

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

159

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ADMINISTRACION DE DOS TRATAMIENTOS HORMONALES SOBRE LA FERTILIDAD Y MORFOLOGIA TESTICULAR EN LA CRIPTORQUIDIA EXPERIMENTAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ANDREA RAMOS MORALES

DIRECTOR DE TESIS: ROSA MARIA VIGUERAS VILLASENOR



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: RAMOS MORALES ANDREA
FECHA: 07 MARZO 2003
FIRMA: Andrea

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Estudio comparativo de la administración de dos tratamientos hormonales sobre la fertilidad y morfología testicular en la criptorquidia experimental".

realizado por Ramos Morales Andrea

con número de cuenta 9560614-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis
Propietario M. en C. Rosa María Viguera Villaseñor
- Propietario M. en C. Marco Antonio Martínez Avila
- Propietario Dra. Maricela Villagran Santacruz
- Suplente Dra. Patricia Rivas Manzano
- Suplente MVZ. Gabriela Reyes Torres

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

B

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Histomorfología de la Torre de Investigación "Dr. Joaquín Cravioto". Agradezco profundamente a sus directivos: Dra. Alessandra Carnevale Cantón, Directora de Investigación y Dra. Sara Frías Vázquez, Subdirectora de Medicina Experimental, por permitir la realización de esta tesis.

De manera muy especial agradezco a la M en C Rosa María Viguera Villaseñor todo el apoyo, paciencia, dedicación y sugerencias brindadas para la realización de esta tesis.

Así mismo a los miembros del jurado: Dra. Maricela Villagran Santacruz, Dra. Patricia Rivas Manzano, M en C Marco Antonio Martínez Avila y MVZ Gabriela Reyes Torres por sus valiosas sugerencias y comentarios al trabajo escrito.

De igual manera a mis compañeros y amigos del laboratorio: M en C Julio Cesar Rojas, MVZ. Gabriela Reyes y muy en especial a Pedro Medina por su apoyo y asistencia técnica.

Así como a la Srta. Mariana Severino, por su apoyo secretarial y a Edgar Daniel Cervantes ya que con su amplio conocimiento en el área de computación ayudo a mejorar las imágenes de dicho trabajo. Gracias.

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y familiares, que durante toda mi vida me han apoyado

A Dulce Paola y Alberto, por el cariño confianza y apoyo incondicional que me ha brindado. Gracias.

A Valeria, por alentarme a seguir adelante, eres la mejor de las amigas, gracias por tu amistad.

CONTENIDO	PAG
RESUMEN	1
I.-INTRODUCCIÓN	2
ASPECTOS GENERALES DEL TESTÍCULO	2
1.- Origen embrionario	2
2.- Anatomía general	5
3.- Histología del testículo	8
3.1 <i>Epitelio seminífero</i>	8
3.2 <i>Espermatogénesis</i>	10
3.3 <i>Espermiogénesis</i>	13
4.- Ciclo del epitelio seminífero	17
5.- Fisiología del testículo	23
II.- ANTECEDENTES	26
1.- Generalidades de la criptorquidia	26
2.- Mecanismos de descenso testicular	27
3.- Patologías asociadas a la criptorquidia	29
4.- Etiología	30
5.- Tratamientos	31
Quirúrgico	31
Hormonal	33
III.- JUSTIFICACIÓN	36

IV.-	OBJETIVOS	36
	Generales	36
	Particulares	36
V.-	HIPÓTESIS	37
VI.-	MATERIAL Y MÉTODO	37
	1.- <i>Intervención quirúrgica</i>	38
	2.- <i>Tratamiento hormonal</i>	38
	3.- <i>Técnica de orquidopexia</i>	38
	4.- <i>Evaluación de fertilidad</i>	39
	5.- <i>Procesamiento del material biológico</i>	39
	6.- <i>Evaluación histológica de los túbulos seminíferos</i>	40
VII.-	RESULTADOS	41
	1.- <i>Macroscópicos</i>	41
	2.- <i>Pruebas de fertilidad</i>	43
	3.- <i>Análisis histológico</i>	44
VIII.-	DISCUSIÓN	58
IX.-	CONCLUSIONES	61
X.-	REFERENCIAS	62
	APENDICE A	72
	APENDICE B	73

RESUMEN

La criptorquidia, o testículo no descendido, es una patología que puede tener secuelas a largo plazo sobre la fertilidad. Se han empleado terapias hormonales para inducir el descenso de los testículos del niño con criptorquidia como es el uso de la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona liberadora de las gonadotropinas (LHRH). Sin embargo, la hCG ha demostrado tener efectos adversos a largo plazo sobre la fertilidad, contrario a lo registrado para la LHRH, por lo tanto consideramos importante determinar el grado de fertilidad y los cambios histológicos en el testículo por la aplicación de ambas hormonas en un modelo de criptorquidia quirúrgica inducida experimentalmente. Para lo cual se emplearon 30 ratas macho de la cepa Wistar de 10 días de edad, distribuidas en 6 grupos a seguir: grupo control sano con administración de hCG (CS-hCG), control sano con aplicación de LHRH (CS-LHRH), criptorquídico bilateral con hCG (CB-hCG), criptorquídico bilateral con LHRH (CB-LHRH), criptorquídico unilateral con hCG (CU-hCG) y criptorquídico unilateral con LHRH (CU-LHRH). Los tratamientos hormonales se administraron durante 15 días a partir del día 16 de edad. A los 45 días los animales criptorquídicos bilaterales y unilaterales fueron sometidos al procesamiento quirúrgico de orquidopexia (descenso y fijación testicular), y a los 90 y 180 días se determinó la capacidad fértil de cada macho. Los animales se sacrificaron a los 190 días de edad. De cada grupo experimental se obtuvieron ambos testículos, los cuales se procesaron para su inclusión en EPON. Los grupos CS-hCG y CS-LHRH no presentaron alteraciones histológicas al igual que los grupos CB-LHRH y CU-LHRH. El grupo CB-hCG fue el más afectado, ya que 4 de 5 animales mostraron severas adherencias postquirúrgicas manteniendo ambos testículos en posición inguinal y teniendo como consecuencia daños irreversibles en el epitelio seminífero. El grupo CU-hCG mostró únicamente descamación celular, vacuolización intracelular y disminución en el número de espermátidas elongadas. Se concluye que el tratamiento con hCG altera la morfología testicular y por consiguiente disminuye la tasa de fertilidad comparado con la administración de LHRH. El tratamiento con LHRH restaura los daños histológicos y funcionales a largo plazo, sin alcanzar los mismos niveles de un animal control sano.

I.- INTRODUCCIÓN

ASPECTOS GENERALES DEL TESTÍCULO

1.- ORÍGEN EMBRIONARIO

La diferenciación gonadal hacia un ovario o un testículo es el punto de inicio de la determinación sexual de los mamíferos. Las hembras poseen dos cromosomas X y los machos un cromosoma X y un cromosoma Y. Un solo gen ligado al cromosoma Y, conocido como el factor determinante del testículo (FDT) es necesario para comprometer a la gónada bipotencial a desarrollarse en un testículo. Se ha logrado la identificación de un gen presente en el brazo corto del cromosoma Y, el cual reúne todas las características esperadas del FDT. A este gen se le denominó SRY en el humano (Berta y cols., 1990) y Sry en el ratón (Koopman y cols., 1990).

Si bien el sexo del embrión es determinado genéticamente en el momento de la fertilización las gónadas sólo adquieren caracteres morfológicos masculinos o femeninos en la séptima semana de desarrollo del hombre y en el ratón a los 12.5 días postcoito (dpc) (Langman y Saller, 1994).

La primera manifestación de las gónadas se aprecia en forma de un par de eminencias longitudinales, llamadas pliegues o crestas genitales, originadas a partir de un engrosamiento del epitelio celómico que cubre la cara medial del mesonefros. En embriones de mamíferos, incluyendo al ser humano, las células germinales primordiales en periodo inicial se sitúan en el rudimento alantoideo (Ozdzenski, 1967). Desde aquí las células germinales primordiales (CGP) migran o son acarreadas hasta la región urogenital del embrión donde se formarán las gónadas. El desplazamiento de estas células se da por dos tipos de movimientos:

pasivo y activo. El primero tiene lugar por una translocación de las CGP, localizadas en el endodermo y el mesénquima que formaran al intestino primitivo, desde aquí, las CGP pasan al interior del embrión. Aquí se inicia la migración *activa* de las CGP, es decir que tienen que valerse de su propia capacidad de locomoción para salir del intestino y atravesar la lámina basal que lo recubre. Este movimiento se manifiesta por emisión de pseudópodos capaces de romper la lámina basal del intestino y continuar su camino hacia las futuras crestas genitales (Ozdzewski, 1967).

