

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

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

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

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

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

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

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

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

Recibido: 2016-02-10
 Aceptado: 2016-06-08
 Publicado: 2016-07-01

Información y declaraciones adicionales
 en la página 9

© Derechos de autor:
 Alicia González-González *et al.* 2016

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
 Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Administración neonatal única de aceite de soya y/o tamoxifeno afecta permanentemente a la histomorfología testicular en ratas adultas

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración de tamoxifeno (Tx) y aceite de soya (SO) durante el periodo crítico de la diferenciación sexual hipotalámica en ratas macho recién nacidas, en el contexto de la histomorfología gonadal durante la edad adulta. Los animales se dividieron al azar en tres grupos ($n = 5$ cada uno). Una hora después del nacimiento, un grupo fue tratado por vía subcutánea con 200 μg de Tx y 20 μL de SO comercial como vehículo; mientras otro grupo fue tratado solo con 20 μL de SO, y el grupo control no recibió ningún tratamiento. Todas las ratas se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical a los 90 días postratamiento. Se extrajeron los testículos, se pesaron y procesaron para la evaluación histológica. La administración única de Tx y de SO durante el periodo crítico de la diferenciación sexual del hipotálamo altera de forma permanente la histomorfología testicular, la espermatogénesis y el peso corporal en la edad adulta. Las alteraciones incluyen: vacuolización, reducción del número de espermatogonias y de células de Sertoli. La administración de Tx redujo el peso testicular, el diámetro y el área de los túbulos seminíferos, así como la altura del epitelio germinal, e incrementó el espacio intertubular. El SO redujo el número de espermátocitos y espermátides, incluso más que el Tx. No se afectó el número de células de Leydig. La posibilidad de que el aceite de soya actúe como disruptor endócrino, amerita más atención y abre la posibilidad para el desarrollo de nuevos métodos de control de plagas.

Palabras clave: disruptores endócrinos; tamoxifeno; aceite de soya; diferenciación sexual del hipotálamo; morfología testicular.

Introducción

Durante el desarrollo de la rata, en el periodo crítico de la diferenciación sexual a nivel cerebral, el cerebro de estos roedores macho está expuesto a altos niveles de testosterona de origen testicular, los cuales se incrementan a finales de la gestación, principalmente dos horas después del nacimiento (Anne *et al.* 2011). En las neuronas, la testosterona se convierte a estrógenos mediante la intervención

de la enzima P450 aromatasas. Los estrógenos pueden actuar en dos etapas: en la fase de "organización" durante los periodos prenatal y postnatal temprano, y en la fase de "activación" en la edad adulta (Phoenix *et al.* 1959). El efecto del estradiol en la fase organizacional induce la diferenciación sexual del hipotálamo (Lauber *et al.* 1997) y regula activamente los circuitos neuronales (Barraclough 1966; Simerly *et al.* 2002), responsables de la secreción tónica de gonadotropinas (Finkelstein *et al.* 1991; Bagatell *et al.* 1994) y el comportamiento reproductivo característico de los machos (Lauber *et al.* 1997; Simerly 2002). Los estrógenos también participan en la espermatogénesis y en la maduración espermática en el epidídimo (Balasinor *et al.* 2001).

La exposición a disruptores endócrinos (EDCs, por sus siglas en inglés, endocrine-disrupting chemicals, de origen natural o sintético) exógenos que imitan o bloquean el efecto endógeno de las hormonas esteroides sexuales (Wilson *et al.* 2007) pueden enviar mensajes contradictorios al cuerpo, y provocar anomalías en el desarrollo biológico con efectos irreversibles.

El papel de los estrógenos en la reproducción sexual se ha confirmado mediante el uso de antiestrógenos como el tamoxifeno (Tx; Z-1-[4-(2-dimethylamino-ethoxy)-phenyl]-1, 2-diphenyl-1-butane) (Barraclough 1967; Dörner 1968; Döhler *et al.* 1984), un fármaco sintético comúnmente utilizado en el tratamiento de cáncer de mama. Su mecanismo de acción aún no es claro, pero se sabe que ejerce diversos efectos biológicos, actúa como un completo agonista o antagonista según la dosis, el órgano blanco, el sexo y la especie (Gill-Sharma *et al.* 1993; Furr *et al.* 1984; Macnab, 1984). Además del tamoxifeno existen otros químicos que alteran el ambiente hormonal y afectan el crecimiento, el desarrollo y el comportamiento sexual.

En ratones macho, el Tx perjudica el desarrollo de los testículos y las glándulas accesorias después de la administración neonatal (24 horas postnacimiento; 20 o 100 µg/día durante cinco días; Iguchi, 1986), y genera infertilidad (Taguchi 1987). El Tx impide la interacción del estradiol con su receptor en el hipotálamo, además de inhibir la enzima aromatasas, lo que conduce a la feminización cerebral (Döhler *et al.* 1985). En ratas adultas, Gill-Sharma (1993) y Nafisa Balasinor (2002) reportaron un efecto irreversible del Tx sobre el eje hipotálamo-hipófisis (observaron una reducción-dosis dependiente en la fertilidad debido a la pérdida de embriones en hembras apareadas con ratas macho tratadas con Tx).

