



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ANIMALES



“EFECTO DE *IMPRINTING* HORMONAL CON
FITOESTRÓGENOS SOBRE MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA
Y TESTICULAR EN RATAS”

PATRICIO ANDRÉS LAVADOS SOLÍS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

PROFESOR GUÍA:

BIOL. MSc. LEONARDO ENRIQUE GAETE GONZÁLEZ

Santiago, Chile.

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ANIMALES



“EFECTO DE *IMPRINTING* HORMONAL CON
FITOESTRÓGENOS SOBRE MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA
Y TESTICULAR EN RATAS”

PATRICIO ANDRÉS LAVADOS SOLÍS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	:	LEONARDO GAETE
PROFESOR CONSEJERO:		BESSIE URQUIETA
PROFESOR CONSEJERO:		OSCAR PERALTA

Santiago, Chile.
2012

"EFECTO DE *IMPRINTING* HORMONAL CON FITOESTRÓGENOS SOBRE MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA Y TESTICULAR EN RATAS".

PATRICIO A. LAVADOS SOLÍS*

* Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

RESUMEN

Se estudió la capacidad de dos fuentes de fitoestrógenos para inducir impronta hormonal (*hormonal imprinting*) en rata *Sprague-Dawley* macho adulto. Para ello, se administró genisteína (3mg/kg peso vivo), o un extracto etanólico, obtenido a partir de *Trifolium pratense* cultivar "Pawera", a ratas en su día 15 y 18 de preñez, las que fueron mantenidas con dieta libre de fitoestrógenos desde una semana antes de la cruce. Se utilizaron los machos de la camada obtenida (F1), los que se mantuvieron con dieta libre de fitoestrógenos durante todo el estudio. Al día 60 de vida, recibieron 17- β -Estradiol (E2) (100 μ g/Kg p.v.); en el día 63 se extrajeron los testículos y caudas epididimarias para observar los efectos sobre la morfología, cantidad y viabilidad de los espermatozoides, y para medir el perímetro basal, luminal y alto del túbulo seminífero. Los grupos control recibieron el vehículo de la genisteína o del extracto. Los resultados demostraron que los machos F1 expuestos prenatalmente al extracto o la genisteína y a E2 a los 60 días de edad, presentaron un incremento en el número de espermatozoides presentes en la cauda epididimaria, aumento que fue mayor en los expuestos a genisteína. El perímetro luminal aumentó producto de la impronta con genisteína y no varió frente al tratamiento con E2. Los animales improntados con extracto y tratados con E2, presentaron lúmenes más distendidos. El alto del epitelio seminífero disminuyó debido a la impronta con genisteína o extracto, independiente del tratamiento con E2. No se observaron modificaciones a nivel de perímetro basal del túbulo seminífero, morfología ni viabilidad de los espermatozoides. A la luz de los resultados obtenidos, se propone que crías macho de hembras alimentadas con dietas bajas en fitoestrógenos, podrían ser incapaces de responder a E2 en la vida adulta, y por lo tanto, no aumentarían su número de espermatozoides.

Palabras clave: Fitoestrógenos – Estradiol - Imprinting hormonal – Cambio epigenético – Espermatogénesis.

ABSTRACT

We studied the ability of two sources of phytoestrogens to induce hormonal imprinting in Sprague-Dawley adult male. Genistein (3mg/kg body weight) or an ethanol extract obtained from *Trifolium pratense* cultivar "pawera" was administered to rats in the days 15 and 18 of pregnancy which were feed with phytoestrogen-free diet from one week prior to breeding. We utilize the male rats from the litter (F1), which remained with phytoestrogen-free diet throughout the study. At day 60 of life, they received 17- β -Estradiol (E2) (100 mg / kg bw), and on day 63 the testes and cauda epididymis were extracted to observe the effects on the morphology, number and viability of sperm, and to measure the perimeter of basal, luminal and height of the seminiferous tubule. Control groups received the vehicle of genistein or extract. The results showed that F1 males exposed prenatally to extract or genistein, and E2 at 60 days old, showed an increase in the number of spermatozoa present in the cauda epididymis, an increase that was most noticeable in those exposed to genistein. The luminal perimeter increased due to imprinting with genistein and did not vary compared to treatment with E2. The imprinted animals with extract and treated with E2, presented more distended lumens. The height of the seminiferous epithelium decreased due to the imprinting with genistein or extract, independent of treatment with E2. No changes were observed at the basal perimeter of the seminiferous tubule, sperm morphology and viability. In light of the results, it is proposed that male offspring of pregnant females fed diets low in phytoestrogens, may be unable to respond to exogenous E2 in adult life, not increasing the number of sperm.

Key words: Phytoestrogen – Estradiol – Hormonal imprinting – Epigenetic change – Spermatogenesis.

1. INTRODUCCIÓN

Las funciones de los estrógenos en las hembras han sido ampliamente estudiadas y existe consenso respecto de los mecanismos y efectos de estas hormonas. Sin embargo, la función de estos compuestos en el aparato reproductor y la fertilidad de los machos no está claramente establecida y es objeto de variados e intensos estudios. La importancia de entender cómo funcionan los estrógenos está motivada, además, por la creciente evidencia de que sus funciones son de importancia en variados tejidos en ambos géneros y que el balance con los andrógenos juega un rol fundamental en el advenimiento de enfermedades letales, como afecciones cardiovasculares (Fowlkes y Sullivan, 1995), osteoporosis (Riggs y Melton, 1995) y cáncer de órganos reproductivos (Miller y Sharpe, 1998).

Se conoce que el 17- β -estradiol (E2), el estrógeno de mayor potencia biológica, se encuentra en altas concentraciones en el fluido testicular (Hess, 2000) y que los receptores estrogénicos alfa y beta (ER α y ER β) se encuentran vastamente distribuidos en el tracto reproductor del macho de varias especies (Couse y Korach, 1999) incluyendo a las ratas (Hess y col., 1997a). Diversos trabajos han reportado infertilidad en ratones carentes del gen funcional para el ER α (Eddy y col., 1996), de ambos receptores ER α y ER β (Couse y col., 1999) o para la enzima aromatasa (Fischer y col., 1998), indicando que la falta de estrógenos o de sus receptores perjudica el correcto funcionamiento del aparato reproductor del macho. Por otro lado, exposiciones excesivas a estrógenos también conllevan a anomalías en el tracto reproductor del macho (Toppari y col., 1996; Bennett y col., 1946). Utilizando modelos de ratas *knockout* para ER α (α ERKO), es decir, que no expresan el gen que codifica al ER α , se ha concluido que la principal función del estradiol es la de mantener la dinámica de los fluidos en los testículos (Hess y col., 1997b). Otros estudios corroboran este hecho utilizando antiestrógenos (ICI 182,72), capaces de ligar ambos receptores estrogénicos, en donde también se observó dilatación de los conductos del tracto reproductor (Oliveira y col., 2001; Oliveira y col., 2002), determinando un aumento en el peso del órgano y disfuncionalidad. Variadas alteraciones como criptorquidismo, hipospadia, quistes epididimales y anomalías espermáticas se han observado en hijos de madres expuestas a compuestos estrogénicos durante la preñez (Toppari y col., 1996). Efectos similares, además

de infertilidad, se han reportado en animales de laboratorio (Bennett y col., 1946).

Dentro de los compuestos estrogénicos conocidos, se encuentran los fitoestrógenos. Estos compuestos, presentes en la mayoría de los vegetales, alcanzan altas concentraciones en leguminosas forrajeras como la alfalfa (*Medicago sativa*) y el trébol rosado (*Trifolium pratense*), entre otras. Los fitoestrógenos pueden ser agrupados en tres familias: isoflavonas (daidzeína, genisteína, formononetina), lignanos (enterolactona, enterodiol) y cumestanos (cumestrol). Poseen gran similitud estructural y funcional con los estrógenos presentes en mamíferos, lo que les permite unirse a receptores estrogénicos con mayor o menor afinidad, dependiendo del tipo de fitoestrógenos que se trate. Por lo anterior, también pueden modular (atenuar o incrementar) las respuestas estrogénicas en mamíferos. Teniendo en cuenta esto, es que el uso de ciertas plantas en medicina tradicional y folclórica se atribuye a sus propiedades estrogénicas. Por ejemplo, la granada (*Púnica granatum*) ha sido asociada a la fertilidad, la parra tailandesa (*Pueraria mirífica*) es usada como rejuvenecedora y afrodisíaca y en la edad media, los clérigos alemanes creían que la cebada (*Hordeum vulgare*) disminuía la libido (Murkies y col., 1998). Sin embargo, no fue hasta la década de los 40, en que se reportó que estos compuestos podían ejercer algún efecto sobre los parámetros reproductivos en animales. Fue el caso de "la enfermedad del trébol" (Murkies y col., 1998) en ovejas, reportado en Australia occidental, en donde la ingesta de trébol rico en fitoestrógenos resultó en muertes debido a hipertrofia de las glándulas bulbo-uretrales en carneros castrados (con bajas concentraciones séricas de andrógenos), lo que no se observó en no castrados (con concentraciones séricas normales de andrógenos). Esto demostró - además de la importancia del balance andrógeno-estrógeno (Sharpe, 1998) - que los fitoestrógenos pueden llegar a ocasionar desórdenes reproductivos de importancia.