Poco antes de la llegada de las CGP y durante ésta, el epitelio celómico del pliegue genital prolifera y las células epiteliales penetran en el mesénquima subyacente. Aquí forman varios cordones irregulares, los cordones sexuales primitivos. En embriones masculinos y femeninos, estos cordones están unidos al epitelio de la superficie y en esta etapa es imposible diferenciar entre la gónada masculina o femenina por lo que, se le denomina gónada indiferenciada (Houillon, 1972).

Si el embrión es genéticamente masculino las CGP tienen un complejo de cromosomas sexuales XY. Por influencia del cromosoma Y, que codifica el factor determinante de los testículos, los cordones sexuales primitivos siguen proliferando y se introducen profundamente en la médula gonadal para formar los testículos o cordones medulares. Hacia el hilio de la gónada los cordones se disgregan en una red de diminutos filamentos celulares que darán origen a los túbulos de la red de Haller o *rete testis*. Al continuar el desarrollo de los cordones testiculares pierden su contacto con el epitelio superficial y se separan de él por

medio de una capa compacta de tejido conectivo fibroso, la túnica albugínea, que es característica del testículo (Langman, 1976).

Los cordones testiculares adquieren forma de herradura y sus extremos se continúan con los de la red de Haller, los cordones testiculares están formados en este momento por células germinales primitivas y por células sustentaculares de Sertoli derivadas del epitelio superficial de la gónada. Las células intersticiales de Leydig se desarrollan a partir del mesénquima original de la cresta gonadal. Se encuentran entre los cordones espermáticos y comienzan a desarrollarse poco después de iniciada la diferenciación de estos cordones. Las células de Leydig comienzan a producir testosterona y en esta etapa el testículo puede influir sobre la diferenciación sexual de los conductos genitales y de los genitales externos (Langman, 1976).

Los cordones se mantienen macizos hasta la pubertad, entonces se canalizan y dan origen a los túbulos seminíferos los que se unen a la red de Haller, los cuales a su vez penetran en los conductillos eferentes. Estos conductillos eferentes son las porciones restantes de los túbulos excretores del sistema mesonéfrico y conectan la red testicular con el conducto epididimario, que formando multitud de sinusoides se continúa en el conducto deferente, el conducto epididimario mide de 3 a 4 metros de longitud. Los conductillos eferentes, los conos y el segmento inicial del conducto epididimario forman la cabeza del epidídimo (Langman, 1976).

2.- ANATOMIA GENERAL

Los testículos son glándulas masculinas exocrinas y endocrinas combinados, de forma ovoide y volumen muy variable que presentan cambios de tamaño con la edad (Quiroz, 1981) (Fig. 1.) La porción exocrina es una glándula tubular espiral compuesta que produce células, los espermatozoides, como producto de secreción. La porción endocrina está representada por las células intersticiales de Leydig y las células sustentaculares de Sertoli (Banks, 1986).

Los testículos se sitúan en la cavidad escrotal dentro de una bolsa especializada de la piel, el escroto, donde se fijan mediante diversas estructuras que forman el cordón espermático. Tanto los testículos como el cordón espermático se hallan cubiertos por distintas capas de tejidos que se forman como resultado del descenso de la gónada masculina, desde su posición original en la región retroperitoneal hasta el escroto (Junqueira, 1983).

La primera capa o piel escrotal es delgada y de color oscuro, con aspecto estriado, contiene una abundante cantidad de glándulas sebáceas y de glándulas sudoríparas y una escasa cantidad de folículos pilosos; también se observa la presencia de un rafe medio que corresponde al septo escrotal. Por debajo del epitelio escrotal, e íntimamente unido a él, se encuentra una fina capa de tejido fibroso muy vascularizado, que contiene fibras elásticas y fibras musculares lisas. Esta capa recibe el nombre de dartos escrotal, el tejido conectivo de esta capa se extiende hacia adentro para formar un septo que divide la cavidad escrotal en dos compartimentos independientes, uno para cada testículo.

Por debajo del dartos, y separada de él por una capa de tejido areolar laxo, se encuentra la fascia espermática externa, y debajo de esta la fascia

cremastérica, formada por una doble capa de tejido areolar y elástico que incluye una fina capa de músculo estriado, ocasionalmente contiene algunas fibras procedentes del músculo abdominal transverso. Es precisamente la fascia cremastérica la que permite la retracción normal de los testículos, protegiéndolos de los traumas externos y de ciertos estímulos, como el frío. Esta movilidad es importante para el control térmico adecuado, permitiendo así que los testículos mantengan la temperatura ideal para la espermatogénesis (Netter, 1988).

Existen porciones anteriores y posteriores del peritoneo que forman dos capas que recubren el testículo durante su descenso. La porción peritoneal posterior forma la túnica vaginal visceral (lámina visceral) alrededor del testículo donde se adhiere a la túnica albugínea del testículo, la túnica vaginal externa o lámina parietal procede del peritoneo del abdomen anterior y se adhiere a la fascia espermática. Ambas son membranas serosas típicas, pero el tejido conjuntivo areolar de la túnica vaginal visceral se mezcla de manera insensible con el tejido conjuntivo de la túnica albugínea (Weiss, 1986; Álvarez, 1988).

Los testículos están rodeados por una gruesa cápsula o túnica fibrosa compuesta de tejido conjuntivo fibroso llamado albugínea y que se continúa con el mediastino testicular. Extendidos desde la superficie interna de la cápsula del mediastino hay una serie de trabeculas fibrosas que dividen el interior del órgano en pequeños lóbulos (Testut y Lataryet, 1992).

Dentro de cada lóbulo testicular existen numerosas células intersticiales, células de Leydig y de 1 a 3 túbulos seminíferos en los que se distinguen dos partes, la contorneada y la recta. Son los túbulos seminíferos contorneados y los túbulos seminíferos rectos. Los primeros se continúan y al acercarse al mediastino

testicular se unen unos a otros y dentro del mediastino testicular se transforman en tubos rectos y cortos y estos se abren para formar la red testicular (Lesson, 1990).

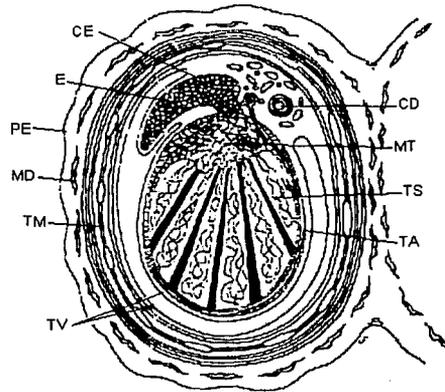


Figura 1. Esquema de un corte transversal de testículo maduro con los diferentes tejidos que lo envuelven: CE, conductillos eferentes; E, epidídimo; PE, piel del escroto; MD, músculo dartos; TM, túnica muscular; TV, túnica vaginal; CD, conducto deferente; MT, mediastino testicular; TS, túbulos seminíferos; TA, túnica albugínea (Tomado de Brady, 1978).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.- HISTOLOGÍA DEL TESTÍCULO

3.1.- EPITELIO SEMINÍFERO

Como se muestra en la figura 2. Los túbulos seminíferos están revestidos por una capa basal de tejido conectivo que contiene fibras elásticas y células epiteliales aplanadas (mioideas). Sobre esta capa se dispone el epitelio germinal o seminífero. Este epitelio está compuesto de dos clases de células en el puber; las células sustentaculares o de Sertoli y las células germinales en diferentes fases de su desarrollo (Austin y Short, 1982; Netter, 1988).

Los procesos citoplásmicos de las células de Sertoli envuelven a las células germinales y forman la barrera hematotesticular. Esta se localiza en todas las especies y esta constituida por los complejos de unión entre las células de Sertoli (Dym y Fawcett, 1970; Nicander, 1976). Estos complejos están especialmente localizados en la porción basal de las células de Sertoli y dividen al epitelio seminífero de los mamíferos en dos compartimentos, el basal y el adluminal. El compartimento basal contiene a las espermatogonias y espermatocitos primarios (preleptoteno en la rata) (Connell, 1974; Rusell, 1978) y el compartimento adluminal, contiene a los espermatocitos más avanzados y espermátidas (Fawcett, 1975). Los espermatocitos en leptoteno y zigoteno residen durante su migración hacia el compartimento adluminal, el compartimento intermedio, delineado por uniones especializadas situadas por arriba y debajo de estas células. Las sustancias originadas fuera de los túbulos seminíferos utilizan la vía del espacio intercelular para tener acceso directo al compartimento basal del tubo seminífero. El acceso hacia las otras capas es evitado por uniones entre las células de Sertoli y de esta forma se aíslan las células en meiosis y espermátidas. Esto indica que la

barrera hematotesticular es crucial para el desarrollo de la espermatogénesis (Jegou, 1992).