En nuestro grupo, Herrera *et al.*, (2013) encontraron que en ratas, una sola dosis subcutánea (sc) de Tx (200 µg), aplicada una hora después del nacimiento, modifica la expresión de ciertos genes hipotalámicos. Para avanzar en estos estudios, diseñamos un experimento donde se determinó la expresión de 11 genes específicos en el hipotálamo de ratas macho dentro de las primeras seis horas después del tratamiento con: 1) Tx disuelto en SO, 2) SO y 3) grupo control, a una hora postnacimiento.

Algunos de los animales se pesaron cada semana, se sacrificaron a los 90 días de edad, y se les extrajeron los testículos, se pesaron y se sometieron a análisis histológico. Las observaciones de los cambios en la morfología testicular en estos animales se presentan en esta comunicación.

Materiales y métodos

Animales

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

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

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

Dos semanas después del primer parto, se realizó de nuevo el seguimiento del ciclo estral. Una hembra y un macho se colocaron una vez más en una jaula durante tres horas. El inicio de la gestación se verificó por la presencia de espermatozoides mediante citología vaginal y por la formación de tapón seminal. Las ratas gestantes fueron alojadas en jaulas bajo las condiciones antes descritas. Como nuestro principal objetivo fue analizar el efecto de la administración temprana (una hora después del nacimiento) del Tx y su vehículo (SO) sobre la morfología microscópica testicular en ratas adultas, fue necesario un estricto control del tiempo de fertilización y el monitoreo constante de las madres, principalmente al final de la gestación para identificar la hora exacta de nacimiento.

El momento del nacimiento de cada animal se consideró como hora cero. A los machos recién nacidos se les separó de su madre para formar tres grupos de cinco animales cada uno. Una hora después del nacimiento se administró el tratamiento: un grupo fue tratado por vía subcutánea con 200 µg de Tx de una marca comercial (Sigma-Aldrich- Sigma-Aldrich Corporate Offices, 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103, USA) diluido en SO (20 µL); otro grupo fue tratado sólo con 20 µL de SO por la misma vía, y el grupo control que no recibió tratamiento alguno. El Tx se aplicó con la finalidad de inducir feminización del cerebro. El SO sólo se administró para evitar confundir los efectos del tratamiento con los de su vehículo. A las ratas tratadas se les regresó con sus madres hasta el destete (21 días) y, después, se alimentaron de la misma manera que los otros animales.

Colección y procesamiento de las muestras

Todas las ratas se pesaron cada semana hasta los 90 días postratamiento y se sacrificaron por dislocación cervical. De inmediato, los testículos se les retiraron en bloque y se disecaron bajo un microscopio estereoscópico, se pesaron en una balanza analítica, se profundieron y se fijaron en solución Bouin durante ocho horas.

Subsecuentemente se deshidrataron en series descendentes de alcohol etílico, se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina para realizar cortes transversales (cinco micras) en un micrótopo rotatorio (Leica RM2125 RT). Finalmente, se tiñeron con hematoxilina-eosina para hacer las evaluaciones morfológicas, y los cortes transversales de los testículos se observaron bajo el microscopio.

Evaluación morfológica

Solo se digitalizaron túbulos redondos, 10 túbulos por cada testículo (20 túbulos por cada rata), que se analizaron en campos de amplificación 20X y 40X. Las mediciones del diámetro, área, altura del epitelio germinal y del espacio intersticial se realizaron a partir de secciones digitalizadas con el software LSM5 (Carl Zeiss, Alemania) con las herramientas de marcado.

Una vez fotografiadas las secciones transversales, se identificó el estadio tubular y el conteo celular mediante el método de morfología tubular (Berndtson 1977; Hess 2007), basado en la forma de los núcleos de las espermátides, la aparición de divisiones meióticas, y la posición de espermátides en el epitelio seminífero (Farias *et al.* 2014). Tres morfólogos veterinarios analizaron todas las laminillas y los resultados individuales se promediaron para este reporte.

Análisis estadístico

Mediante la prueba de Shapiro Wilks se determinó la normalidad de los datos en los diferentes parámetros estudiados. Según la distribución normal obtenida, los datos se evaluaron o con la prueba de Kruskal-Wallis (morfología y conteo celular), o con ANOVA (peso corporal y testicular). Los resultados se expresan como valores promedio \pm EE (error estándar) y los valores promedio \pm DE (desviación estándar) respectivamente. Los valores del peso corporal y el peso testicular se obtuvieron de cinco animales por grupo, de quienes se tomaron 10 túbulos al azar de cada testículo. La estadística se calculó con el Software PAST (Paleontological Statistics, Paquete de Educación y Análisis de Datos (Huang *et al.* 2013)

Resultados y discusión

Los resultados del peso testicular y el peso corporal a los 90 días postratamiento se muestran en el [cuadro 1](#). El promedio del peso testicular fue significativamente más bajo en los animales tratados con Tx, que en los grupos: control y el tratado solo con SO (F: 47.19; grados de libertad entre grupos: 2; grados de libertad dentro de los grupos: 12; $P < 0.001$).