Resumiendo, el efecto benéfico o nocivo que pueden ejercer los compuestos estrogénicos en los parámetros reproductivos de mamíferos puede tener lugar en dos momentos: a) cuando el individuo se encuentra en un período de maduración o programación durante el desarrollo de sus receptores estrogénicos (impronta, del término inglés "*imprinting*") o b) posterior a la maduración o programación de los receptores

estrogénicos (ej: por alteración del balance andrógeno-estrógeno).

El concepto de programación del desarrollo por hormonas esteroidales ha sido motivo de estudio durante décadas por la comunidad científica, y puede ser mejor comprendido en el caso del cerebro, cuando los estrógenos y andrógenos inducen su feminización o masculinización en etapas tempranas de la vida (Gorski, 1985). Otros órganos, como el hígado, también son programados por esteroides tempranamente en el desarrollo, determinando cambios estructurales y funcionales importantes y necesarios para el dimorfismo sexual (Roy y Chatterjee, 1983). Adicionalmente a la programación fisiológica o impronta por esteroides, está bien establecido que el tracto reproductivo - así como también otras estructuras - puede ser reprogramado debido a una exposición anormal o involuntaria a esteroides durante estadios tempranos del desarrollo. En la década de los 50, el dietilestilbestrol (DES) - un potente agonista estrogénico- fue prescrito a mujeres gestantes para prevenir el aborto espontáneo. Sin embargo, su uso fue prohibido en todo el mundo en 1979, cuando se descubrió que el DES utilizado por las madres estaba estrechamente relacionado con la incidencia de adenocarcinoma vaginal en las hijas de madres que habían utilizado el fármaco (Herbst y col., 1971). Desde ese momento, la exposición intrauterina a DES ha resultado en una serie de malformaciones y complicaciones en las crías hembras y machos, incluyendo útero en forma de T, fibrosis uterina, hipospadias, subfertilidad e infertilidad, menopausia temprana, desórdenes inmunológicos, disturbios psicosexuales y un aumento en el riesgo de cáncer mamario y testicular (Edelman, 1986; Giusti y col., 1995; Strohsnitter y col., 2001; Palmer y col., 2006). A pesar de que algunos de estos efectos aparecen relativamente temprano, como el cáncer vaginal en mujeres jóvenes, otros emergen con la edad, sugiriendo que los niveles de estrógenos existentes en tempranos estadios del desarrollo de un individuo, dejan una memoria de por vida en las células y órganos. En algunas ocasiones, estas respuestas retardadas pueden ser gatilladas por eventos hormonales secundarios, como la llegada de la pubertad, el cambio de los niveles hormonales con la edad o una exposición voluntaria/involuntaria a compuestos esteroidales. Más aún, existen nuevas evidencias que apuntan a que los efectos del DES serían incluso transgeneracionales, transmitiéndose a las hijas de las hijas (tercera generación), lo que implica que

las secuelas pueden permanecer por mucho tiempo (Titus-Ernstoff y col., 2006; Newbold y col., 2006).

La impronta hormonal, concepto introducido por Csaba (1980), se define como el fenómeno biológico que ocurre cuando el receptor en maduración -entendido como el período en que el receptor logra su capacidad funcional y fisiológica- encuentra por primera vez a su hormona correspondiente. Este encuentro define el funcionamiento del sistema de transducción de señales a lo largo de la vida del individuo. Con base en observaciones experimentales, a fines de los años noventa, investigadores determinaron que este proceso tendría una base epigenética, al describir un cambio permanente en la metilación del gen de la lactoferrina uterina, como uno de los resultados de la exposición fetal a DES. Ellos propusieron que la reprogramación del desarrollo por exposiciones tempranas a compuestos estrogénicos (impronta estrogénica), pudiese estar mediada por una memoria epigenética alterada (Li y col., 2003; Crew y McLachlan, 2006). Otros estudios también han sostenido que serían mecanismos epigenéticos los que explicarían el fenómeno de impronta estrogénica, demostrando que la exposición a estrógenos a temprana edad alteran permanentemente la metilación del ADN y la expresión génica de ciertos genes en el útero y próstata (Li y col., 2003; Ho y col., 2006; Rakyan y Whitelaw, 2003), los cuales están asociados con una susceptibilidad alterada a presentar patologías en dichos órganos en la adultez. Por su parte, Tang y col. (2008) descubrieron que la genisteína era capaz de alterar los patrones de metilación del promotor del gen *Nsbp1*, que codifica para una proteína de unión nucleosomal que juega una función importante en la remodelación de la cromatina. Tomando en cuenta estas definiciones, se puede concluir que los fitoestrógenos son agentes que han demostrado capacidad de inducir impronta (Ren y col., 2001).

El objetivo principal que persigue esta memoria de título es dar a conocer algunos de los efectos que genera en la morfometría testicular y espermática, así como en el número y viabilidad de los espermatozoides, el fenómeno de impronta producido por la administración perinatal de dos fuentes de fitoestrógenos (genisteína y *Trifolium pratense* cepa "Pawera") a ratas nacidas de madres alimentadas con dieta libre de fitoestrógenos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

17 β -estradiol (1,3,5[10]-estratriene-3,17 β -diol), Genisteína(4',5,7- dihidroxi- isoflavona), Genistina (Genisteína-7-O- β -D-glucopiranosida), Daidzeína (4',7-Dihidroxiisoflavona), Daidzina (Daidzein 7-O- β -d glucopiranososa), Biochanina A (5,7-Dihidroxi-4'-metoxi isoflavona), Cumestrol (7,12-Dihidroxicumestano), Formononetina (7-Hidroxi-4'-metoxiisoflavona), Equol (3,4-Dihidro-3-(4-hidroxifenil)-2H-1-Benzopirano-7-ol), Apigenina (4',5,7-trihidroflavona), Kaempferol (Robigenina), y Silane (3-aminopropil-trimethoxysilanel) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Alemania). Bálsamo Canadá, éter dietílico, xileno, aceite de inmersión, etanol absoluto, parafina Histosec®, formalina, tampón fosfato, (2,6-dicloroquinona 4-cloroimido), acetato de etilo, éter de petróleo, eosina Y acuosa y hematoxilina de Harris, fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). Suero NaCl 0,9%, fue obtenido de Biosano (Santiago, Chile). La solución de Albúmina, agua destilada, buffer fosfato salino (PBS), solución de Bouin y solución de Carnoy fueron elaborados en el Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

2.2 Animales

El desarrollo de este estudio se enmarca dentro del proyecto Anillo de Investigación ACT07 y fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Ratas hembra *Sprague-Dawley* de 3 meses de edad, 250 \pm 10g de peso, nunca antes apareadas, fueron seleccionadas al azar desde la sala de crianza N° 6 del bioterio del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en número suficiente para completar un total de 54 ratas macho, provenientes de camadas de primer parto, de los cuales se obtuvieron las muestras para el estudio. Las ratas fueron mantenidas bajo un régimen de 12-12 horas luz-oscuridad, con temperatura y humedad controlada, con alimento y agua *ad libitum*. Al menos una semana antes del apareamiento, la dieta de las ratas seleccionadas fue sustituida por una dieta libre de fitoestrógenos (DLF) (2020X. Harlan Diets, Indianapolis, EEUU. Concentración máx. 20 ppm genisteína y/o daidzeína), diseñada para dar soporte a las fases de gestación, lactancia y crecimiento de roedores. Se dejó transcurrir este

tiempo para asegurar la eliminación de fitoestrógenos dietarios adquiridos anteriormente. Las ratas madres y la totalidad de las camadas fueron mantenidas con DLF a lo largo de todo el estudio. El ciclo estral de las ratas madres fue monitoreado a diario mediante citología vaginal. En el día del proestro, las ratas fueron puestas en jaulas de apareamiento durante toda la noche con machos de fertilidad probada del propio bioterio. La cópula fue confirmada por la presencia de espermatozoides y patrón celular de estro en la citología vaginal. El día en que se confirmó la cópula, se determinó como día cero de gestación. La gestación fue reconfirmada 10 días después mediante palpación trans-abdominal. Las ratas cursaron su gestación completa y hasta los 21 días de vida de la camada en la sala de maternidad N°5 del mismo bioterio. Para el estudio, las ratas fueron separadas en 3 grupos.