El tejido conectivo intertubular contiene grupos de células poligonales de gran tamaño (células intersticiales de Leydig), con núcleos excéntricos, esféricos y de gran tamaño, El citoplasma de las células de Leydig contiene numerosos gránulos y vesículas que contienen lípidos.

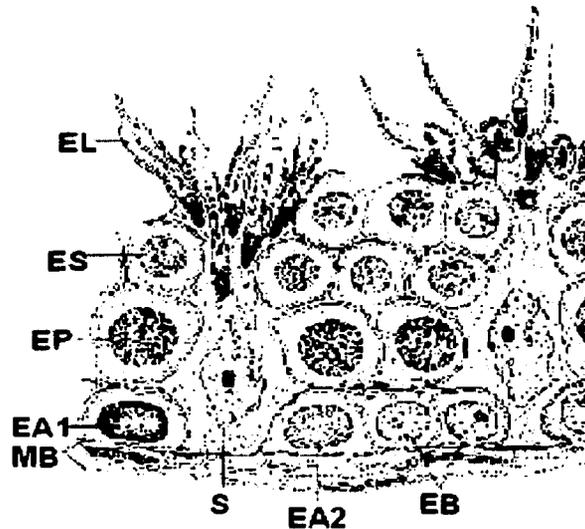


Figura 2. Esquematación del epitelio seminífero donde se puede observar la relación entre las células de Sertoli y las células germinales, la compartimentalización basal y adluminal de este epitelio: MB, membrana basal; S, célula de Sertoli; EA1, espermatogonia tipo A1; EA2, espermatogonia tipo A2; EB, espermatogonia tipo B; EP, espermatocito primario; ES, espermatocito secundario; EL, espermátida larga (Tomado de Gilbert, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.- ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un elaborado proceso de diferenciación celular, que se desarrolla en las paredes de los túbulos seminíferos, en donde la espermatogonia escasamente diferenciada, inicia un proceso de multiplicación en serie, que finaliza con la formación del espermatozoide, célula móvil altamente especializada y totalmente diferenciada (Lesson, 1990). La duración de la espermatogénesis en los mamíferos es de varias semanas y se divide para su estudio en tres fases principales, comunes al conjunto de especies, y caracterizada cada una por el tipo morfológico de células germinales. La primera esta relacionada con la multiplicación mitótica y la maduración de las espermatogonias, la segunda se refiere a la meiosis, y la tercera, llamada espermiogénesis, abarca la transformación de las espermatidas en espermatozoides. Las diferentes fases celulares de la espermatogénesis se distribuyen de la periferia al centro de los túbulos seminíferos dependiendo de su edad (Clermont, 1972; Austin y Short, 1982).

La fase inicial de la espermatogénesis es la multiplicación mitótica de las espermatogonias (célula germinal troncal, que deriva directamente de los gonocitos fetales, localizada en la base del epitelio seminífero). Como resultado de la multiplicación mitótica la espermatogonia forma una población de células madres. Durante este periodo aparecen paulatinamente todos los tipos de espermatogonias adultas (A1, A2, A3, A4, In, B). La espermatogonia B se divide para diferenciarse en espermatocito de primer orden (Clermont, 1972; Weiss, 1986).

La multiplicación de los espermatoцитos protagoniza la segunda fase de la espermatogénesis. Dos divisiones meióticas o reduccionales se suceden para producir la espermátida, durante la larga profase que precede a la primera de estas divisiones reduccionales, los espermatoцитos primarios duplican su dotación cromosómica y recombinan la información genética. Los dos espermatoцитos secundarios que constituyen a la progenie de cada una de las células anteriores afronta la segunda división reduccional, de la que surgen finalmente dos nuevas células, la espermátida, con la característica dotación cromosómica haploide (Leonhardt, 1977).

En la tercera y última fase del proceso llamada espermiogénesis, la espermátida no se divide, tan sólo sufre una profunda transformación morfológica para diferenciarse en espermatozoide, los espectaculares cambios se suceden en cuatro etapas características, a lo largo de las cuales se forma el acrosoma, el flagelo y los organelos implicadas en el reconocimiento celular. Finaliza la génesis del espermatozoide, este abandonará el testículo como célula móvil en potencia, a la espera de que el tránsito del epidídimo le confiera las primeras modificaciones estructurales necesarias para adquirir la capacidad fecundante (Banks, 1986).

ESPERMATOGONIAS

Las espermatogonias están localizadas en el compartimento basal del epitelio seminífero, separadas del compartimento adluminal por uniones estrechas entre las células de Sertoli contiguas (Clermont, 1972; Jiménez, 1978; Parvinen y cols., 1986). Las espermatogonias se clasifican en tres tipos de acuerdo a la disposición de la cromatina; como tipo A, aquella con cromatina en grumos

pequeños; tipo B con cromatina en costras y una intermedia entre ambas (Regaud, 1901; Clermont, 1972). Las células que se multiplican mitóticamente y proveen de células madre para la espermatogénesis es la llamada tipo A. La quinta generación, da lugar a la espermatogonia intermedia (In) y la división de ésta origina la espermatogonia B, la cual es la encargada de comenzar la meiosis (Clermont, 1972).

ESPERMATOCITOS

Los espermatoцитos primarios son producidos por la división mitótica de las espermatogonias tipo B. Replican su DNA poco después de su formación, por lo que cada espermatoцитo primario contiene la cantidad $4n$ de DNA antes de que inicie la meiosis (Ross y Romrell, 1998). Durante la etapa de espermatoцитo en preleptoteno, este pierde su contacto con la lámina basal, a través de su penetración en los procesos de las células de Sertoli, hacia la parte central del epitelio seminífero y se agrandan. El estado de espermatoцитo en leptoteno presenta cromosomas filamentosos y las uniones estrechas entre las células de Sertoli se localizan por arriba y abajo de los espermatoцитos en este estado (Clermont, 1972; Austin y Short, 1982).

Durante la etapa de zigoteno, la célula se localiza ya en el compartimento adluminal, en este estado los cromosomas homólogos se aparean y conectan por el complejo sinaptonémico. En paquiteno el apareo de cromosomas se completa y pueden evidenciarse los complejos sinaptonémicos, los espermatoцитos pasan por un corto período de diploteno dando origen a espermatoцитos secundarios, estos

continúan con la meiosis II para la reducción del número cromosómico y dan lugar a cuatro espermátidas haploides (Clermont, 1972; Parvinen y cols., 1986).

ESPERMÁTIDAS

Las células que se forman en la segunda división meiótica son las espermátidas, cada espermátida es haploide por su contenido de DNA y su número de cromosomas (22 autosomas y un cromosoma X o Y). Estas células atraviesan por una serie sucesiva de eventos durante los cuales transforman su núcleo, condensan la cromatina y desarrollan estructuras especiales tales como el acrosoma, la capucha y el flagelo. A este proceso se le denomina espermiogénesis (Banks, 1986).

3.3.-ESPERMIOGÉNESIS

La espermiogénesis se divide en cuatro fases para su estudio (Fig. 3.): a) fase de Golgi, b) fase capuchón, c) fase acrosoma, d) fase de maduración. Cada fase de la espermiogénesis se puede subdividir en varias subfases. El número total de subfases para el total desarrollo de las espermátidas varía en las diferentes especies; es de 19 en la rata. Estas fases de la espermiogénesis se producen mientras las espermátidas están unidas físicamente a la membrana plasmática de la célula de Sertoli, mediante uniones especializadas (Leblond y Clermont, 1952; Austin y Short, 1982).

A) FASE GOLGI

Consiste en tres estados para la formación del acrosoma.

El estado 1 es caracterizado por la presencia de una estructura casi esférica, el idiosoma, localizado en el aparato de Golgi. Un fino filamento emerge

de uno de los centriolos en el citoplasma, éste dará origen al futuro tallo del espermatozoide. En el estado 2 uno de los 4 gránulos acrosómicos aparece en el idiosoma. El estado 3 se caracteriza por la fusión de los gránulos proacrosómicos en uno solo.

B) FASE CAPUCHÓN (CAP)

Consiste de 4 estados durante los cuales la capucha crece por fuera del gránulo acrosómico.

En el estado 4 el gránulo acrosómico se pega al núcleo. En el estado 5 una membrana protege por fuera del gránulo acrosómico y se pega sobre la superficie del núcleo. Para el estado 6 la membrana forma una capucha definida y el idiosoma se separa del gránulo acrosómico. Durante el estado 7 la capucha está en su máximo tamaño y uno de los centriolos se adhiere.

C) FASE ACROSOMA

Consiste en 7 estados durante los cuales la capucha y el gránulo acrosómico se orientan hacia la membrana basal del tubo. El gránulo acrosómico se transforma en el acrosoma característico de cada especie.