El promedio del peso corporal a los 90 días fue menor en los animales tratados con Tx seguido del grupo tratado con SO, mientras que los animales del grupo control obtuvieron un peso mayor (F: 16.67; grados de libertad entre grupos: 2; grados de libertad dentro de los grupos: 12; $P < 0.001$). Solo los animales tratados con Tx mostraron una reducción significativa en el diámetro tubular (H: 12.88; Hc: 13.00; $P < 0.005$), el área tubular (H: 9.85; Hc: 9.85; $P < 0.05$) y la altura del epitelio germinal (H: 27.04; Hc: 27.05; $P < 0.001$) ([cuadro 2](#)). En comparación con

Cuadro 1. Promedio \pm DE del peso corporal y testicular a los 90 días.

Características	Control	SO	Tamoxifeno
Peso testicular (g)	5.2 \pm 0.3 ^a	5.5 \pm 0.2 ^a	4.4 \pm 0.3 ^b
Peso corporal (g)	443.3 \pm 15.1 ^a	400.5 \pm 14.1 ^b	362.0 \pm 8.6 ^c

Peso corporal y testicular de ratas de 90-días de edad. Distinto superíndice en cada línea indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Morfometría testicular de ratas macho de 90 días de edad tratadas con tamoxifeno y SO una hora posnacimiento (promedio \pm EE).

Característica	Control	SO	Tamoxifeno
Diámetro tubular (μm)	279.4 \pm 8.7 ^a	304.11 \pm 11.0 ^a	219.2 \pm 6.4 ^b
Área tubular (μm^2)	193,103.1 \pm 10249.0 ^a	163,359.0 \pm 11495.1 ^a	131,672.0 \pm 3033.6 ^b
Altura del epitelio germinal (μm)	45.0 \pm 1.1 ^a	42.0 \pm 2.9 ^a	30.4 \pm 1.4 ^b
Espacio intertubular (μm)	4.2 \pm 0.4 ^a	16.7 \pm 2.2 ^b	39.5 \pm 4.1 ^c

Alteraciones testiculares inducidas por tratamientos con Tx y/o SO. Distinto superíndice en cada línea indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 3. Conteo celular en testículos de ratas de 90-días de edad tratadas con tamoxifeno y/o aceite de soya una hora posnacimiento (promedio \pm EE).

Tipo celular (número)	Control	SO	Tamoxifeno
Espermatogonias/túbulo	66.7 \pm 8.4 ^a	46.1 \pm 5.4 ^b	40.3 \pm 2.7 ^b
Espermatocitos/túbulo	149.3 \pm 17.4 ^a	64.9 \pm 5.9 ^c	97.2 \pm 7.9 ^b
Espermátides/túbulo	171.7 \pm 40.8 ^a	41.6 \pm 9.2 ^c	113.3 \pm 9.2 ^b
Células de Sertoli/túbulo	7.4 \pm 0.5 ^a	4.7 \pm 0.3 ^b	5.0 \pm 0.7 ^b
Células de Leydig/espacio intertubular	10.5 \pm 0.5 ^a	9.8 \pm 0.6 ^a	9.8 \pm 0.6 ^a

Alteraciones testiculares inducidas por tratamientos con Tx y/o SO. Distinto superíndice en cada línea indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

el grupo control, el espacio intertubular fue mayor en los animales tratados con Tx seguido de los tratados con SO.

El promedio del conteo celular por túbulo se muestra en el cuadro 3. El número de espermatogonias (H: 6 953; Hc: 6 959; $P < 0.05$) y las células de Sertoli (H: 9.89; Hc: 10.31; $P < 0.05$) fue significativamente menor en los grupos experimentales Tx y SO en comparación con el grupo control. No se observaron diferencias en el número de células de Leydig (H: 1.33; Hc: 1.33; $P < 0.5$). Comparado con el grupo control, los machos tratados con SO mostraron mayor reducción en el número de espermatocitos (H: 12.21; Hc: 12.22 $P < 0.05$) y espermátides elongadas (H: 11.62; Hc: 11.64; $P < 0.05$), seguido de los machos tratados con tamoxifeno.