2.3 Tratamientos

Las fuentes de fitoestrógenos usadas en este estudio fueron genisteína y un extracto etanólico, denominado 1403a, obtenido a partir de trébol rosado (*Trifolium pratense*), cultivar "Pawera", cosechado en enero de 2009, provisto por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA (INIA Carillanca, Temuco, Chile). El extracto 1403a es un extracto completo, es decir, contiene todos los compuestos polares presentes en la planta y solubles en etanol, entre ellos los fitoestrógenos agliconas (Murkies y *col.*, 1998). El extracto se obtuvo a partir de 467 g de sumidades floridas de la planta, las que fueron extraídas con 934 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente (25°C), por 15 días; luego se procedió a filtrar en papel Whatman grado 1 (poro de 11 μ m de diámetro), para obtener el extracto 1403a el cual fue mantenido a 4°C. Los animales fueron asignados a uno de los siguientes grupos: control [impronta con suero fisiológico (**IS**)], cuyas madres fueron expuestas a vehículo (dilución vol. /vol. al 10% de etanol en NaCl 0.9%); extracto [impronta con extracto (**IX**)], cuyas madres fueron expuestas al extracto 1403a (diluido en NaCl 0.9%); genisteína [impronta con genisteína (**IG**)], cuyas madres fueron expuestas a 3mg/kg genisteína. Todos los tratamientos se realizaron mediante inyección subcutánea de 0,3 mL en cada caso, los días 15 y 18 de gestación. Obtenida la camada (F1), a partir de las madres tratadas, los tres grupos IS, IX e IG quedaron conformados por 18 ratas macho. A los 60 días de vida, al alcanzar pesos de 275 \pm 25g, la mitad de los machos F1 de cada uno de los grupos IS, IX e IG recibieron una

dosis única de 100 µg/Kg p.v. de E2, vía subcutánea quedando los grupos rotulados como **ISE, IXE e IGE** (tratados con E2). En ese mismo día, el resto de las ratas F1, recibieron sólo vehículo por la misma vía, quedando rotulados como grupos **ISC, IXC e IGC** (tratados con vehículo).

2.4 Obtención de las muestras

Luego de 72 horas de administrado el tratamiento, todos los machos F1 que recibieron **E2** (n=27, 9 ratas por grupo) o vehículo **C** (n=27, 9 ratas por grupo) fueron anestesiados con isoflurano para la obtención quirúrgica de los testículos y caudas epididimarias. Todas las ratas fueron eutanasiadas con sobredosis del anestésico una vez obtenidas las muestras de tejido. Los testículos extraídos se sometieron a fijación en solución de Bouin durante tres días. Antes de comenzar el proceso de fijación, los polos de cada testículo se puncionaron con una aguja hipodérmica de 24G y posterior a esto, se sumergieron en frasco con solución de Bouin. A las 24 horas de la inmersión, se seccionaron ambos polos con hoja de bisturí y a las 48 horas se volvieron a seccionar por la mitad, con el objetivo de permitir una mejor penetración de la solución de fijado.

Al momento de la extracción de tejidos, se obtuvieron ambas caudas epididimarias. Cada cauda se trozó con dos hoja de bisturí sobre una placa de Petri conteniendo 5 mL de PBS en concentración de 0.1 M a pH 7.4; luego el tejido trozado se dejó en reposo por 1 hora a 4° C. El contenido de cada placa de Petri (una placa de Petri por cauda epididimaria, es decir, dos por cada rata) se filtró con gasa triple para eliminar los restos de tejidos y se procedió a depositar el filtrado en dos frascos limpios: A y B. Del frasco A, se tomaron 20 µL para hacer el conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer y otros 20 µL para realizar un extendido en porta-objeto, el que se tiñó con hematoxilina-eosina una vez que se secó a temperatura ambiente. El contenido del frasco B, se calentó a 94 °C en vaporera (Oster, 5711-052, China) durante 6 minutos; se obtuvieron 100 µL que se mezclaron con otros 100 µL de solución de Carnoy en tubo Eppendorf® de 1.5 mL, quedando 200 µL de una solución de espermatozoides-Carnoy que se almacenó en caja oscura a 4°C durante la noche. Transcurridas 24 horas, el tubo Eppendorf® se sometió a centrifugación a 1100 g durante 5 minutos, se sacaron 100 µL del centrifugado y se repusieron con 100 µL de PBS y se volvió a

centrifugar a 1100 g durante 5 minutos. Luego se tomó una gota del *pellet* formado y se depositó en placas (portaobjeto), se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Pasado este tiempo, las placas se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta el momento de la tinción con anaranjado de acridina (A.O.). A cada una de las placas, en posición horizontal, se les adicionó 2 a 3 gotas de solución de tinción con fluorocromo A.O. (a una concentración de 0.19 mg/mL y pH de 2.5) por un tiempo de 3 a 5 minutos en oscuridad, a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con agua destilada para retirar el exceso de fluorocromo; se montaron con agua destilada y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su lectura en microscopio de epifluorescencia (Nikon® EFD 3), calibrado a un 100% de emisión de fluorescencia a 524 nm. Se evaluaron 300 cabezas de espermatozoides por placa, mostrando fluorescencia verde o roja (con ADN viable y no viable, respectivamente), tanto en los grupos experimentales como en los grupos control.

Una vez transcurrido el tiempo de fijado de los testículos, éstos se seccionaron en 3 partes iguales. Las secciones fueron deshidratadas en una batería de gradiente de alcoholes (75%, 95% y 100%), y luego sumergidas en líquido intermediario (xilol). La impregnación se realizó en una batería de 3 parafinas líquidas a 60° C durante 20 minutos cada una. Posteriormente, las muestras se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 µm con micrótopo (*Leica* RM2125, EEUU). Los cortes histológicos fueron sometidos a baño de flotación (40°C), para posteriormente ser adheridos a portaobjetos previamente tratados con albúmina y secados en estufa (*Precision Scientific CO.* 4-C-11, EEUU) a 37°C. La coloración se realizó con hematoxilina- eosina.

2.5 Análisis Morfológico de espermatozoides

Los extendidos de espermatozoides se observaron teñidos con hematoxilina-eosina en portaobjeto al microscopio óptico (Microscopio óptico *Leica* CME binocular 1000 x, EEUU) con lente 40x y oculares 10x. Se analizó la morfología de la cabeza y cola según metodología utilizada por Glover y Assinder (2006). Los resultados se expresaron según presencia o no de anomalías morfológicas tanto en la cabeza como en la cola del espermatozoide. Se analizaron 200 espermatozoides de cada rata, se anotó el porcentaje de anomalías de cada rata y se promediaron los resultados para obtener una media para cada grupo experimental.

2.6 Cuento en cámara de Neubauer

El número de espermatozoides promedio por grupo experimental se determinó según la metodología empleada por Taylor (1985). Brevemente, los espermatozoides de 7 cámaras del hemocitómetro fueron contados; los valores extremos fueron eliminados, obteniéndose un promedio de 5 valores.

2.7 Prueba de Anaranjado de Acridina

La evaluación de la fluorescencia (rojo cuando el cromóforo se une a ADN desnaturalizado o en estado de hebra simple; verde cuando se une a ADN de doble hebra o normal) se realizó según la metodología empleada por Kosower y col. (1992). Brevemente, se evaluaron 300 cabezas de espermatozoides previamente teñidos (Tejada y col., 1984) por cada rata. Los resultados se expresaron como porcentaje de cada color respecto del total.

2.8 Análisis de la Morfometría Testicular

Los túbulos seminíferos analizados pertenecían al mismo estadio de la espermatogénesis, presentándose espermátidas elongadas distinguibles en todos ellos. Se utilizó el software Motic Image Plus® 2.0 para obtener las imágenes microscópicas de las secciones de túbulos seminíferos. Las mediciones morfométricas se hicieron con el software ImageJ®, con una sensibilidad de 0,01 μm . Una vez obtenidos los valores en μm para el perímetro basal, perímetro luminal y alto del epitelio seminífero (PB, PL y AE, respectivamente) (Foto 1), se obtuvieron los promedios para cada grupo experimental. Se midió un total de 20 perímetros (basal y luminal) y 20 altos de epitelio por cada animal de experimentación.

2.9 Análisis Cualitativo del Extracto 1403a

El análisis cualitativo se realizó mediante cromatografía en placa fina utilizando una mezcla de solventes (acetato de etilo: éter de petróleo), en proporciones variables que permitieron la mejor separación de los estándares y de los compuestos contenidos en el extracto. Para detectar la presencia de fitoestrógenos se empleó el reactivo 2,6-dicloroquinona 4-cloroimido preparado en AlCl_3 , el cual genera un complejo coloreado con hidrocarburos aromáticos que fueron visualizados a 254 nm.

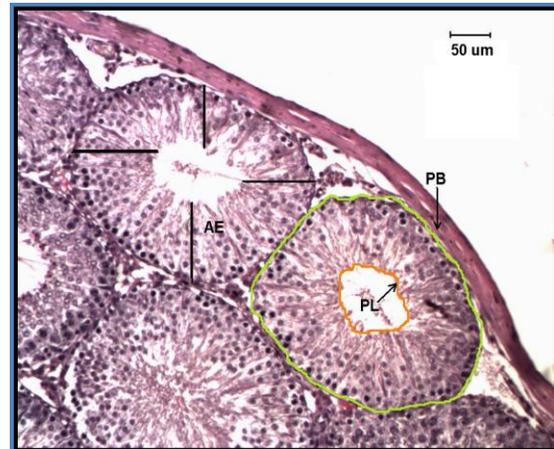


Foto 1. Sección histológica de un testículo de rata del grupo ISC (improntado con suero fisiológico y sin tratamiento con E2). PB: Perímetro basal; PL: Perímetro luminal; AE: Alto epitelio seminífero (se midieron cuatro altos por túbulo y se obtuvo un promedio, como muestran las líneas negras).