En el estado 8, el gránulo acrosómico y la capucha se orientan hacia la membrana basal del tubo y el citoplasma se desplaza hacia el polo opuesto del núcleo. En el estado 9 hay un ligero aplanamiento del núcleo y protusión de la región cubierta por la capucha. El gránulo acrosómico se elonga y puede ser referido como el acrosoma, durante el estado 10 la capucha se extiende en la región caudal del núcleo. Para el estado 11 se presenta una mayor elongación del núcleo y la capucha. El estado 12 se presenta cuando el núcleo tiene su máxima longitud. En el estado 13 el núcleo se hace delgado y el citoplasma se condensa a

lo largo del tallo. En el estado 14 el núcleo se hace más pequeño, la capucha se orienta sobre la parte anterior del núcleo, el acrosoma se arregla en una cresta del lado dorsal. El citoplasma se condensa a lo largo del tallo y esto hace que la membrana se fusione con el tubo caudal.

D) FASE DE MADURACIÓN

Consiste de 5 estados, en esta fase las espermátidas son denominadas espermatozoides por su semejanza con la célula madura.

El estado 15 inicia con el comienzo de la fase de maduración, se caracteriza por la aparición de una membrana fina de material en el capuchón a lo largo del borde dorsal de la célula, entre el extremo caudal del acrosoma y el ángulo dorsal del núcleo. En el estado 16 la estructura fina desaparece, mientras que el acrosoma se extiende caudalmente hacia el ángulo dorsal. En el estado 17, el acrosoma y el capuchón son desplazados con relación al núcleo y provocan que en el estado 18 exista una cierta distancia entre el acrosoma y el núcleo. El citoplasma se acomoda pegado al núcleo. Durante el estado 19 el espermatozoide inmaduro se coloca cerca de la luz del epitelio seminífero, como espermatozoide libre, muestra poco cambio en el detalle estructural.

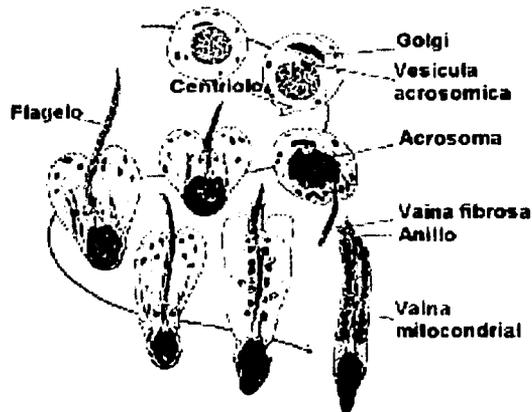


Figura 3. Representación esquemática donde se puede apreciar las distintas fases de desarrollo de la espermiogénesis (Tomado de Gilbert, 2000).

La espermatogénesis en la rata inicia al cuarto día de su nacimiento, con la transformación de gonocitos fetales a espermatogonias tipo A. En la rata se han descrito 6 generaciones sucesivas de espermatogonias, con diferencias morfológicas bastante sutiles A1, A2, A3, A4, In, B. Las espermatogonias tipo A resultan de la división mitótica de las células precursoras. Las divisiones mitóticas dan origen a las células de la siguiente generación. Las espermatogonias B se dividen para dar origen a espermatoцитos primarios, esto ocurre durante el décimo quinto día después del nacimiento de la rata entrando al periodo de preleptoteno de la meiosis (Austin y Short, 1982).

A medida que continúan con la profase de la primera división meiótica, una segunda generación de células precursoras inicia una nueva ronda de multiplicación y diferenciación. Los espermatoцитos secundarios producidos por la

primera división meiótica ingresan de inmediato a la segunda división meiótica originando espermátidas haploides.

En la espermiogénesis la transformación morfológica de las espermátidas se ha dividido en una serie de fases. Los principales criterios empleados para la identificación de las fases consideran los cambios morfológicos del núcleo y del acrosoma. Los primeros espermatozoides en la rata se producen entre el día 45 y el 50 postnatal (Ross y Romrell, 1998).

4.- CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO

La apariencia general de los túbulos seminíferos es característico, debido a que sus células están arregladas y presentan una asociación celular definida, dando lugar a las etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES) (Leblond y Clermont, 1952) (Fig. 4).

El CES está compuesto de dos clases de células en el adulto: las células de soporte o de Sertoli y las células germinales en diferentes fases de su desarrollo, y se define como el intervalo que transcurre entre dos apariciones sucesivas de la misma fase de desarrollo dentro de cada generación celular en cualquier área del túbulo seminífero, y se basa en el desarrollo del sistema acrosómico. Cada una de las etapas del CES se compone de una combinación celular fija con una duración de 13 días en la rata. En la rata Wistar el ciclo espermatogénico dura 48-53 días y dentro de cada ciclo se han descrito catorce etapas que cubren toda la serie de cambios que tienen lugar en un área determinada del epitelio seminífero, que se describirán a continuación (Genis, 1970).

ETAPA I

Comienza con la aparición de un nuevo grupo de espermatidas al final de la segunda división de maduración de los espermatoцитos. Las capas de células presente en túbulos aparecen de la membrana basal hacia el lumen. Los núcleos de las células de Sertoli en esta etapa están generalmente aplanados contra la membrana basal y asociados con espermatogonias tipo A. Algunas de estas espermatogonias pueden ser encontradas en mitosis. Las capas próximas de células, consisten de espermatoцитos en crecimiento, en etapa temprana de paquiteno y espermatidas en fase 15.

ETAPA II

Comienza con la presencia de los gránulos proacrosómicos en el idiosoma de la espermatida joven. Hay pocas espermatogonias tipo A, y varias espermatogonias de tipo intermedio, las cuales se transforman progresivamente en células que parecen espermatogonias de tipo B. Los espermatoцитos primarios muestran un crecimiento lento y progresivo, las espermatidas en estado dos están separadas por grupos de espermatozoides inmaduros en estado 16, su acrosoma se extiende en el ángulo dorsal de su núcleo y el citoplasma se alarga en las células, y la pieza media es claramente visible.

ETAPA III

Inicia con la fusión de los gránulos proacrosómicos en un solo gránulo acrosómico, son pocas las espermatogonias de tipo A y muchas espermatogonias de tipo intermedio, los espermatoцитos continúan su crecimiento, las espermatidas más jóvenes (estado 3) están entremezcladas muchas veces se ordenan en paquetes. Los paquetes de espermatozoides inmaduros durante la etapa III del

ciclo y las siguientes tres (IV, V, VI) están situados en diferentes niveles del epitelio seminífero, pero generalmente la cabeza esta cerca de los núcleos de las células de Sertoli.

ETAPA IV

Comienza con el aplanamiento del gránulo acrosómico en el núcleo de las espermátidas jóvenes, en esta etapa las espermatogonias de tipo intermedio sufren una división mitotica que da origen a las espermatogonias tipo B, con acumulación de cromatina en un sitio de la membrana nuclear. Hay pequeños cambios que se observan en los espermátocitos. Hay espermátidas en estado 4 y 17.

ETAPA V

Comienza con la clara diferenciación de la capucha, la cual a la vista aparece como dos líneas rectas proyectadas lateralmente al gránulo acrosómico. Hay más espermatogonias tipo B que espermatogonias de tipo A. No hay cambios visibles en los espermátocitos, excepto por un alargamiento progresivo. Las espermátidas jóvenes (estado 15) están separadas por paquetes de espermátocitos inmaduros en estado 17.

ETAPA VI

Inicia cuando la capucha crece lo suficiente, sale a la superficie y puede ser vista. Durante esta etapa las espermatogonias de tipo B sufren una división mitótica, dando lugar a la producción de espermátocitos, ambos tipos de células pueden verse entrecruzadas en algunos sitios del túbulo. Las espermátidas jóvenes se encuentran en estado 6 y los espermatozoides inmaduros en estado

18, se encuentran en diferentes niveles del epitelio seminífero; pero principalmente en medio, es decir entre el lumen y la membrana basal

ETAPA VII

Empieza cuando la capucha ha alcanzado su máximo tamaño. En este estado es raro encontrar espermatogonias de tipo A, Al final de esta etapa, la espermatogonia de tipo B se divide y produce una nueva generación de espermatocitos. Los espermatocitos jóvenes pueden verse a lo largo de la membrana basal. Los espermatocitos de la última generación se encuentran en estado paquiteno.

ETAPA VIII

Inicia con la orientación del sistema acrosómico de la espermatida joven (estado 18), hacia la membrana basal. Finalmente los espermatocitos inmaduros en estado 19 se alinean y completan la eliminación de su citoplasma. Los fragmentos del citoplasma se observan cercanos a una masa casi esférica llamada cuerpo residual. Hacia el final de esta etapa, las células en estado 19 son liberadas como espermatozoides libres.