Como se observa en la figura 1, los testículos del grupo control (A-B) mostraron evidencia de túbulos seminíferos con espermatogénesis normal. El grupo tratado con SO (C-D) mostró vacuolización en los túbulos seminíferos, destrucción del epitelio germinal, reducción del número de células germinales y de células de Sertoli; además, incrementó el espacio intertubular y la desagrupación de las células de Leydig. Estas alteraciones también se encontraron en los animales tratados con Tx, que además mostraron túbulos con reducción significativa en el diámetro y el área tubular, así como un espacio intertubular más amplio que en el grupo SO y, control.

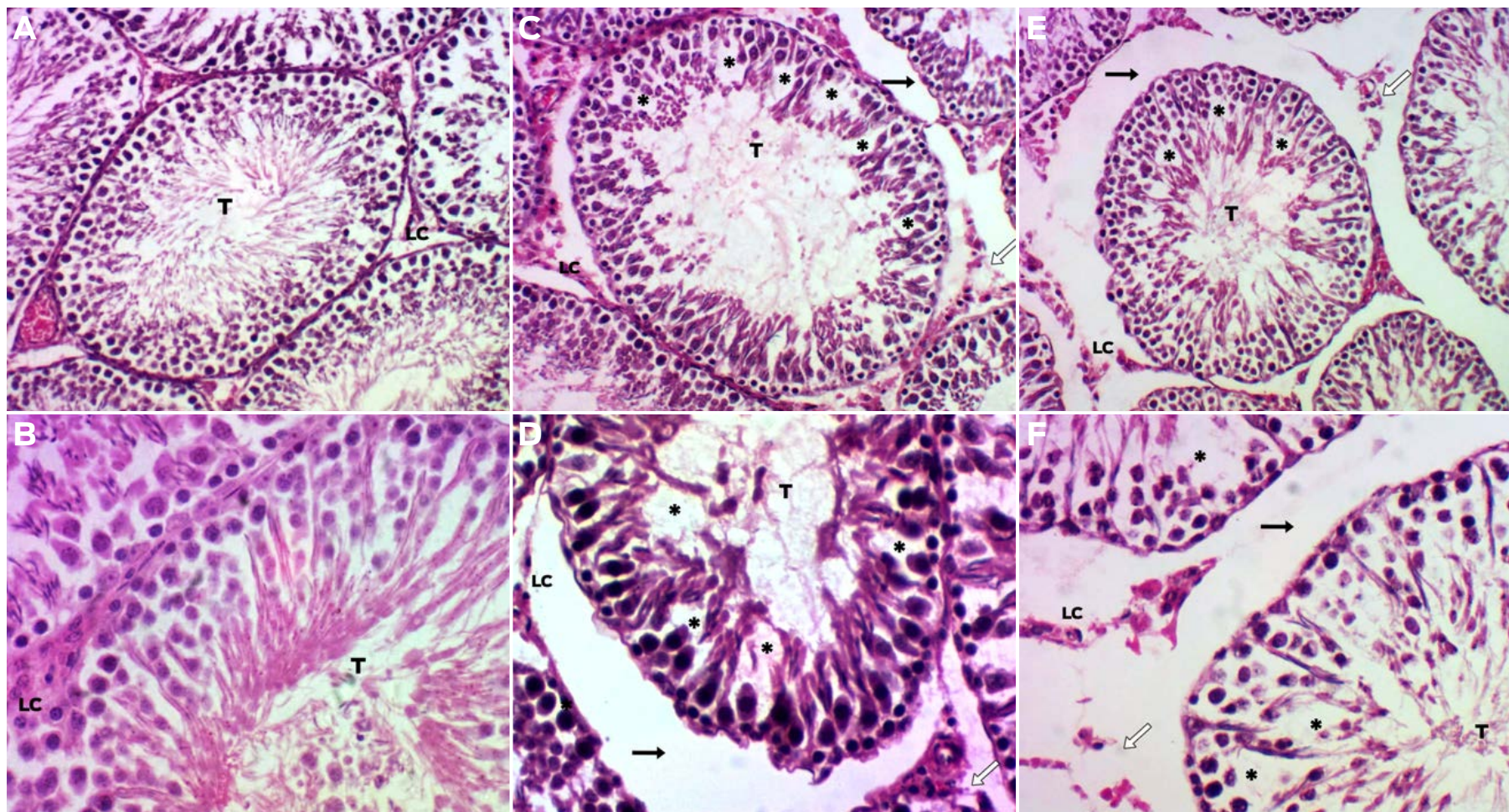


Figura 1. Secciones histológicas representativas de los testículos, teñidas con hematoxilina-eosina, colectadas del grupo de control (A y B); de ratas tratadas con SO (C y D), y con Tx (E y F). A, C y E, 200X. B, D y F, 400X. T: túbulo. LC: células de Leydig. Se pueden observar los cambios histológicos inducidos por los tratamientos con Tx y/o SO. Las flechas negras señalan mayor espacio intertubular. Las flechas blancas en E y F señalan la desagrupación de las LC. Los asteriscos señalan vacuolas presentes en los túbulos seminíferos.