2.10 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados mediante ANDEVA (Análisis de Varianza). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. Para el análisis de los datos y nivel de significancia estadística, se usó el test de la Mínima Diferencia Significativa a posteriori (LSD a.p.).

3. RESULTADOS

3.1 Morfología de espermatozoides

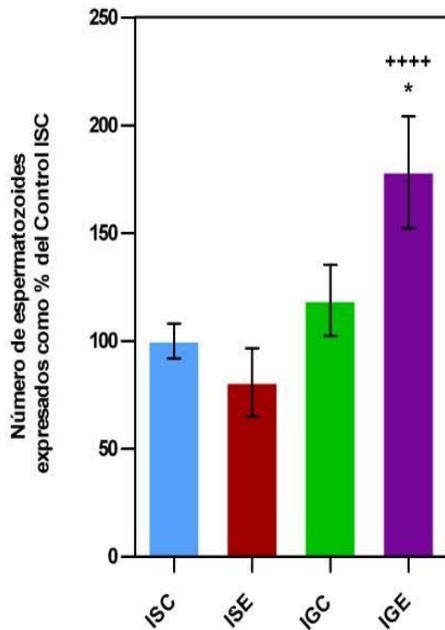
En ninguno de los grupos experimentales se observó alteraciones en la morfología espermática a nivel de cabeza y/o cola.

3.2 Número de espermatozoides

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y entre éstos y sus controles. El mayor número de espermatozoides se observó en el grupo que recibió la impronta con genisteína y fue tratado con E2. En la Figura 1, se muestra el efecto del E2 sobre el número de espermatozoides en los grupos improntados con genisteína. La diferencia más significativa se observó al comparar el grupo improntado con genisteína, versus el grupo improntado con vehículo y tratado con E2, en que

se verificó un aumento de casi un 80% en el número de espermatozoides en aquellas ratas que recibieron genisteína perinatalmente.

Figura 1. Efecto del 17-β-Estradiol (administrado en el día 60), sobre el número de espermatozoides en ratas de 63 días de edad improntadas con genisteína.

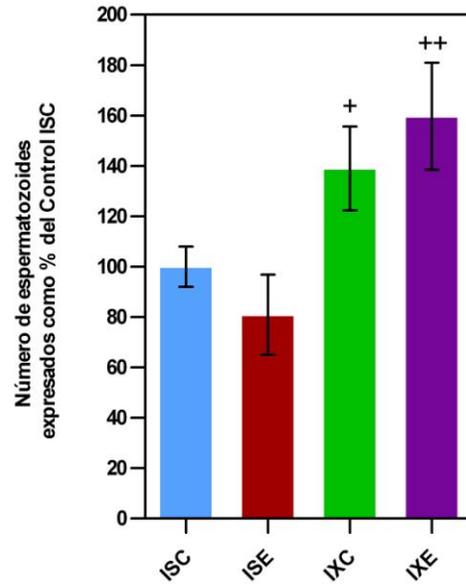


ISC: Improntado con suero fisiológico sin exposición a E2. ISE: Improntado con suero fisiológico y expuesto a E2. IGC: Improntado con genisteína sin exposición a E2. IGE: Improntado con genisteína y expuesto a E2. (*): $p \leq 0,05$ entre IGE e IGC. (++++): $p \leq 0,0001$ entre IGE e ISE.

En la Figura 2, se muestra el efecto del E2 en el grupo improntado con extracto 1403a. En este caso se observó un aumento significativo del número de espermatozoides, aunque dicho aumento fue de menor magnitud que el observado en el grupo improntado con genisteína. También se observó un aumento significativo en el número de espermatozoides en ambos grupos, tratados y no tratados con E2, improntados con el extracto 1403a.

En el grupo control (improntado con vehículo y tratado con E2), no se observó un aumento significativo en el número de espermatozoides.

Figura 2. Efecto del 17-β-Estradiol (administrado en el día 60), sobre el número de espermatozoides en ratas de 63 días de edad improntadas con extracto 1403a.



ISC: Improntado con suero fisiológico sin exposición a E2. ISE: Improntado con suero fisiológico y expuesto a E2. IXC: Improntado con extracto sin exposición a E2. IXE: Improntado con extracto y expuesto a E2. (+): $p \leq 0,05$ entre IXC e ISC. (++): $p \leq 0,01$ entre IXE e ISE.

Tabla 1. Efecto del 17-β-Estradiol, sobre el número de espermatozoides en ratas de 63 días de edad improntadas con genisteína o extracto 1403a.

Grupo experimental (N: 9 ratas por grupo)	Número de espermatozoides (Prom. ± D.E.)
ISC	956 ^c ± 231
ISE	774 ^{a,b} ± 455
IGC	1136 ^d ± 474
IGE	1704 ^{a,d} ± 742
IXC	1329 ^c ± 478
IXE	1526 ^b ± 608

Abreviaciones: Las mismas usadas en figuras 1 y 2. a, b, c y d: Diferencias significativas siendo a: $p \leq 0,0001$, b: $p \leq 0,01$, c y d: $p \leq 0,05$.

En la tabla 1 se resume y compara el efecto del E2 sobre el número de espermatozoides en ratas que

fueron improntadas con las dos fuentes de fitoestrógenos contempladas en este estudio (genisteína y extracto 1403a).

No se observaron diferencias significativas en el número de espermatozoides en las ratas improntadas con vehículo y luego tratadas y no tratadas con E2.

Luego de la impronta con genisteína y tratamiento con E2, el número de espermatozoides aumentó significativamente ($p \leq 0,05$). Al comparar el grupo improntado con vehículo contra el grupo improntado con genisteína (ambos tratados con E2), se observa que el número de espermatozoides aumentó significativamente debido a la impronta con genisteína ($p \leq 0,0001$).

Al improntar con extracto 1403a y posteriormente tratar con E2, no se produjo un aumento significativo del número de espermatozoides, a diferencia de lo que ocurrió al improntar con genisteína. Interesantemente, al comparar el efecto de la impronta con extracto versus vehículo (ambos tratados con E2), el número de espermatozoides aumentó significativamente ($p \leq 0,01$) en el grupo IXE. Este aumento también se pudo observar en los tratados con vehículo (ISC vs IXC) ($p \leq 0,05$).

3.3 Prueba de Anaranjado de Acridina

Utilizando la prueba de A.O. y microscopía de fluorescencia, no se observaron anomalías a nivel de ADN en ninguno de los grupos estudiados. Se observó emisión de fluorescencia roja, sólo después de observar algunas placas que estuvieron almacenadas en frío (4°C) durante algunas semanas o meses.

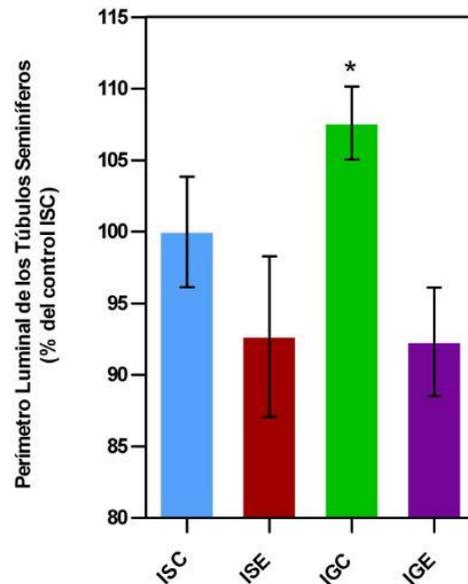
3.4 Morfometría del túbulo seminífero

Se detectaron algunas diferencias significativas al comparar las dimensiones del PB, PL y AE del túbulo seminífero, obtenidas en los diferentes grupos experimentales.

A nivel de perímetro basal, no se detectaron diferencias significativas a consecuencia de la impronta con las dos fuentes de Fitoestrógeno empleadas en los grupos tratados y no tratados con E2.

En la figura 3, se muestra el efecto del E2 sobre el perímetro luminal de los túbulos seminíferos, en ratas que fueron improntadas con genisteína.

Figura 3. Efecto del 17- β -Estradiol (administrado en el día 60), sobre el perímetro luminal en ratas de 63 días de edad improntadas con genisteína.



Abreviaciones: Las mismas usadas en figuras 1 y 2. (*): Diferencias estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre IGE e IGC.

