación. En lo referente a la cantidad de CL en ambos tratamientos los efectos fueron similares, en cambio en las CS se observó un efecto más agudo y sostenido en el tratamiento 800 µg de COU.

Por otra parte, la cantidad de EE disminuyó en ambos tratamientos, siendo en el de 1600 µg de COU donde se observó el mayor efecto, sin embargo, se observó una tendencia a la recuperación.

En lo referente al diámetro y área de los túbulos seminíferos en ambos tratamientos se presenta un aumento significativo, el cual cómo avanzan las semanas va disminuyendo, situación que coincide con la recuperación de las células germinales observadas al final del tratamiento.

Por último, tanto el área del túbulo seminífero, como el grosor del epitelio germinal presentaron un aumento significativo en ambos tratamientos, observando una recuperación hacia el final del tratamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que ambos tratamientos (800 µg de COU y 1600 µg de COU) provocan daños en el tejido testicular de ratas macho Wistar al ser administrados vía subcutánea utilizando al quitosán como vehículo, por lo tanto este trabajo aporta evidencia de que la administración del complejo COU-quitosán por vía subcutánea, permite obtener una distribución importante del fitoestrógeno en los tejidos reproductivos y ejercer efectos biológicos similares a los observados con la administración oral de COU por vía oral en otros mamíferos.

REFERENCIAS

1. Pérez-Rivero J.J., Martínez-Maya J.J., Pérez-Martínez M., Aguilar-Setién A., Serrano H., 2009. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral. *Vet. Méx.*, 40 (1).
2. Hernández Cocoltzi H., Alamnza A.E., Flores A.O., Viveros N.E.L., Cassellis R.E., 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficie y vacío* 22(3) 57-60.
3. Şenel Seuda, McClure S.J, 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advance Durg. Delivery Reviews* 56:1467-1480.
4. Mosselman S., Polman J., Dijkema R., 1996. ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *Federation European Biochemical Societies Letters* 392(1): 49-53.
5. Weihua Z., Andersson S., Cheng G., Simpson E.R., Warner E.R., Gustafsson J.A., 2003. Update on estrogen signaling. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 546(1): 17-24.
6. Lenis S.Y.Y., Gutiérrez G.M.T., Tarazona M.A.M., 2010. Efectos de los fitoestrógenos en la reproducción animal. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(2): 5555-5565.
7. Pérez-Rivero J.J., Pérez-Martínez M., Aguilar-Setién A., 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route. *Journal of Applied Animal Research. Journal of Applied Animal Research. Vol. 42, Issue 2; 208-212*
8. Wang D., Xie J., Zhu X., Li J., Zhao D., Zhao M., 2014. A recombinant estrogen receptor fragment-based homogenous fluorescent assay for rapid detection of estrogens. *Biosensors and Bioelectronics* 55:391-395.
9. O'Donnell L., Robertson K. M., Jones M.E., Simpson E.R., 2008. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22(3): 289-318.
10. Le Bars J., Le Bars P., Et Brice G., 1990. Presence accumulation et devenir du coumestrol dans luzeme et ses derives. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 166(5): 463-469.
11. Valderrabano, J. 1992. Alteraciones reproductivas asociadas al consumo de fitoestrógenos. *Investigación Agraria Producción y Sanidad Animales (España)* 7(2): 115-124
12. Serrano H., Mora-Ramiro G., Peña-Corona S., León-Ortiz P., Salame-Mendez A., Mendieta-Márques E., Gómes-Olivares J.L., Garcia-Suárez M.D., 2014. Acute oral coumestrol treatment induces sperm and sex steroid alterations in mice. *Cell Biology. Vol. 2, No. 4, pp. 63-67. Doi: 10.11648/j.cb.20140204.*

13. Weinbauer G.F., Nieschlag E., 1993. Hormonal control of spermatogenesis. In: de Kretser Dm (ed) *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, San Diego, CA, pp 99-142.
14. Sharpe R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The Physiology of Reproduction*, ed 2. Raven Press Ltd., Ney York, pp 1363-1434.
15. McLachlan R.I., Wreford N.G., O'Donnell L., de Kretser D.M., Robertson D.M., 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136:5311-5321.
16. Bennets H.W., Underwood E.J. and Skier F.L., 1946. A breeding problema of sheep in the south-west division of Western Australia. *Journal of Agriculture, Western Australia*, vol23, pp.1-12. 1946.
17. Zhang H., Neau S.H., 2002. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials* 23:2761-2766.
18. Mei-Chin Chen, Fwu-Long Mi, Zi-Xian Liao, and Hsing-Wen Sung, 2011. Chitosan: Its Applications in Drug-Eluting Devices. *Adv Polym Sci* (2011) 243: 185–230.
19. Kumar, M. N., Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A. J., 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev* 104:6017–6084.
20. O'Donnell L., Meachen S.J., Stanton G.P., McLachlan I.R., 2006. *Endocrine Regulation of Spermatogenesis*. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Third Edition. Chapter 21. Price Henry's Institute of Medical REsearch, Monash Medical Centre, Victoria, Australia
21. Carreau S., Lambard S., Delalande C., Denis-Galeraud I., Bilinska B., Bourguiba S., 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1:35
22. Karkola S., Wähälä K., 2009. The binding of lignans, flavonoids and coumestrol to CYP450 aromatase: A molecular modelling study. *Molecular and cell endocrinology* 301; 235-244
23. O'Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E., Simpson E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*; 22:289–318
24. Janulis L., Bahr J.M., Hess R.A., Janssen S., Osawa Y., Bunick D., 1998. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 25. aromatase. *J Androl* 19:65–71
25. Morishima A., Grumbach M.M., Simpson E.R., Fisher C, Qin K., 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*; 80:3689–3698

26. Carani C., Qin K., Simoni M., Faustini-Fustini M., Serpente S., Boyd J., Korach K.S., Simpson E.R., 1997. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *New Engl J Med.*, 337: 91-95
27. Qu J., Liu W., Huang C., Xu C., Du G., Gu A., Wang X., 2014. Estrogen receptors are involved in polychlorinated biphenyl-induced apoptosis on mouse spermatocyte GC-2 cell line. *Toxicology in Vitro* 28; 373-380
28. Walczak-Jędrzejowska R., Marchelewska K., Oszukowska E., Filipiak E., Słowikowska-Hilczer J., Kula K., 2013. Estradiol and testosterone inhibit rat seminiferous tubule development in a hormone-specific way. *Reproductive Biology* 13; 243-250