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

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

El testículo de mamífero se caracteriza por la síntesis de hormonas esteroides y la producción de espermatozoides (Carreau *et al.* 2006). Las hormonas gonadotropinas y la testosterona controlan principalmente el desarrollo testicular y el mantenimiento de la espermatogénesis (Carreau *et al.* 1999). Los factores locales modulan el efecto sobre estas hormonas, uno de estos factores es el estrógeno, esencial para el mantenimiento del tracto reproductivo en los machos (Carreau *et al.* 2003).

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

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

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

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

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

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

En nuestro estudio, la vacuolización, la disminución de la altura del epitelio germinal y el aumento del espacio intertubular constituyen hallazgos importantes. Otros investigadores, como Pérez-Rivero y sus colegas (2009 y 2014) han reportado previamente estos cambios en los perros y en los murciélagos vampiro alimentados con dietas ricas en fitoestrógenos (cumestrol). Estas observaciones son compatibles con las de nuestro experimento, pero están asociadas con una sola inyección SC de aceite de soya.

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

Se sabe que Tx puede actuar como un antagonista o un agonista de estrógenos en el eje reproductivo de la rata (Bellido *et al.* 2003), y que el SO puede ser una fuente de fitoestrógenos. En este estudio, ambas sustancias se administraron en la primera hora después del nacimiento de las crías, cerca del momento crítico de la diferenciación sexual del hipotálamo; por lo tanto, los cambios morfológicos observados en los testículos se podrían atribuir a los efectos de los tratamientos sobre los núcleos hipotalámicos que controlan la secreción tónica de las gonadotropinas, con un efecto adicional sobre la esteroidogénesis testicular. El papel de la

testosterona en la función testicular y la espermatogénesis está bien documentado. Sin embargo, es importante mencionar que en los modelos de administración de fitoestrógenos de soya en roedores adultos, la interrupción de la función testicular puede ser independiente de las concentraciones circulantes de gonadotropinas y testosterona.

Conclusión

Esta comunicación documenta los cambios irreversibles en la función y la histomorfología testicular de ratas adultas causados por el tratamiento agudo único de tamoxifeno o aceite de soya una hora después del nacimiento de las ratas. Estos cambios pueden estar asociados con la interrupción del curso normal de la diferenciación sexual del hipotálamo durante el llamado periodo crítico de este proceso.

Financiamiento

Este proyecto fue parcialmente financiado por el CONACYT, subvención 105961-M, ANUIES-ECOS-CONACYT, subvención M10-A02, y CONACYT, beca 201677.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Beatriz Márquez Cruz y Pablo Sánchez Peña del Laboratorio de Patología (Zonas: Hospital General 47 y 1A, respectivamente, Instituto Mexicano del Seguro Social) por su apoyo técnico.

Al Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de UAMX por aprobar los procedimientos realizados en los animales.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés alguno.

Contribución de los autores

Alicia González-González, en el desarrollo experimental y el análisis de resultados.

Everardo González-Padilla, en la discusión y el análisis de los resultados.

Francisco Fierro, en el análisis de los resultados.

Mónica Salas-Rojas, en el análisis morfométrico.

Ma. De Lourdes Juárez-Mosqueda, en el procesamiento de las muestras.

Juan José Pérez-Rivero, en el análisis morfométrico y estadístico.

Clara Ortega-Camarillo y Marcela Vergara Onofre, en el diseño experimental y el suministro de materiales.

Referencias

- 1) Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids*, 64:610-617. DOI: 10.1016/S0039-128X(99)00041-0.
- 2) Anne T, Konkle AT, M, Margaret M. McCarthy M.M. 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in dis-