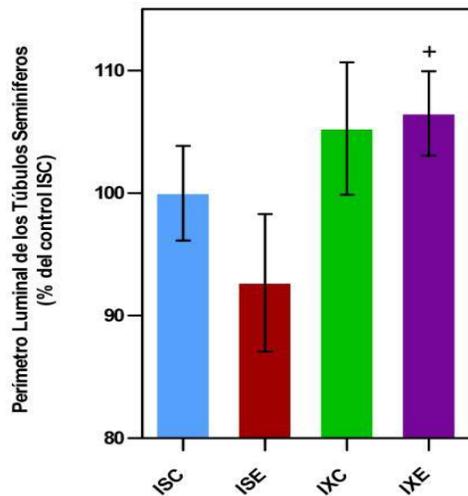
Se observó un aumento significativo en el perímetro luminal de los túbulos seminíferos en los grupos improntados con genisteína. Al compararlos según tratamiento con vehículo o E2, el perímetro luminal fue un ~15% más amplio en el primero ($p \leq 0,05$).

En la figura 4, se muestra el efecto del E2 sobre el perímetro luminal de los túbulos seminíferos, en ratas improntadas con extracto 1403a. En este caso no hubo diferencias entre los grupos improntados con extracto, independiente del tratamiento con E2. Sin embargo, se observó un aumento significativo de un ~15% tras la administración de E2, entre el grupo improntado con vehículo versus el grupo improntado con extracto 1403a ($p \leq 0,05$).

En la figura 5, se muestra el efecto del E2 sobre el alto del epitelio seminífero de los túbulos seminíferos, en ratas que fueron improntadas con genisteína. En cuanto a los controles respectivos, la impronta con genisteína disminuyó el alto del epitelio seminífero. Al comparar el efecto de la impronta con genisteína sin tratamiento con E2 (IGC), versus su control (ISC), se observó que la altura del epitelio disminuyó un ~8% ($p \leq 0,05$). Un

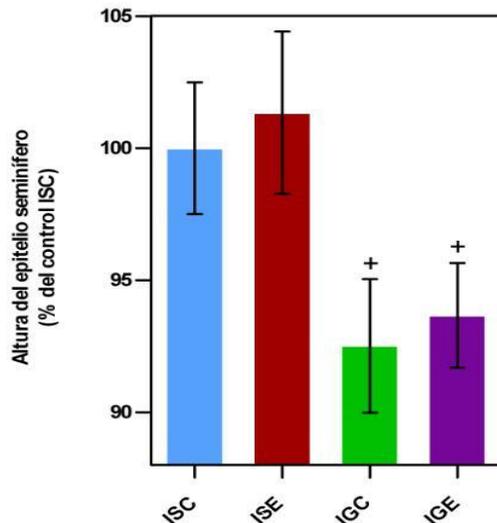
efecto similar en magnitud ocurrió al comparar ISE vs IGE, donde se observó una disminución de un ~7% ($p \leq 0,05$).

Figura 4. Efecto del 17- β -Estradiol (administrado en el día 60), sobre el perímetro luminal en ratas de 63 días de edad improntadas con extracto 1403a.



Abreviaciones: Las mismas usadas en figuras 1 y 2.
(+): Diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre IXE e ISE.

Figura 5. Efecto del E2 sobre la altura del epitelio seminífero, en ratas improntadas con genisteína.

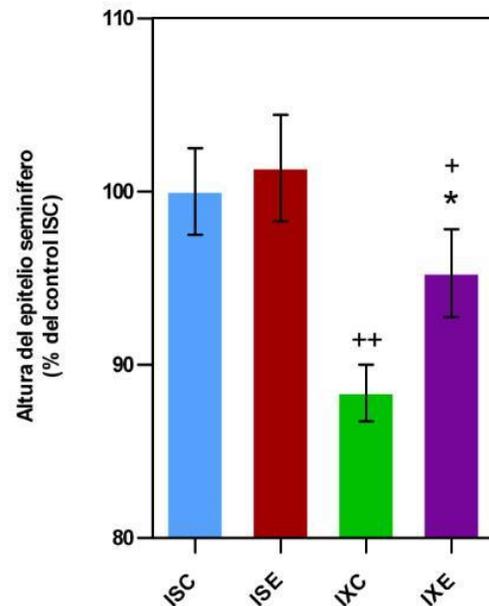


Abreviaciones: Las mismas usadas en figuras 1 y 2.
(+): Diferencias estadísticamente significativas entre IGE e ISE, e IGC e ISC ($p \leq 0,05$).

En la figura 6, se muestra el efecto del E2 sobre el alto del epitelio de los túbulos seminíferos, en

ratas que fueron improntadas con extracto. Tras la impronta con extracto y la administración de E2 (IXE), se observó un aumento en la altura del epitelio de un ~7% ($p \leq 0,05$) al compararlo con IXC. La mayor diferencia en la altura del epitelio se registró en el grupo improntado con extracto y sin tratar con E2 (IXC), en que se observó una disminución del alto del epitelio de un ~12% ($p \leq 0,01$) al compararlo con su control (ISC). Por otra parte, tras la administración de E2, en el grupo improntado con extracto (IXE), se observó una disminución de un ~7% ($p \leq 0,05$) en comparación a su control (ISE).

Figura 6. Efecto del E2 sobre altura del epitelio seminífero, en ratas improntadas con extracto 1403a.



Abreviaciones: Las mismas usadas en figuras 1 y 2.
(*): Diferencias estadísticamente significativas entre IXE e IXC ($p \leq 0,05$). (+) Diferencias estadísticamente significativas entre IXE e ISE ($p \leq 0,05$).
(++): Diferencias estadísticamente significativas entre IXC e ISC ($p \leq 0,01$).

En la tabla 2 se resume y compara el efecto del E2 sobre los parámetros morfométricos de PB, PL, y AE de los túbulos seminíferos en ratas que fueron improntadas con las dos fuentes de fitoestrógenos consideradas en el presente trabajo (genisteína y extracto 1403a).

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros (PL, PB y AE) en las ratas improntadas con vehículo y luego tratadas y no tratadas con E2.

Luego de la impronta con genisteína y tratamiento con E2, el PL disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) (IGE vs IGC). Al comparar el grupo improntado con vehículo contra el grupo improntado con genisteína (ambos tratados con E2), se observó que el alto del epitelio también disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$).

Tabla 2. Morfometría de túbulos seminíferos de ratas tratadas con Estradiol y que fueron improntadas con genisteína o con extracto 1403a.

Grupo	PB (μm) (Promedio)	PL (μm) (Promedio)	AE (μm) (Promedio)
ISC	847,8	332,39	77,66 ^{d,f}
D.E	$\pm 31,98$	$\pm 38,49$	$\pm 5,81$
ISE	823,84	308,08 ^b	78,70 ^{c,e}
D.E.	$\pm 74,85$	$\pm 55,90$	$\pm 7,15$
IGC	836,68	357,62 ^a	71,85 ^d
D.E.	$\pm 47,41$	$\pm 25,38$	$\pm 5,89$
IGE	793,15	306,83 ^a	72,74 ^c
D.E.	$\pm 64,44$	$\pm 37,82$	$\pm 4,62$
IXC	822,46	349,9	68,63 ^{f,g}
D.E.	$\pm 74,79$	$\pm 53,96$	$\pm 3,81$
IXE	857,77	354,01 ^b	74,00 ^{e,g}
D.E.	$\pm 69,73$	$\pm 34,42$	$\pm 5,88$

Las abreviaciones son las mismas utilizadas en la Figura 1 y 2. D.E: Desviación estándar. (a, b, c, d, e, f, y g): Diferencias estadísticamente significativas siendo (a, b, c, d, e, y f): $p \leq 0,05$ y g: $p \leq 0,01$.

3.5 Análisis Cualitativo del Extracto 1403a

En el análisis cualitativo realizado se observó que los controles daidzeína, formononetina y biochanina A presentaron Rf de 2,6; 6,3 y 8,1 respectivamente. En el extracto 1403a se evidenciaron grupos reactivos con Rf de 2,6; 6,2 y 8,2 los cuales son compatibles con la presencia de los fitoestrógenos señalados. Este análisis permitió, además, descartar la presencia de cumestrol y genisteína ya que, en las condiciones empleadas, presentaron Rf de 5,1 y 5,6 respectivamente.

4. DISCUSIÓN

El fenómeno de impronta (Barlow, 2011) con estrógenos o compuestos similares a ellos está bien documentado (Prins, 2008). La

administración diaria de vinclozolina, un compuesto antiandrogénico, o methoxichlor, un compuesto estrogénico, durante el período de maduración gonadal embrionaria en hembras gestantes (entre el día 12 y 15 de gestación), indujo un fenotipo adulto en la generación F1 con una capacidad espermática disminuida (viabilidad y número de células) y un aumento en la incidencia de infertilidad (Anway y col., 2005). Sin embargo, en un estudio en que la exposición diaria fue entre los días 15 y 20 de gestación, no se indujo alteración alguna en los testículos de la generación F1 (Cupp y col., 2003; Uzumcu y col., 2004).

En el presente estudio, en que la administración de genisteína o un extracto que contiene fitoestrógenos se realizó en el día 15 y 18 de gestación, ambos estímulos fueron capaces de inducir un fenotipo espermático adulto en F1 distinto (mayor número de células pero similar viabilidad) que el observado en ratas F1 que fueron improntadas con vehículo. Las diferencias observadas entre los dos estudios citados y los resultados de esta memoria, pueden explicarse aduciendo a las diferentes condiciones experimentales empleadas, como por ejemplo, el tipo de compuesto utilizado para improntar. Además, en este trabajo, la impronta se realizó en animales que habían sido privados de fitoestrógenos dietarios, a objeto de evitar las influencias de estos compuestos – habitualmente presentes en dietas de animales de laboratorio – sobre la impronta que se buscaba analizar.