ETAPA IX

Comienza el aplanamiento y la elongación del núcleo de la espermatida (estado 19), lo cual ocurre en el momento o poco después de la liberación de los espermatozoides. Las espermatogonias de tipo A son escasas, pero se dividen en esta etapa. Las espermatidas en estado 9 forman una capa sólida. El cuerpo residual desaparece gradualmente. Hay pocos espermatozoides que pueden permanecer en el lumen durante esta etapa.

ETAPA X

Empieza cuando la parte caudal de la capucha se alarga al ángulo dorsal del núcleo. No encontramos espermatogonias de tipo A a lo largo de la membrana basal. La generación de espermatocitos jóvenes se encuentra en estado de leptoteno. Las espermátidas se separan al inicio por grupos de espermatocitos en crecimiento de la última generación.

ETAPA XI

Se da cuando inicia la diferenciación de las espermátidas. No hay cambios en las espermatogonias y los espermatocitos. Esta etapa se caracteriza por el hecho de que las espermátidas inician la formación de paquetes entre los espermatocitos maduros. Persisten los espermatocitos en leptoteno y paquiteno.

ETAPA XII

Comienza cuando las espermatogonias de tipo A incrementan su número por mitosis en esta etapa. Las espermatogonias están asociadas con una capa de espermatocitos jóvenes. Entre los espermatocitos maduros se definen paquetes alargados de espermátidas. Las espermátidas de estado 11 pasan a estado 12 y alcanzan su longitud máxima. Los espermatocitos viejos pasan a diploteno.

ETAPA XIII

Inicia con el movimiento caudal y el aplanamiento del acrosoma por su parte dorsal. Las espermátidas se presentan en estado 13 y las espermatogonias tipo A se alternan con espermatocitos jóvenes en estado de cigoteno. Los espermatocitos maduros están en diploteno y da inicio la diacinesis.

ETAPA XIV

Comienza con la repentina contracción longitudinal del núcleo de las espermátidas, aproximadamente dos o tres veces su tamaño inicial. Las espermogonias tipo A son vistas a lo largo de la membrana basal. La generación de espermatoцитos jóvenes cambia de cigoteno a paquiteno o transicional. Esta etapa finaliza con la producción de espermatoцитos maduros a partir de la segunda división de las espermátidas y un nuevo ciclo del epitelio seminífero da inicio (Leblond y Clermont, 1952).

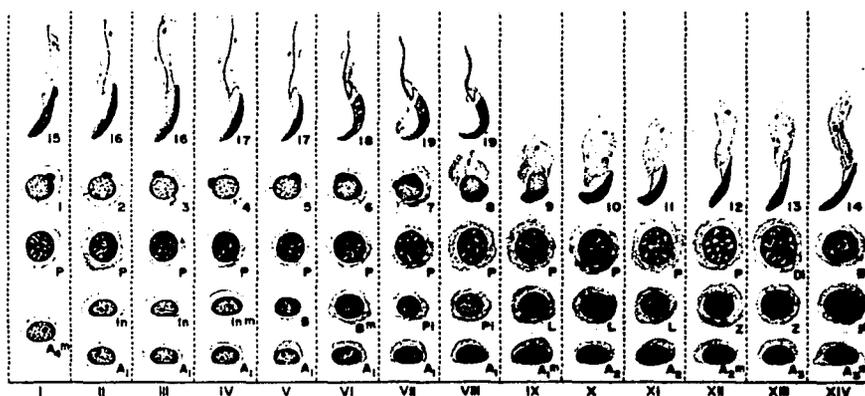


Figura 4. Esquema de las etapas del CES cada columna consta de varios tipos de células que forma una asociación celular o etapa del ciclo (que se identifica con números romanos en la base de la figura). Las diferentes asociaciones celulares se suceden una a otra desde la fase I a la XIV. La sucesión de las catorce asociaciones celulares constituyen el CES: A, In, B: Espermogonias tipo A, intermedias y B; PI, L, C, P, Di: Espermatoцитos primarios durante el periodo de preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diacinesis respectivamente; II espermatoцитos secundarios; 1-19 las fases sucesivas de la espermiogénesis (Tomado de Perey y col., 1961).

5. - FISIOLÓGÍA DEL TESTÍCULO

La gónada masculina llamada testículo se forma a partir de la séptima semana de vida fetal, proviene de la gónada indiferenciada. En esta edad gestacional se inicia su función, produciendo la hormona inhibidora de los conductos de Müller, cuya acción es inducir la involución de estos conductos. A su vez, las células de Leydig, por estimulación de la hormona Gonadotropina Coriónica humana (hCG) y después de la hormona luteinizante (LH) fetal sintetizan testosterona (T), lo que determinara el desarrollo y diferenciación de los conductos de Wolf. Asimismo la testosterona producida en el testículo fetal (tercer trimestre) actuará en el Sistema Nervioso Central, sobre todo en el hipotálamo, determinando el ritmo de liberación de las gonadotropinas hipofisarias (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) que regulan la función testicular, esto es, de manera tónica y pulsátil (Meyer, 1985).

El testículo permanece en reposo desde el tercer trimestre de vida, hasta que se inicia la pubertad desencadenándose la función hipotalámica (Fig. 5). El hipotálamo ocasiona el comienzo de liberación pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por neuronas hipotalámicas, situadas en el área preóptica, núcleo arqueado y región ventro medial, influyendo todos los axones en la eminencia media y vaciando su secreción en el sistema portalhipofisario, llegando a la hipófisis por esta vía y estimulando la síntesis y liberación de las gonadotropinas: LH y FSH que tienen un ritmo de secreción nocturno. Estas hormonas estimulan al testículo para que se inicien sus funciones: a) esteroidogénesis, con predominancia en la producción de andrógenos, que propician la aparición de las características sexuales secundarias, como el

crecimiento y desarrollo del pene y testículos, pigmentación y aparición de rugosidades en el escroto. b) germinal, que inicia la maduración y la multiplicación de las células germinales, ciclo conocido como espermatogénesis (Meyer, 1985).

Las células de Leydig producen la hormona sexual masculina, la testosterona y su función principal es mantener la espermatogénesis y por lo tanto la fertilidad. La actividad de las células de Leydig es mediada por las células de Sertoli, las cuales son importantes por su función secretora. Esta función incluye la producción de fluidos, proteínas, de algunos péptidos y esteroides en los túbulos seminíferos (Sharpe y cols., 1981; Jegou, 1992).

La secreción de fluidos en el túbulo seminífero es una función esencial de las células de Sertoli. Además de nutrir a las células germinales y participar en la liberación de espermatozoides, transforma sustancias químicas hacia la parte basal y apical del epitelio seminífero. Estas sustancias pueden interactuar entre las células de Sertoli y las células germinales y también entre una generación de células germinales y otra, por la vía del espacio intercelular (Jegou, 1992).

La producción bidireccional de los productos secretados por las células de Sertoli son considerados como reguladores parácrinos y endocrinos de la espermatogénesis. En la pubertad la hipófisis libera LH y FSH. Estas dos hormonas pituitarias son de gran importancia en la regulación de las células de Sertoli ya que la FSH se une a receptores específicos de estas células, y la LH estimula a las células intersticiales de Leydig a producir testosterona (Jegou, 1992; Lesli y James, 1995).

La testosterona y la FSH ambas son capaces de estimular la formación de proteínas fijadoras de andrógenos (ABP) a través de las células de Sertoli en el ser humano y en ratas. La sensibilidad de la secreción de ABP como de los fluidos en túbulos seminíferos, la secreción de FSH y testosterona varían con la edad. La testosterona se une al ABP y el complejo es liberado en la luz del los túbulos seminíferos, donde la concentración elevada de testosterona aumenta el proceso de espermatogénesis (Lesli y James, 1995).

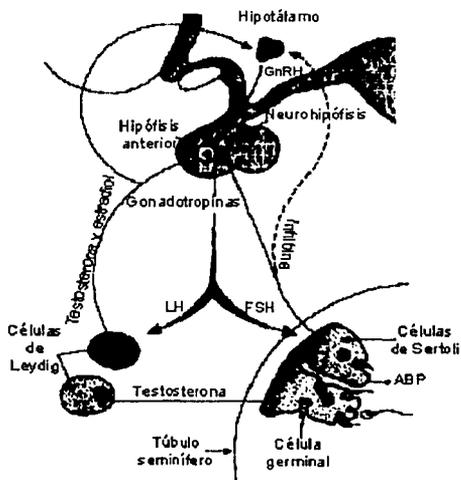


Figura 5. Relación funcional del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La secreción de FSH es regulada directamente por hormonas sexuales (testosterona y estradiol), inhibina y el péptido hipotalámico GnRH (Dominguez, 1991).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.- ANTECEDENTES

1.-GENERALIDADES DE LA CRIPTORQUIDIA

Etimológicamente el término criptorquidia significa "testículo oculto" lo que implícitamente hace referencia a la ausencia de testículo en el escroto, y estando ubicado en algún punto de su trayecto normal de descenso (Pomerol y Arrondo, 1994). Tiene una incidencia del 30% en niños prematuros y 1 % en recién nacidos, y disminuye al 0.8% al año de edad, por lo que después del primer año de edad la posibilidad de que ocurra un descenso espontáneo disminuye (Husmann y Levy, 1995).