- crete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*, 152:223-235. DOI: 10.1210/en.2010-0607.
- 3) Assinder S, Davis R, Fenwick M, Glover A. 2007. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogens content increase apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction*, 133:11-19. DOI: 10.1530/rep.1.01211.
 - 4) Atanassova NN, Walker M, McKinnell C, Fisher JS, Sharpe RM. 2005. Evidence that androgens and oestrogens, as well as folliclestimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *Journal of Endocrinology*, 184:107-117. DOI: 10.1677/joe.1.05884.
 - 5) Bagatell CJ, Dahl KD, Bremner WJ. 1994. The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *Journal of Andrology*, 15:15-21. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1994.tb01674.x.
 - 6) Balasinor N, Gill-Sharma MK, Parte P, D'Souza S, Kedia N, Juneja HS. 2001. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 190:159-66. DOI:10.1016/S0303-7207(01)00723-7.
 - 7) Balasinor N, Gill-Sharma MK, Parte P, D'Souza S, Kedia N, et al., 2002. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 190:159-66. DOI:10.1016/S0303-7207(01)00723-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00723-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00723-7).
 - 8) Barraclough A. 1967. Modifications in reproductive function after exposure to hormones during the prenatal and early postnatal period. In: Martini L, Ganong WF (eds). *Neuroendocrinology*. United States of America, New York and London Academic Press. DOI: 10.1016/B978-1-4832-3229-4.50010-5.
 - 9) Barraclough CA. 1966. Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research Journal*, 22:503-539. DOI: 10.1016/B978-1-4831-9825-5.50016-6.
 - 10) Bellido C, Martín de las Mulas J, Tena-Sempere M, Aguilar R, Alonso R, Sánchez-Criado JE. 2003. Tamoxifen induces gonadotropin-releasing hormone self-priming through an estrogen-dependent progesterone receptor expression in the gonadotrope of the rat. *Neuroendocrinology*, 77(6):425-435. DOI: 10.1159/000071314.
 - 11) Berndston WE. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: A review. *Journal of Animal Science*, 44:818-833. DOI: 10.2134/jas1977.445818x.
 - 12) Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud DI, Genissel C, Levallet J. 2002. Reproductive system: Aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193:137-143. DOI: 10.1016/S0303-7207(02)00107-7.
 - 13) Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S, Lambard S. 2006. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246:65-68. DOI: 10.1016/j.mce.2005.11.021.
 - 14) Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and the reproductive tract of the male. *International Journal of Andrology*, 22:211-213. DOI: 10.1046/j.1365-2605.1999.00172.x.
 - 15) Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis GI, Bilinska B, Bourguiba S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 35:1-6. DOI: 10.1186/1477-7827-1-35.

- 16) Cederroth CR, Zimmermann C, Nef SS. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355:192-200. DOI: 10.1016/j.mce.2011.05.049.
- 17) Döhler K, Srivastava S, Shryne J, Jarzab B, Sipos A, Gorski R. 1984. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology*, 38:297-301. DOI: 10.1159/000123907.
- 18) Döhler KD, Hines M, Coquelin A, Davis F, Shryne JE, Sickmöler PM, et al. 1985. Pre- and postnatal influence of an estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology*, 42:443-448. DOI: 10.1159/000124484.
- 19) Dörner G, Staudt J. 1968. Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area of the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment. *Neuroendocrinology*, 3:136-140. DOI: 10.1159/000121703.
- 20) D' Souza UJA. 2003. Tamoxifen induced multinucleated cells (symlasts) and distortion of seminiferous tubules in rat testis. *Asian Journal of Andrology*, 5(3):217-220 <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682x/5/217.htm> [consulta: 15 jun 2016].
- 21) Farias TO, Notini AA, Talamoni SA, Godinho HP. 2014. Testis morphometry and stages of the seminiferous epithelium cycle in an epididymal sperm-storing neotropical vespertilionid, *Myotis levis* (Chiroptera). *Journal of Veterinary Medicine*, 44:361-369. DOI: 10.1111/ahe.12148.
- 22) Finkelstein JS, O'Dea LSL, Whitcomb RW, Crowley WF. 1991. Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II Effects of estradiol administered in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70:621-628. DOI: 10.1210/jcem-73-3-621.
- 23) Furr BJA, Jordan VC. 1984. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacology and Therapeutics*, 25:127-205. DOI: 10.1016/0163-7258(84)90043-3.
- 24) Gill-Sharma MK, Gopalkrishnan K, Balasiner N, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. 1993. Effects of tamoxifen on the fertility of male rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99:395-402. DOI: 10.1530/jrf.0.0990395.
- 25) Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. 2003. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biology of Reproduction*, 68:2081-2091. DOI: 10.1095/biolreprod.102.010637.
- 26) Herrera GH, Rosado GA, Vergara OM, Salcedo VM, Miliar GA, Heuze de IY et al. 2013. Genetic expression associated to cell cycle, apoptosis, synaptogenesis and cell differentiation during sex differentiation in rats. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(3):289-304. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v4n3/v4n3a3.pdf> [consulta: 15 jun 2016].
- 27) Hess RA, Bunick D, Bahr J. 2001. Oestrogen its receptor and function in male reproductive tract- a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178:29-38. DOI: 10.1016/S0303-7207(01)00412-9.
- 28) Hess RA, Bunick D, Lubahn BD, Zhou Q, Bouma J. 2000. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-a knockout mice. *Journal of Andrology*, 21(1):107-121. DOI:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03282.x. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03282.x>.