En las células del epitelio seminífero de la rata, principales responsables de la espermatogénesis y del aporte estrogénico al túbulo seminífero (Hess y col., 1997b), predomina el RE β (O'Donnell y col., 2001), por el cual la genisteína posee mayor afinidad comparado con el RE α (Kuiper y col., 1998). El testículo fetal contiene receptores esteroidales y es blanco de una serie de agentes endocrinos. Los receptores androgénicos (RA) y RE β están presentes en las células de Sertoli, peritubulares mioides y germinales durante el período de determinación del sexo gonadal (Majdic y col., 1995; Goyal y col., 1997). A pesar de que no se producen esteroides en el testículo en este estadio embrionario, sustancias estrogénicas y androgénicas tienen la capacidad de influenciar funciones testiculares tempranas. Debido a esto, factores esteroidales, actuando de manera inapropiada durante este período, tendrían la potencialidad de reprogramar la línea germinal a través de un mecanismo epigenético (alteración de

la metilación del ADN) que altera el fenotipo o bien el perfil genético de la siguiente generación (Anway y col., 2005). Los resultados de este estudio se conciben con los postulados por estos autores, en que el fenotipo observado en las ratas expuestas a dos fuentes distintas de fitoestrógenos fue diferente al observado en ausencia de la impronta.

Si bien son conocidas algunas de las funciones del E2 en el testículo (Hess y col., 1997b; O'Donnell y col., 2001), los efectos de una inyección exógena de E2 sobre los parámetros morfométricos analizados en este estudio, hasta donde se pudo investigar, no han sido reportados. Se sabe que la concentración de E2 en el fluido de la rete testis de la rata es de 250 pg/mL (Free y Jaffe, 1979), concentración ampliamente superior a la presente en sangre de machos y hembras. Por este motivo se considera que el aporte endocrino del E2 plasmático al testículo es poco relevante (Hess 2003). Sin embargo, utilizando un modelo de ratas *knockout* para aromatasasa (ArKO) - enzima responsable de la síntesis de estrógenos - los animales no presentaron anomalías testiculares hasta antes de la pubertad; pero comenzada la espermatogénesis, se observó una disminución del peso testicular, del epitelio seminífero y del número de células germinales (Robertson y col., 1999). Cuando estas ratas ArKO fueron mantenidas en una dieta libre de soya (baja en fitoestrógenos), los efectos se aceleraron y aparecieron más tempranamente (O'Donnell 2001), sugiriendo que bajas concentraciones de estrógenos pueden generar algún efecto protector sobre el testículo, independiente de FSH o LH. Estos resultados también sugieren que los estrógenos plasmáticos pueden ejercer un efecto relevante en las células testiculares, y, por lo tanto, la administración de E2 utilizada podría ser responsable de algunos de los resultados presentados en este trabajo.

De acuerdo a las condiciones empleadas en el estudio, la administración exógena de E2 (100 µg/Kg p.v.) no mostró un efecto proliferativo sobre las células espermáticas (grupo control ISE). Además, al observar los parámetros que definen la morfometría de los túbulos seminíferos, el E2 tampoco modificó el alto del epitelio, el tamaño del lumen del túbulo, ni el túbulo en su conjunto. Con un enfoque experimental similar al usado en esta memoria y con las mismas dosis de E2 pero a nivel de útero de rata pre-púber, se reportó un aumento de la hipertrofia sin cambios significativos en el número de mitosis de las

células del miometrio circular (Villanueva, 2010). Estas discrepancias indican que la acción del E2 sobre el aparato reproductor está claramente condicionada por el género.

Los animales del grupo improntado con genisteína y sometidos a E2 al día 60 (IGE) de vida, presentaron una cantidad significativamente mayor de espermatozoides en sus caudas epididimarias que los individuos del grupo improntado con genisteína y que no recibieron E2 al día 60 (IGC). Estos datos nos permiten decir que el efecto del E2 en ratas improntadas con genisteína, y que no tienen contacto con fitoestrógenos dietarios en su vida, se traduce en un aumento en el número de espermatozoides pesquisables 3 días posteriores a la administración. Otra explicación es que la ausencia de genisteína durante el último tercio de gestación en el ambiente uterino del feto, provocaría un cambio en la respuesta al E2 en el día 60 post nacimiento, observándose una disminución en el número de espermatozoides presentes en la cauda del epidídimo. Este suceso da cuenta de que la diferencia significativa en el número de espermatozoides se debe a un efecto conjunto entre la impronta con genisteína y E2 exógeno, ya que ambos por separado no demostraron alterar el número de espermatozoides, dejando así de manifiesto el efecto "programador" o "improntador" que es capaz de ejercer la genisteína.

Por otro lado, al observar los resultados de la impronta con extracto 1403a, se pudo apreciar una diferencia en el tipo de respuesta. Al igual que los animales del grupo improntado con genisteína y tratados con E2 al día 60, en los animales improntados con extracto se observó un aumento significativo en el número de espermatozoides. A diferencia de lo que ocurrió en los animales improntados con genisteína y tratados con vehículo en el día 60, en los cuales no se apreció un aumento significativo en el conteo espermático, en los individuos improntados con extracto y tratados con vehículo en el día 60, se evidenció un incremento significativo en el número de espermatozoides. Estos resultados implican que el responsable exclusivo de la diferencia en el número de espermatozoides es el fenómeno de impronta con extracto 1403a, y no el tratamiento con E2 en sinergia con la impronta señalada. Probablemente, el aumento en el número de espermatozoides en los animales improntados con extracto se deba a la interacción entre la impronta generada por los fitoestrógenos

presentes en el extracto (formononetina, biochanina A, y daidzeína, entre otros) y el efecto de los estrógenos propios, sintetizados por la rata hasta los 60 días, ya que a pesar de que se produce un incremento de alrededor del 20% en el conteo espermático a causa de la administración exógena de E2 (Figura 2), esta respuesta no resultó ser significativa, como ocurrió en las ratas improntadas con genisteína. Bajo este supuesto, sería esperable que el número de espermatozoides en las ratas improntadas con genisteína, y que no recibieron E2 exógeno a los 60 días (IGC) presentaran un aumento significativo en el número de espermatozoides debido al efecto del E2 endógeno, sin embargo, esto no ocurrió. Posiblemente, este hecho tiene su explicación en la diferente naturaleza de la impronta desarrollada. Si bien, ambas improntas se basan en fitoestrógenos, las diferentes concentraciones, potencias estrogénicas, y receptores objetivos de cada uno (Adlercreutz 1990; Markiewicz 1993), podrían influir en el tipo de programación del desarrollo o cambio epigenético.

A la luz de estos resultados, los fitoestrógenos inducirían distintos tipos de impronta que se reflejaría en la vida adulta de la rata macho, provocando distintas respuestas al E2 tanto exógeno como endógeno.

Como ya se mencionó, una de las funciones bien estudiadas del E2 es su capacidad de mantener un adecuado balance – a través de la regulación en la expresión de diversas proteínas - del volumen del fluido en el tracto reproductor del macho (Hess, 2003). La dilatación o incremento en el perímetro del lumen del túbulo seminífero se asocia a una incapacidad del E2 de ejercer su efecto sobre la absorción de fluido. Estudios en ratones ERKO, han demostrado que la habilidad normal de los conductos eferentes de absorber el ~85% del fluido que rodea a los espermatozoides está ausente en machos sin receptores estrogénicos (Hess 1997b). Este evento probablemente tiene que ver con la gradual distensión de la rete testis, conductos eferentes y lumen de los túbulos seminíferos en machos ERKO a la llegada de la pubertad. Otro estudio concluyó que la exposición neonatal de ratas a DES provoca una distensión permanente de la rete testis y conductos eferentes así como una expresión alterada de la proteína-canal acuaporina-1, desde la vida neonatal hasta la adultez (Fischer, 1998). Estos cambios son similares a los encontrados en ratones ERKO, en los cuales la acción estrogénica está presumiblemente reducida. Ambos estudios

mostraron que el tamaño de las células epiteliales en los conductos eferentes se encontraba reducido permanentemente, con pérdida de la porción apical, la cual contiene al aparato endocítico necesario para la función absorptiva. Este hecho podría estar implicando que la acción estrogénica en los conductos eferentes durante la vida perinatal es esencial para el desarrollo del aparato endocítico en las células epiteliales, y que una acción estrogénica muy alta (tratamiento con DES) o muy baja (ratones ERKO) interferirá con su normal desarrollo.