La edad en la cual aparecen las primeras lesiones en el ser humano es a partir de los 2 años, y se acentúan con la edad teniendo como consecuencia repercusiones sobre la fertilidad en el adulto (Hutson y cols., 1997).

Las principales alteraciones histológicas del testículo criptorquídico son: disminución del diámetro de los túbulos seminíferos, disminución del número de espermatogonias, esclerosis peritubular y aumento de fibras de colágena, así como alteraciones ultraestructurales de las mitocondrias en las células germinales y engrosamiento de la membrana basal de los túbulos seminíferos (Scorery y Farrington, 1971).

El testículo criptorquídico se puede clasificar con base en su posición como: abdominal, canalicular y ectópico.

El testículo abdominal es impalpable y se localiza próximo al anillo inguinal interno. El testículo canalicular, se ubica en el canal inguinal, entre el anillo inguinal interno y externo. El testículo ectópico, en el 80% de los casos, es unilateral y presenta tamaño y funciones normales, desciende normalmente por el

canal inguinal y emerge a través del anillo inguinal externo para dirigirse desde allí a un punto fuera de su trayecto fisiológico en el área inguinal (Elder, 1988).

Entre los riesgos de la criptorquidia está la aparición de tumores y la infertilidad producida por una espermatogénesis alterada. Con frecuencia se cita una insuficiente producción de andrógenos como una de las causas de testículos no descendidos.

En la criptorquidia unilateral los testículos contralaterales (escrotados) muestran patrones histológicos muy variables, desde una espermatogénesis completa en la edad adulta, hasta hipoplasia germinal (desarrollo insuficiente de las células germinales) marcada o grave. Aproximadamente en el 25% de los casos el testículo contralateral escrotal presenta las mismas alteraciones histológicas que el criptorquídico.

2.- MECANISMOS DE DESCENSO TESTICULAR

En el ser humano en gestación, los testículos se desarrollan en la cavidad abdominal y durante el último trimestre migran al escroto. La regla general es que los testículos desciendan espontáneamente al escroto, manteniéndose en esta posición durante toda la vida.

El descenso de los testículos al escroto es un evento complejo, multifactorial e influenciado por factores hormonales y anatómicos, que involucran el desarrollo del gubernáculo, el proceso vaginal, el canal inguinal, los vasos espermáticos y el escroto (Heyns y Hutson, 1995).

Hutson y Donahoe (1986) han propuesto que el descenso testicular del abdomen al escroto se presenta en dos fases: la fase transabdominal y la

transinguinal. En el descenso transabdominal, el testículo se desplaza del abdomen hacia la zona inguinal, ocurre entre la semana 12 y la 16 de la gestación en el humano, y en la rata se presenta al día 15.5 de la gestación, en esta fase se presenta un incremento gubernacular y la regresión del ligamento suspensor craneal, y es independiente de la acción de los andrógenos. La sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS) producida por las células de Sertoli, ha sido propuesta como la responsable de este crecimiento, sin embargo, esto no ha sido completamente corroborado. Recientemente se ha involucrado, en este proceso al factor asociado a la insulina 3 (INSL3), también conocido como factor RLF, que se expresa altamente en las células de Leydig. Nef y Parada (1999) en un estudio realizado en ratones con ausencia del factor INSL3 revelaron el papel de dicho factor en el desarrollo del tracto urogenital, actuando como una hormona que regula el crecimiento y diferenciación del gubernáculo, lo cual indudablemente, influye en el descenso transabdominal.

La fase transinguinal implica la migración del testículo hacia el escroto, este estado es llevado por el desarrollo del proceso vaginal y la contracción gubernacular dependiendo de la acción de los andrógenos y la participación del nervio genitofemoral (NGF) que inerva al gubernáculo. En la rata el descenso transinguinal ocurre después del nacimiento y concluye al día 21 de edad. En el humano este evento se presenta entre la semana 26 y 40 de la gestación (Shono y cols., 1994)

En esta última fase se ha propuesto que el NGF y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), liberado desde las terminaciones nerviosas del NGF tiene un papel importante en la contracción gubernacular.

Experimentalmente se ha demostrado la existencia de receptores para el CGRP en el gubernáculo de la rata neonata (Yamanaka y cols., 1993) y estudios *in vitro* han demostrado que este péptido incrementa la contracción del mismo (Hutson y cols., 1990; Momose y cols., 1992).

3.- PATOLOGIAS ASOCIADAS A LA CRIPTORQUIDIA

Considerando que el descenso testicular depende de complejas interacciones endocrinas y mecánicas, un defecto estructural en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo puede inducir criptorquidia (Elder, 1987).

Existen una variedad de síndromes caracterizados por defectos en la producción de gonadotropinas, en la síntesis de andrógenos o en la acción androgénica, en el cual el criptorquidismo es común. Por ejemplo, la deficiencia congénita de GnRH se identifica en la entidad clínica denominada síndrome de Hipogonadotropismo aislado de Kallman. Estudios embriológicos recientes señalan que la asociación de agenesia olfatoria o anosmia con deficiencia de GnRH, se puede explicar debido a la falla de la migración de las neuronas que producen GnRH, desde su origen rostral en la plácoda nasal del embrión hacia el hipotálamo. En el desarrollo embrionario temprano, la pequeña población de neuronas que secretan GnRH migran caudalmente del septum nasal y se distribuyen en el hipotálamo, la interferencia con esta migración normal y/o la disminución en el número de las neuronas que secretan GnRH en la plácoda nasal, permiten explicarnos las deficiencias simultáneas en la secreción de GnRH y olfatorias observadas en el síndrome de Kallman y teniendo como consecuencia criptorquidia (Elder, 1987).

Una deficiencia de la enzima 5α reductasa consiste en un pseudohermafroditismo masculino producido por la falta de esta enzima. La testosterona es una prohormona que se transforma en dihidrotestosterona (DHT) gracias a dicha enzima. Esta DHT, unida a un receptor proteínico penetra en el núcleo de la célula, donde se ejerce la acción hormonal, la falla de la enzima da lugar a un déficit de masculinización de los genitales y por consiguiente a un pseudohermafroditismo teniendo como consecuencia final la criptorquidia (Meyer, 1995).

Por otro lado, un testículo no descendido puede ser ocasionado por una anomalía estructural, como en el caso del síndrome de Prune-belly (Eagle-Barrett) en donde los pacientes no presentan musculatura abdominal, no presentan gubernáculo, presentan anomalía en el epidídimo, cuando la unión del gubernáculo es deficiente con el epidídimo y en consecuencia el descenso testicular no se lleva a cabo (Elder, 1988).

4.- ETIOLOGÍA

La etiología de la criptorquidia como enfermedad es multifactorial. Probablemente no existe un solo factor etiológico, sino que son varias las causas que pueden producir una detención en la migración testicular como:

1. Altos niveles de estradiol en etapas tempranas de gestación provocan criptorquidismo unilateral o bilateral, el estradiol ocasiona disminución significativa de testosterona y atrofia de las células de Leydig a causa del deterioro de la secreción de gonadotropinas (Hadziselimovic, 1983).

2. Disfunción hormonal constituido por distintos síndromes entre los más significativos se encuentran el de Kallman (déficit gonadotrófico), Aplasia, síndrome de Reifenstein (deficiencia a nivel de receptores hormonales), síndrome de Feminización testicular (fracaso a nivel de los receptores hormonales) (Pomerol y Arrondo, 1994).

3. Disfunción mecánica causada por la existencia de un obstáculo mecánico que se opone a la migración testicular como son anomalías de implantación del gubernáculo, inexistencia del orificio inguinal externo, diafragmas a nivel del conducto inguinal o asociación con hernia inguinal (Pomerol y Arrondo, 1994).

4. Daños al nervio genitofemoral (NGF), ya que la lesión al nervio previene la contracción gubernacular, teniendo como consecuencia criptorquidia (Beasley y Hutson, 1987; Hutson y cols., 1995).

5.- TRATAMIENTO

QUIRÚRGICO

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que el testículo retenido en posición abdominal experimenta regresión progresiva, aparentemente morfológica. Esto sugiere que la corrección quirúrgica a temprana edad puede ser benéfica para la fertilidad. Una de las principales causas de la degeneración del epitelio seminífero es la elevada temperatura en la región abdominal, comparada con la región del escroto, ya que las células germinales son muy sensibles al incremento de la temperatura (Zhou y cols., 1993). La terapia quirúrgica, independientemente de la técnica, pretende lo siguiente: la identificación del testículo y liberación del mismo, así como la escrotalización. Todo ello precisa de

cuidados de las estructuras, evitar tracciones o pinzamientos de los elementos del cordón espermático, y realización de maniobras precisas para conseguir longitudes suficientes del cordón, de tal manera que permitan una posición testicular en el escroto sin tensión.