- 29) Hess, RA, Renato de França. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636:1-15. DOI:10.1007/978-0-387-09597-4_1. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1.
- 30) Huang B, Harper DAT, Hammer O. 2013. Introduction to PAST, a comprehensive statistics software package for paleontological data analysis [PDF]. *Acta Paleontologica Sinica*, 52(2):181. http://paleo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf [consulta: 15 jun 2016].
- 31) Iguchi T, Hirokawa M. 1986. Changes in the male genital organs of mice exposed neonatally to tamoxifen. *Proceedings of the Japan Academy*, 62:157-160. DOI: 10.2183/pjab.62.157.
- 32) Kosif R, Yilmaz F, Evrendilek AG, Diramali M. 2010. Histopathological effects of *Aloe barbadensis* and soybean oil on rat liver. *International Journal of Morphology*, 28(4):1101-1106. DOI: 10.4067/S0717-95022010000400019.
- 33) Lambard S, Silandre D, Delalande C, Galeraud DI, Bourguiba S, Carreau S. 2005. Aromatase in testis: Expression and role in male reproduction. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 95:63-69. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2005.04.020.
- 34) Lauber ME, Sarasin A, Lichtensteiger W. 1997. Sex differences and androgen-dependent regulation of aromatase (CYP19) mRNA expression in the developing and adult rat brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61:359-364. DOI: 10.1016/S0960-0760(97)80033-7.
- 35) Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL Jr. 1995. The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual differentiation in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(1):60-66. DOI: 10.3181/00379727-208-43832.
- 36) Macnab MW, Tallarida RJ, Joseph R. 1984. An evaluation of tamoxifen as a partial agonist by classical receptor theory – an explanation of the dual action of tamoxifen. *European Journal of Pharmacology*, 103:321-326. DOI: 10.1016/0014-2999(84)90493-X.
- 37) Padmalatha RS, Vijayalaxmi KK. 2001. Tamoxifen citrate induced sperm shape abnormalities in the in vivo mouse. *Mutation Research*, 492:1-6. DOI: 10.1016/S1383-5718(00)00160-1.
- 38) Pérez-Rivero JJ, Pérez MM, Aguilar SA. 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route. *Journal of Applied Animal Research*, 42(2):208-212. DOI: 10.1080/09712119.2013.827578.
- 39) Perez-Rivero JJ, Martinez MJJ, Perez MM, Aguilar SA, Garcia SMD Serrano H. 2009. Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. *Veterinary Research Communications*, 33:87-95. DOI: 10.1007/s11259-008-9077-3.
- 40) Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, 65(3):369-382. DOI:10.1016/j.yhbeh.2009.01.004.
- 41) Roberts D, Veeramachaneni DN, Schlaff WD, Awoniyi CA. 2000. Effects of chronic dietary exposure to genistein, a phytoestrogen, during various stages

- of development on reproductive hormones and spermatogenesis in rats. *Endocrine*, 13(3):281-286. DOI: 10.1385/ENDO:13:3:281.
- 42) Saunders PTK. 2005. Does estrogen receptor b play a significant role in human reproduction? *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 16(5):222-227. DOI: 10.1016/j.tem.2005.05.006.
- 43) Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana P, Saunders PTK. 2002. Human estrogen receptors: Differential expression of ERalpha and beta and the identification of ERbeta variants. *Steroids*, 67:985-992. DOI: 10.1016/S0039-128X(02)00047-8.
- 44) Sharpe RM, Rivas A, Walker M, McKinnell C, Fisher JS. 2003. Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *International Journal of Andrology*, 26:26-36. DOI: 10.1046/j.1365-2605.2003.00385.x.
- 45) Simerly R. 2002. Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annual Review of Neuroscience*, 25:507-536. DOI: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142745.
- 46) Taguchi N. 1987. Reproductive tract lesions in the male mice treated neonatally with tamoxifen. *Biology of Reproduction*, 37:113-116. DOI: 10.1095/biolreprod37.1.113.
- 47) Wilson CA, Davies DC. 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction*, 133:331-359. DOI: 10.1530/REP-06-0078.
- 48) Wisniewski AB, Cernetich A, Gearhart JP, Klein SL. 2005. Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behaviour in male mice. *Physiology and Behavior*; 84:327-334. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.12.008.
- 49) Wisniewski AB, Klein SL, Lakshmanan Y, Gearhart JP. 2003. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinizes the reproductive system in rats. *Journal of Urology*, 169(4):1582-1586. DOI: 10.1097/01.ju.0000046780.23389.e0.
- 50) Yu-hua L, Fei D, Fen Y, Xiao-Yu Z, Hong-jie P, Yang L *et al.* 2015. Pubertal exposure to bisphenol A affects the reproduction of male mice and sex ratio of offspring. *Journal of Reproduction & Contraception*, 26(1):14-21. DOI: 10.7669/j.issn.1001-7844.2015.01.0014.