Los resultados evidenciaron que el perímetro del túbulo seminífero, o perímetro basal, no sufrió modificaciones tras la administración de E2, independiente de la fuente de fitoestrógeno con la que fueron improntados. Resultados similares obtuvieron Assinder y colaboradores (2007). Ratas macho, nacidas de madres alimentadas con dieta baja en fitoestrógenos durante la gestación, se mantuvieron con una dieta baja en fitoestrógenos hasta la adultez. Cuando se sometieron a una dieta alta en fitoestrógenos por 24 horas, los lúmenes de los túbulos seminíferos se dilataron notablemente, y no así el perímetro basal, efecto que se corroboró independiente del eje hipotálamo-hipófisis-testicular, y cuya explicación se atribuyó a una alteración de la función estrogénica en el testículo (Assinder y *col.*, 2007). Además, similarmente a lo ocurrido en este estudio, la impronta con fitoestrógenos inducida por estos autores durante la etapa prenatal, no provocó cambios en el perímetro o diámetro de los túbulos seminíferos y sí en el lumen, en donde ya se ha dicho que la función estrogénica es determinante.

Para el caso del perímetro luminal, el E2 no tuvo efecto alguno en modificar este parámetro cuando los animales estaban improntados con vehículo. Sin embargo, cuando recibieron genisteína perinatalmente y vehículo al día 60, se pudo pesquisar un aumento significativo en el ancho del lumen. De manera controversial, cuando estos animales recibieron E2 en el día 60, dicho aumento no apareció. Aunque no he encontrado una explicación clara para este hecho, siempre existe la posibilidad de atribuir la falta de efecto estrogénico a la variabilidad de la metodología empleada, a juzgar por la desviación estándar obtenida en algunas determinaciones (Tabla 2).

En los dos grupos improntados con extracto y que recibieron E2 o vehículo, se observó un aumento en el tamaño del lumen, pero sólo en el grupo que

recibió E2 se alcanzó significación estadística. Como ya se dijo, el E2 es determinante en un adecuado control del fluido del tracto reproductor del macho (Hess, 2003), y es probable que la impronta inducida por los fitoestrógenos presentes en el extracto hayan provocado una alteración en la respuesta del túbulo al E2 administrado. Los lúmenes dilatados son clásicos en modelos de ratas α ERKO o tratadas con antiestrógenos, y la explicación se basa en la inhibición de la reabsorción de fluidos por la falta de E2 o la alteración de su función (Hess, 2003). Por lo anterior, no descartamos que el efecto de la impronta prenatal con fitoestrógenos, como los presentes en el extracto 1403a o la genisteína, pueda generar cambios de este tipo. Esta conclusión queda mejor amparada por los resultados observados al analizar la altura del epitelio seminífero.

La altura del epitelio seminífero en las ratas improntadas con vehículo no presentó diferencias, independiente del tratamiento o no con E2. Sin embargo, cuando los animales fueron improntados con genisteína, al igual que con extracto 1403a, el alto epitelial resultó más pequeño al compararlo con los controles. Esto podría explicarse por un aumento en la cantidad de fluido presente en los conductos testiculares - el cual ejercería una presión sobre el epitelio, disminuyendo la altura o grosor de éste - o por una atrofia del epitelio seminífero. Anway y *col.* (2005) concluyeron que la alteración en la morfología del epitelio seminífero de F1 a los 60 días de edad, producto de una exposición prenatal a vinclozolina (antiandrogénico), se debía a la disminución de las células espermáticas producto de una exacerbada apoptosis, con una consecuente disminución en el número de espermatozoides e infertilidad presentes hasta la tercera generación (Cupp y *col.*, 2003; Uzumcu y *col.*, 2004). El mismo efecto se observó cuando se utilizó metoxiclor (compuesto estrogénico) en vez de vinclozolina. Cabe señalar que la espermatogénesis es un proceso que incluye proliferación clonal mitótica, reducción genética por meiosis, remodelación y diferenciación celular, y que para mantener la homeostasis dentro del testículo se requiere de la apoptosis constante de algunas células espermáticas en desarrollo, principalmente de las espermatogonias (Huckins, 1978). Por otro lado, está bien establecido que el desarrollo de las células espermáticas depende de testosterona y de la hormona folículo estimulante (FSH), y que la ausencia de ambas incrementa la apoptosis de éstas (McLachlan y *col.*, 1996). Además, los

estrógenos sintetizados en los testículos poseen una importante función en la regulación de la secreción de FSH a través de *feedback*-negativo a nivel hipofisiario e hipotalámico (Finkelstein y *col.*, 1991), por lo que un cambio en el balance andrógeno-estrógeno, así como también de la función estrogénica, puede alterar la normal homeostasis del túbulo seminífero, que se puede expresar en aumentos del diámetro del lumen y/o en anomalías del grosor del epitelio seminífero.

Con respecto a la morfología de los espermatozoides, la impronta inducida en este estudio, así como el efecto del E2 exógeno, no modificó la morfología normal de estas células. En el trabajo llevado a cabo por Goyal y *col.* (2001), se empleó DES en ratas macho adultas para estudiar el efecto dosis-dependiente de los estrógenos sobre el número de espermatozoides, motilidad y morfología, concluyendo que tanto la motilidad como el número de espermatozoides se alteraba, pero no la morfología, indicando que en la alteración de este parámetro no influirían los estrógenos, o no al menos bajo las condiciones experimentales empleadas.

La viabilidad de los espermatozoides, medida indirectamente a través de la prueba de A.O. (ver 2.7) dejó en evidencia que la impronta con fitoestrógenos no altera el estado nativo del ácido desoxirribonucleico (ADN). Esto es avalado porque sólo se observó fluorescencia verde al someter los espermatozoides al método de tinción con A.O., resultado esperable en varias especies que presentan espermatozoides normalmente viables en el epidídimo (Kosower y *col.*, 1992).

5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales empleadas, se pudo demostrar que la aplicación subcutánea de genisteína o un extracto etanólico de una variedad de trébol rosado presente en el sur del país, a ratas preñadas en el día 15 y 18 de gestación, fue capaz de inducir un cambio en las respuestas a E2 sobre el número de espermatozoides, el diámetro luminal y el grosor del epitelio seminífero en la vida adulta de la cría, fenómeno atribuible a una impronta o programación del desarrollo del individuo en etapa prenatal.

Otro ámbito que merece ser considerado, lo constituye la verificación del efecto del aumento en el número de espermatozoides sobre la fecundidad o mejoría de la fertilidad de los

machos. Lamentablemente, el estudio de este efecto – que puede tener relevancia en producción animal – hubiera demandado una mayor cantidad de animales y aumento de costos.

Finalmente, a partir de las condiciones experimentales utilizadas, pueden extrapolarse los posibles efectos *in vivo*. La ausencia de impronta (con genisteína o extracto) y posterior administración de E2, tiene su símil en hembras preñadas alimentadas con dietas bajas en fitoestrógenos. Las crías macho de estas hembras serán incapaces de responder a E2 en la vida adulta, respuesta que se verificará en el no aumento del número de espermatozoides, y por consiguiente, en una menor capacidad reproductiva. Guardando las reservas correspondientes, la genisteína parece ser un muy buen agente improntador cuando se intente aumentar el número de espermatozoides en machos, tras la administración de E2 en edad adulta.

6. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue posible gracias al financiamiento otorgado por el proyecto CONICYT ACT07. Agradecemos a INIA Carillanca por proporcionar la planta usada en el presente estudio.

7. REFERENCIAS

ADLERCREUTZ, H. 1990. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest.* 50 (Suppl): 210 :3–23.

ANWAY, M. D.; CUPP, A. S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K.; 2005. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* 308:5727, 1466–1469.

ASSINDER, S.; DAVIS, R.; FENWICK, M.; GLOVER, A. 2007. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction* (2007) 133: 11–19.

BARLOW, D. P. 2011. Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. *Annu Rev Genet.* 45: 379-404.

BENNETT, H.W.; UNDERWOOD, E.J.; SHIER, F.L. 1946. A specific breeding problem of sheep

on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J* 22:2–12.

COUSE, J.F.; KORACH, K.S. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev.* 20: 358–417.

COUSE, J.F.; HEWITT, S.C.; BUNCH, D.O.; SAR, M.; WALKER, V.R.; DAVIS, B.J. 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors α and β . *Science.* 286: 2328–31.

CREWS, D.; MCLACHLAN, J.A. 2006 Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology* 147 (Suppl): S4–S10.

CSABA, G. 1980. Phylogeny and ontogeny of hormone receptors: the selection theory of receptor formation and hormonal imprinting. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 55: 47-63.

CUPP, A. S.; UZUMCU, M.; SUZUKI, H.; DIRKS, K.; PHILLIPS, B.; SKINNER M. K. 2003. Effect of Transient Embryonic In Vivo Exposure to the Endocrine Disruptor Methoxychlor on Embryonic and Postnatal Testis Development. *J. Androl.* 24: 736-745.

EDDY, E.M.; WASHBURN, T.F.; BUNCH, D.O.; GOULDING E.H.; GLADEN, B.C.; LUBAHN, D.B. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology.* 137:4796–805.

EDELMAN, D.A. 1986. Urogenital tract changes in female offspring exposed to DES. En: DES/diethylstilbestrol: new perspectives. Boston: MTP Press; 69–80.