Los principios básicos de la orquidopexia tradicional (fijación testicular quirúrgica) incluyen, la identificación de la gónada, su movilización, el disecar el cordón, la separación del proceso vaginalis, colocar el testículo dentro del escroto, reparar hernias futuras, reducir la incidencia de traumas, además de reducir la probabilidad de torsión testicular, así como producir beneficios psicológicos y anatómicos, prevenir tumor y cáncer testicular y lo más importante, incrementar la fertilidad (Rozanski y Bloom, 1995; Shono y cols., 1994).

Numerosos estudios sugieren que la corrección quirúrgica a temprana edad en el ser humano previene la degeneración del testículo. En humanos la degeneración de las células germinales se inicia entre los 6 a los 12 meses de edad. A los primeros años de edad se han detectado mediante estudios de microscopia electrónica (ME) cambios morfológicos. Basándose en estudios de microscopia de luz se han encontrado los primeros signos de degeneración a los 3 y 4 años de edad. Los signos evidentes para el clínico se detectan a los 5 a 7 años de edad, por consiguiente la orquidopexia en humanos ha sido recomendada a la edad de 6 a 18 meses y de esta manera se puede prevenir la muerte celular (Hutson y cols., 1997).

HORMONAL

Una causa principal de la criptorquidia, es la alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (80% de los casos), por lo que se ha propuesto la terapia hormonal. Esta terapia ha sido abordada en los últimos 25 a 30 años, tanto para inducir el descenso testicular como para crear las condiciones óptimas (desarrollo de bolsa escrotal, elongación del cordón espermático etc.) e inducir posteriormente el descenso quirúrgico. El empleo de hormonas hoy en día, es aún controvertido.

El tratamiento hormonal para la criptorquidia fue introducido desde 1930, y desde hace varias décadas se ha empleado en Europa. La primera hormona empleada fue la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) (Schapiro, 1930). La hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) (De Rosa y cols., 1987; Happ y cols., 1978; Hadziselimovic y cols., 1987), y las terapias hormonales combinando hCG y LHRH (De Rosa y cols., 1987; Frick y cols., 1980; Hadziselimovic y cols., 1982). El principal objetivo de la terapia hormonal independientemente de promover el descenso testicular, busca restaurar un ambiente endocrino normal, el cual promueva la cascada de eventos que tienden a la maduración de las células germinales (Cinti y cols., 1988; Lala y cols., 1993); con la posibilidad de mejorar el potencial de fertilidad futura.

La hCG, es una hormona estrictamente femenina de origen placentario, su aplicación se basa, en su acción biológica muy parecida a la LH, ha sido empleada para estimular a las células de Leydig para producir testosterona y activar la espermatogénesis y posiblemente inducir el descenso testicular. La tasa de éxito al emplear a la hCG se reporta del 10-65% (Urban y cols., 1987).

La LHRH actúa directamente, estimulando a la hipófisis a producir y liberar tanto LH como FSH. La LH, promueve la maduración y secreción de las células de Leydig juveniles, resultando en una mayor población de células. Mientras que la FSH actúa indirectamente en las célula de Leydig ejerciendo un efecto estimulador para producir mayor cantidad de receptores a la LH. Por otro lado la FSH actúa sobre las células de Sertoli para que produzcan los agentes parácrinos necesarios para mantener la espermatogénesis (Jegou y cols., 1982).

Actualmente se ha puesto en duda el efecto benéfico de la terapia hormonal con hCG debido a que puede causar reacciones adversas en el testículo adulto, como inflamación leucocitaria, disrupción focal de la espermatogénesis y picnosis de las espermátida, aunado al daño focal de las células germinales e incremento en el volumen testicular. Se han registrado cambios patológicos alrededor de los túbulos seminíferos, así como hipertrofia e hiperplasia de las células de Leydig desencadenando una deficiencia en la producción de testosterona, la cual es de suma importancia para el desarrollo y mantenimiento de la línea germinal (Forest, 1984; Hubtaniemi y cols., 1984).

Algunos autores coinciden en que el tratamiento hormonal con hCG provoca daños irreversibles al epitelio seminífero. Dunkel y cols., (1997) ha reportado en un estudio realizado en adultos que durante la infancia presentaron criptorquidia y fueron tratados con hCG, muerte celular por apoptosis. Los altos niveles de apoptosis de las células germinales se correlacionan con una disminución en el volumen testicular y con altos niveles de FSH.

Bergada (1979) y Lackgren (1983) han demostrado que el tratamiento con hCG en niños con criptorquidia ha tenido como resultado desarrollo de las células

de Leydig y testículos en posición escrotal, aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos y estimulación en fase de meiosis de la espermatogénesis. Contrariamente a lo registrado por Bergh y col., (1987), quienes han reportado que el tratamiento con hCG en ratas adultas produce reacción inflamatoria (acumulación y migración intravascular de leucocitos e incremento de macromoléculas) de los túbulos seminíferos.

Hjertkvist y cols., (1988) realizaron un estudio de criptorquidia experimental en ratas adultas y demostraron que la permeabilidad vascular del testículo se encontraba extremadamente alta y que la presión intratesticular aumenta considerablemente después de la aplicación de hCG repercutiendo gravemente en el desarrollo de la espermatogénesis.

III.- JUSTIFICACIÓN

La hCG y la LHRH han sido empleadas en niños con criptorquidia. Sin embargo, la hCG ha demostrado que afecta la fertilidad, contrario a lo registrado para la LHRH. Por lo tanto es importante determinar el grado de fertilidad y los cambios histológicos del testículo por la aplicación de ambas hormonas en un modelo de criptorquidia inducida quirúrgicamente con posterior orquidopexia.

IV.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comparar la fertilidad y la histología testicular en ratas con criptorquidia experimental tratadas con hCG y LHRH.

OBJETIVOS PARTICULARES

I.- Determinar en ratas con criptorquidia quirúrgica unilateral y bilateral tratadas con hCG y LHRH con posterior orquidopexia:

- a) La fertilidad
- b) La población de células germinales y de células de Sertoli en los tubos seminíferos
- c) El área del epitelio seminífero.

II.- Comparar los resultados de fertilidad e histológicos entre ambos tratamientos

V.- HIPÓTESIS

Si la hCG administrada a niños con criptorquidia induce alteraciones sobre la fertilidad y morfología testicular, y no se tienen antecedentes de efectos adversos con el uso de la LHRH, entonces al comparar la administración de ambas hormonas a ratas con criptorquidia experimental la hCG producirá más alteraciones en la fertilidad e histología testicular comparada con la LHRH.

VI.- MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar de 10 días de edad, provenientes del Bioterio de la Torre de Investigación "Dr. Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría, donde fueron mantenidas en un ambiente convencional con alimento y agua a libre demanda.

Los animales fueron distribuidos para su estudio en grupos de 5 organismos cada uno de la siguiente forma:

Grupo 1: Control Sano con administración de hCG (CS-hCG)

Grupo 2: Control Sano con administración de LHRH (CS-LHRH)

Grupo 3: Criptorquidicos Bilaterales con administración de hCG (CB-hCG)

Grupo 4: Criptorquidicos Bilaterales con administración de LHRH (CB-LHRH)

Grupo 5: Criptorquidicos Unilaterales con administración de hCG (CU-hCG)

Grupo 6: Criptorquidicos Unilaterales con administración de LHRH (CU-LHRH)

1.- INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA PARA INDUCIR CRIPTORQUIDIA

Los grupos 3 a 6 se manipularon quirúrgicamente bajo anestesia disociativa empleando hidrocloreuro de xilaxina (45mg/kg) y ketamina (35mg/kg).

La técnica quirúrgica empleada para inducir criptorquidia unilateral y bilateral fue la descrita por (Shono y cols., 1994) y consistió en la exposición extrabdominal del gubernáculo a través de una pequeña incisión inguinal transversal, fijándolo a la fascia de la ingle con sutura nylon 7-0. Durante el procedimiento quirúrgico la cavidad abdominal no fue expuesta y el testículo permaneció intacto a modo de evitarle un posible daño.

Cabe mencionar que el gubernáculo del testículo contralateral de los animales con criptorquidia unilateral permaneció intacto.

2.- TRATAMIENTO HORMONAL

A los grupos 1,3 y 5 se les administro, vía intramuscular, 50UI/kg/día de hCG (Gonakor, Laboratorios Sanfer), la cual fue disuelta en agua destilada. A los animales del grupo 2,4 y 6 se les aplicó 0.1 mg/kg cada 12 horas, vía intraperitoneal de LHRH (Laboratorios Sigma).