Alicia González-González¹**Everardo González-Padilla¹****Francisco Fierro²**

0000-0002-2582-5362

Ma. De Lourdes Juárez-Mosqueda³**Juan José Pérez-Rivero⁴****Clara Ortega-Camarillo⁵**

0000-0001-8709-6727

Mónica Salas-Rojas⁶

0000-0001-7046-0967

Marcela Vergara Onofre⁴

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

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

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

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

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

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

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

***Corresponding author:**

Email address:

mvergara@correo.xoc.uam.mx

Abstract

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

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

Received: 2016-02-10

Accepted: 2016-06-08

Published: 2016-07-01

Additional information and declarations
can be found on page 9

© Copyright 2016
Alicia González-González et al.

open access 

Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Introduction

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

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

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

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

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

Materials and methods

Animals

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

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

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

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

Collection and processing of samples

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

Morphological evaluation

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

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

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

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

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

Statistical analysis

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

Results and discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

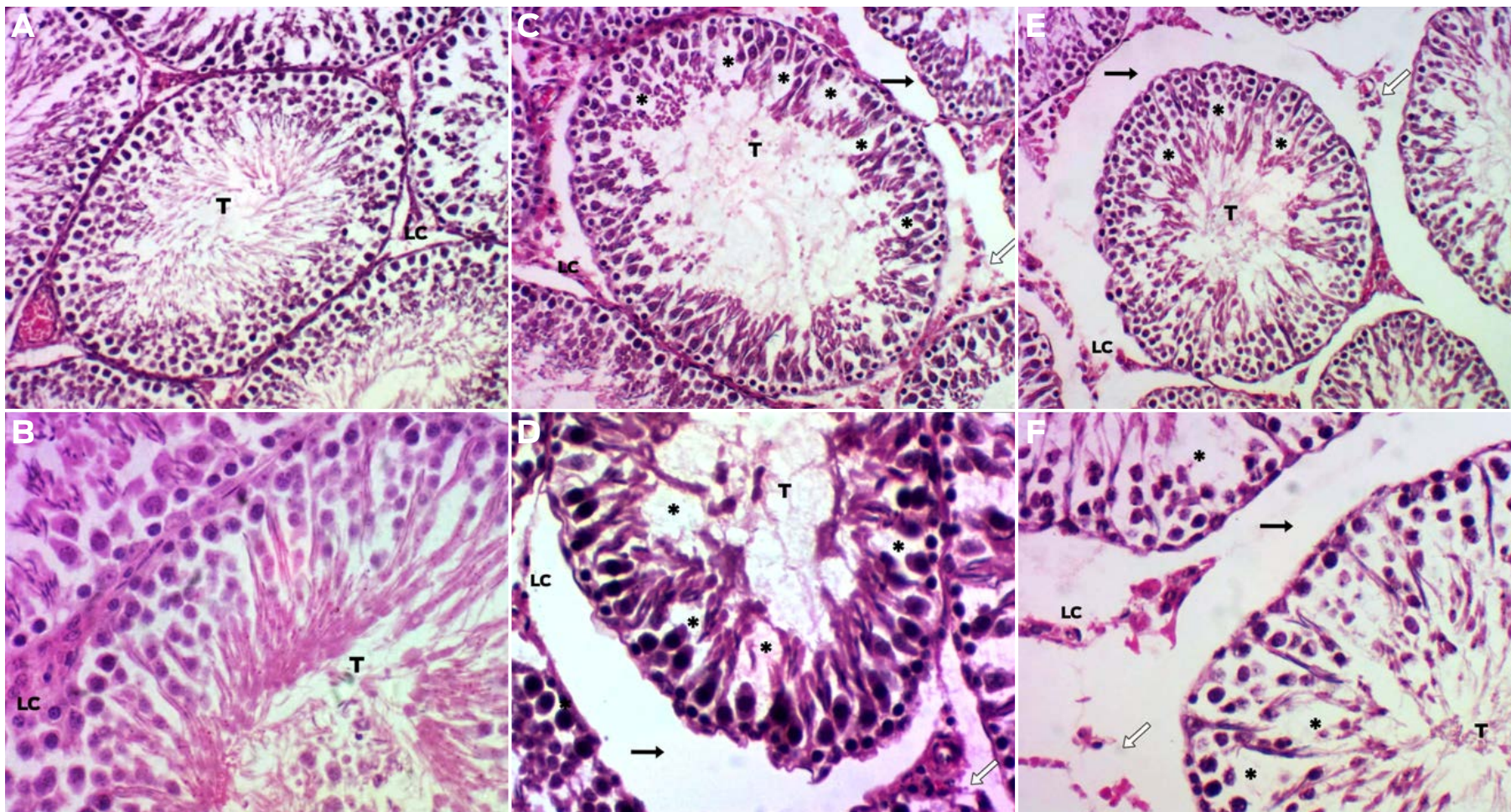


Figure 1. Representative hematoxylin-eosin-stained histological sections of testicles collected from the control group (A y B), rats treated with SO (C y D) and rats treated with Tx (E y F). A, C and E, 200X. B, D and F, 400X. T: Tubule. LC: Leydig cells. Histological changes induced by Tx and/or SO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

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

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

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

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

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

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

Conclusions

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

Funding

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

Acknowledgements

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

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

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

Alicia González-González, experimental development and analysis of results.

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

Francisco Fierro, in the analysis of results.

Mónica Salas-Rojas, in the morphometric analysis.

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

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

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

References

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

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

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

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

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