FINKELSTEIN, J. S.; O’DEA, L. S. L, WHITCOMB, R. W.; CROWLEY, 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* 70: 621–628.

FISHER, C. R; GRAVES, K. H.; PARLOW, A. F.; SIMPSON, E. R. 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of

- targeted disruption of the cyp 19 gene. *Proc Natl Acad Sci* 95: 6965–70.
- FISHER, J. S.; TURNER, K. J.; FRASER H. M.; SAUNDERS, P. T. K.; BROWN, D.; SHARPE, R.M. 1998. Immunoeexpression of aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its modulation by estrogens and its possible role in fluid resorption. *Endocrinology* 139:3935–3945.
- FOWLKES, L.; SULLIVAN, J. M. 1995. Estrogens, blood pressure and cardiovascular diseases. *Cardiol Rev* 3: 106–114.
- FREE, M. J.; JAFFE, R. A. 1979. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biol Reprod*, 20:269-278.
- GIUSTI, R. M.; IWAMOTO, K.; HATCH, E. E. 1995. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med* 122: 778–788.
- GLOVER, A.; ASSINDER, S. J. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Journal of Endocrinology*. 189: 565–573.
- GORSKI, R. A. 1985. Sexual dimorphisms of the brain. *J Anim Sci* 61(Suppl 3):38–61.
- GOYAL, H. O.; BARTOL, F. F.; WILEY, A. A.; KHALIL, M. K., CHIU, J.; VIG, M. M. 1997. Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat Rec* 249(1):54-62.
- GOYAL H. O.; BRADEN T.D.; MANSOUR, M.; WILLIAMS, C. S.; KAMALELDIN A.; SRIVASTAVA K. K. 2001. Diethylstilbestrol - Treated Adult Rats with Altered Epididymal Sperm Numbers and Sperm Motility Parameters, but Without Alterations in Sperm Production and Sperm Morphology. *Biology of Reproduction* 64, 927–934.
- HESS, R. A.; GIST, D. H.; BUNICK, D.; LUBAHN, D. B.; FARRELL, A.; BAHR, J. 1997a. Estrogen receptor (α and β) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl*. 18: 602–11.
- HESS, R. A. 2000. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod*. 5: 84–92.
- HESS, R. A. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:52.
- HESS, R. A.; BUNICK, D.; LEE K. H. 1997b. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390: 509–512.
- HERBST, A. L.; ULFELDER, H. POSKANZER, D. C. 1971. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 284:878–881.
- HO, S. M.; TANG, W. Y.; BELMONTE. J.; PRINS, G. S. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res*. 66: 5624–5632.
- HUCKINS, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rat: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anatomical Record*. 190: 905–926.
- KOSOWER, N. S.; KATAYOSE, H.; YANAGIMACHI, R. 1992. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J androl*. 13 (4).
- KUIPER, G. G.; LEMMEN J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. A. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta *Endocrinology*, 139:4252-4263.
- LI, S.; HANSMAN, R.; NEWBOLD, R.; DAVIS, B.; MCLACHLAN, J. A.; BARRETT, J. C. 2003. Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus. *Mol Carcinog*. 38: 78–84.
- MAJDIC, G.; MILLAR, M. R.; SAUNDERS, P. T. K. 1995. Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts *J Endocrinol* 147: 285-293.

- MARKIEWICZ, L.; GAREY, J.; ADLERCREUTZ, H.; GURPIDE, E. 1993. *In vitro* bioassays of nonsteroidal phytoestrogens. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 45: 399–405.
- MCLACHLAN, R. I.; WREFORD, N. G.; O'DONNELL, L.; DE KRETZER, D. M.; ROBERTSON, D. M. 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology* 148: 1–9.
- MCLACHLAN, R. I.; O'DONNELL, L.; MEACHEM, S. J.; STANTON, P. G.; DE KRETZER, D. M.; PRATIS, K.; ROBERTSON, D. M. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkey, and man. *Recent Progress in Hormone Research* 57: 149–179.
- MEACHEM, S. J.; WREFORD, N. G.; STANTON, P. G.; ROBERTSON, D. M.; MCLACHLAN, R. I. 1998. Follicle stimulating hormone is required for the initial phase of spermatogenic restoration in adult rats following gonadotrophin suppression. *J Androl.* 19: 725–735.
- MILLER, W. R.; SHARPE, R. M. 1998. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine Related Cancer* 5: 69–96.
- MURKIES, A. L.; WILCOX, G.; DAVIS, S. D. 1998. Clinical review: Phytoestrogens. *The journal of clinical endocrinology & metabolism.* 83(2).
- NEWBOLD, R. R.; PADILLA-BANKS, E.; JEFFERSON, W. N. 2006. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology* 147(Suppl): S11–S17.
- O'DONNELL, L.; KIRSTEN, M. R.; D. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. 2001. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22(3): 289–318.
- OLIVEIRA, C. A.; CARNES, K.; FRANCA, L. R.; HESS, R. A. 2001. Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat *Biol Reprod* 2001, 65: 913-920.
- OLIVEIRA, C. A.; ZHOU, Q.; CARNES, K.; NIE, R.; KUEHL, D. E.; JACKSON, G. L.; FRANCA, L. R.; NAKAI, M.; HESS, R. A. 2002. ER Function in the Adult Male Rat: Short- and Long-Term Effects of the Antiestrogen ICI 182,780 on the Testis and Efferent Ductules, without Changes in Testosterone. *Endocrinology.* 143: 2399-2409.
- PRINS, G. S. 2008. Estrogen imprinting: when your epigenetic memories come back to haunt you. *Endocrinology* 149: 5919-5921.
- PALMER, J. R.; WISE, L. A.; HATCH, E. E.; TROISI, R.; TITUS-ERNSTOFF, L.; STROHSNITTER, W.; KAUFMAN, R.; HERBST, A. L.; NOLLER, K. L.; HYER, M.; HOOVER, R. N. 2006. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1509–1514.
- REN, M. Q.; KUHN, G.; WEGNER, J.; NURNBERG, G.; CHEN, J.; ENDER, K. 2001. Feeding daidzein to late pregnant sows influences the estrogen receptor beta and type 1 insulin-like growth factor receptor mRNA expression in newborn piglets. *Journal of Endocrinology* 170: 129-135.
- RAKYAN, V.; WHITELAW, E. 2003. Transgenerational epigenetic inheritance. *Curr boil.* 13(1) pp. R6.
- RIGGS, B. L.; MELTON, L. J. 1995. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone.* 17 (Supp 5):505S–511S.
- ROBERTSON, K. M.; O'DONNELL, L.; JONES, M. E.; MEACHEM, S. J.; BOON, W. C.; FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; MCLACHLAN, R. I.; SIMPSON E. R. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7986-7991.
- ROY, A. K.; CHATTERJEE, B. 1983. Sexual dimorphism in the liver. *Annu Rev Physiol.* 45: 37–50.
- SHARPE, R. M. 1998. The roles of estrogen in male fertility. *TEM* vol 9, (9).
- STROHSNITTER, W.; NOLLER, K. L.; HOOVER, R. N.; ROBBOY, S. J.; PALMER, J. R.; TITUS-ERNSTOFF, L.; KAUFMAN, R.; ADAM, E.; HERBST, A. L.; HATCH, E. E. 2001. Cancer risk in men exposed in utero to

diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst.* 93: 545–551.

TANG, W. Y.; NEWBOKD, R. R.; MARDILOVICH, K.; JEFFERSON, W. N.; CHENG, R. Y.; MEDVEDOVIC, M.; HO, S. M. 2008 Persistent hypomethylation in the promoter of *nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1)* correlates with overexpression of *Nsbp1* in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology* 149: 5922–5931.

TAYLOR, G. T.; WEISS, J.; FRECHMANN, T.; HALLER, J.; 1985. Copulation induces an acute increase in epididymal sperm numbers in rats. *J. Reprod. Fert.* 73: 323-327.

TEJADA, R. I.; MITCHELL, J. C.; NORMAN, A.; MARIK, J. J.; FRIEDMAN, S.; 1984. A test for the practical evaluation of the male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 48: 87.

TITUS-ERNSTOFF, L.; TROISI, R.; HATCH, E. E.; WISE, L. A.; PALMER, J. R.; HYER, M.; KAUFMAN, R.; ADAM, E.; STROHSNITTER, W.; NOLLER, K. L.; HERBST, A. L.; GIBSON-CHAMBERS, J.; HARTGE, P.; HOOVER, R. N. 2006. Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Int J Epidemiol* 35: 862–868.

TOPPARI, J.; LARSEN, J. C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L. J. 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104: 741–803.

UZUMCU, M.; SUZUKI, H.; SKINNER M. K. 2004. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function. *Reprod. Toxicol.* 18: 765-774.

VILLANUEVA, J. P. 2010. Tesis. Imprinting hormonal en ratas: evaluación de efectos sobre útero y músculo esquelético por exposición prenatal a dos fuentes de fitoestrógenos. Santiago, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.