Ambos tratamientos se administraron a partir del día 16 de edad y durante 15 días. Se efectuaron registros diarios del desarrollo de la bolsa escrotal y descenso testicular.

3.- TÉCNICA DE ORQUIDOPEXIA

A los 45 días de edad los animales criptorquídicos unilaterales y bilaterales fueron sometidos al procesamiento quirúrgico de orquidopexia. Bajo anestesia se

realizó, previa asepsia y antisepsia de la pared abdominal, una incisión inguinal inferior de aproximadamente 3cm en piel y tejido celular subcutáneo. Se identificó el testículo criptorquídico dentro de la cavidad abdominal, se colocó un punto de sutura con nylon 7-0 en el polo inferior del testículo tomando solo la túnica vaginalis, fijándolo con la misma sutura al tejido intertegumentario, músculo cremaster y fascia del escroto de cada lado.

Una vez corroborada la permanencia del testículo dentro de la bolsa del escroto se procedió a cerrar la cavidad abdominal en un plano con nylon 7-0.

4.- EVALUACIÓN DE FERTILIDAD

La capacidad fértil de cada macho se determinó a los 90 y 180 días de edad. Las unidades reproductivas se formaron colocando a cada macho de los diferentes grupos experimentales con 2 hembras en edad fértil, por un periodo de 15 días en un ambiente adecuado. Se registraron diariamente por las mañanas presencia o ausencia de espermatozoides en la vagina de la hembra mediante frotis vaginal.

Se consideraron como fértiles a aquellos machos que dejaron preñadas a las hembras las cuales concluyeron el periodo de gestación con crios sanos.

5.- PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Los animales se sacrificaron a los 190 días de edad en forma humanitaria, empleando una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. De cada grupo experimental se obtuvieron ambos testículos los cuales se pesaron en una balanza analítica y posteriormente se profundieron a través de la arteria

espermática con fijador de Karnovsky modificado (Karnovski, 1965). Finalmente se inicio su procesamiento para su inclusión en EPON (Ver apéndice A).

6.- EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

A los testículos, de cada grupo experimental, se les realizaron cortes transversales de 1 μ de grosor mediante el empleo de un ultramicrotomo (UCT), los cuales se tiñeron por flotación con azul de toluidina al 0.5% montándolos en portaobjetos para su estudio.

El análisis histológico fue realizado por un solo observador auxiliándose del microscopio óptico. Por cada animal se observaron de 35-40 secciones transversales de tubos seminíferos, y se analizaron un total de 125-130 tubos por grupo experimental. Para el análisis histológico se consideraron las etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES) y se observaron cualitativamente lo siguiente: la presencia de vacuolas intracelulares, el plegamiento de la membrana basal, desprendimiento del epitelio seminífero, presencia de células germinales en picnosis, necrosis o multinucleadas.

La determinación del área del epitelio seminífero se realizó mediante un sistema analizador de imágenes (Metamorph), evaluando únicamente cortes transversales de los túbulos.

Se realizó un conteo histológico de los elementos celulares del epitelio seminífero (espermatogonias, espermatocitos, espermatidas redondas y elongadas y células de Sertoli). Los resultados fueron analizados mediante la

prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Duncan considerándose una $p < 0.05$ como diferencia significativa.

El grado de maduración del epitelio seminífero se analizó empleando el índice de Johnsen (1970) (indicado en el apéndice B) en las etapas I a VIII del CES, debido a que este índice requiere para su análisis la presencia de dos generaciones de espermatidas.

VII.- RESULTADOS

1.- Macroscópicos

Los resultados macroscópicos demostraron diferencia entre los distintos grupos experimentales.

Los grupos Control Sano-hCG (CS-hCG) y Control Sano-LHRH (CS-LHRH) mostraron características de organismos sanos, con un marcado desarrollo de la bolsa del escroto, así como completo descenso de los testículos. El grupo Criptorquídico Bilateral-hCG (CB-hCG) fue el más afectado, ya que 4 de 5 animales mostraron severas adherencias postquirúrgicas, que inclusive impidieron aislar el órgano de 2 animales. Estos 5 animales de este último grupo mostraron disminución en el peso testicular y 2 de ellos presentaron necrosis testicular, estas alteraciones dificultaron la perfusión del órgano, en este grupo se apreció una escasa formación de la bolsa del escroto y 4 de 5 animales se encontraron con testículos en posición inguinal. De manera contraria en el grupo Criptorquídico Bilateral-LHRH (CB-LHRH) en 4 de 5 animales los testículos no presentaron adherencias, necrosis ni disminución del volumen testicular, se observó una

óptima formación de la bolsa del escroto y los testículos se ubicaron dentro de la misma. En el grupo Criptorquídico Unilateral-hCG (CU-hCG) 2 animales mostraron adherencias en el testículo dañado y el resto del grupo se observó con testículos normales, 2 de 5 animales presentaron un adecuado desarrollo del escroto y los testículos en posición normal. A diferencia con el grupo Criptorquídico Unilateral-LHRH (CU-LHRH) el cual presentó una ligera disminución en cuanto al peso testicular y adherencias postquirúrgicas, y 4 de 5 animales presentaron formación y ubicación de los testículos en el escroto y el resto con testículo inguinal, aunque este último con bolsa escrotal bien desarrollada (Cuadro 1.). Los testículos contralaterales de los grupos con criptorquidia unilateral hCG y LHRH no presentaron alteraciones.

Cuadro 1.- Alteraciones macroscópicas en los testículos de rata con diferentes condiciones experimentales.

Grupo	Disminución del peso testicular	Posición			
		Inguinal	Escrotal	Adherencias	Necrosis
CS-hCG	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
CS-LHRH	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
CB-hCG	4/5	4/5	1/5	4/5	2/5
CB-LHRH	1/5	1/5	4/5	1/5	1/5
CU-hCG	3/5	2/5	3/5	2/5	0/5
CU-LHRH	1/5	1/5	4/5	1/5	0/5

Nota: la disminución del peso testicular es en proporción al peso corporal.

Nota: En los grupos con Criptorquidia Unilateral con administración de hCG y LHRH solo se evaluó el testículo criptorquídico.

CS-hCG Control sano con administración de hCG
 CS-LHRH Control sano con administración de LHRH
 CB-hCG Criptorquídico bilateral con administración de hCG
 CB-LHRH Criptorquídico bilateral con administración de LHRH
 CB-LHRH Criptorquídico unilateral con administración de hCG
 CU-LHRH Criptorquídico unilateral con administración de LHRH

2.- PRUEBAS DE FERTILIDAD

El cuadro 2 demuestra que la tasa de fertilidad fue afectada únicamente en el grupo 3 que corresponde al CB-hCG, en donde solo un animal fue fértil, contrariamente a lo obtenido con la terapia de LHRH y hCG en los diferentes grupos experimentales, en los cuales se mostró una recuperación de la espermatogénesis a 90 y 180 días de edad concluyendo como animales fértiles.

Cuadro 2.- Tasa de fertilidad en animales con diferentes condiciones experimentales de 90 y 180 días de edad.

GRUPO	TASA DE FERTILIDAD	
	90	EDAD (días) 180
CONTROL SANO-hCG	5/5	5/5
CONTROL SANO-LHRH	5/5	5/5
CRIPTORQUIDIA BILATERAL-hCG	1/5	1/5
CRIPTORQUIDIA BILATERAL-LHRH	3/5	5/5
CRIPTORQUIDIA UNILATERAL-hCG	2/5	5/5
CRIPTORQUIDIA UNILATERAL-LHRH	3/5	5/5

3.- ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los daños histológicos fueron determinados considerando las etapas del CES. En los animales pertenecientes al grupo CS-hCG el epitelio seminífero mostró un adecuado desarrollo espermatogénico, (Fig. 6) careciendo de alteraciones morfológicas. En este grupo el número de espermatogonias fue diferente a los grupos CB-hCG, CU-hCG, y con el grupo contralateral del grupo CU-hCG (Grafica 1). De igual forma el grado de maduración del epitelio mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos CB-hCG, CU-hCG, en comparación con el grupo CS-hCG (Gráfica 7).



Fig. 6.- Micrografía de túbulo seminífero de rata en etapa VIII perteneciente al grupo CS-hCG de 190 días de edad, donde se puede observar una morfología celular normal (10x). En el recuadro se observa con mayor claridad la citoarquitectura del epitelio seminífero integrado por células de Sertoli (S), Espermatogonias (G), Espermatocitos (Es), Espermatidas redondas (Et). Téc. azul de toluidina (40x).

En el grupo CS-LHRH se identificaron ligeras anomalías morfológicas (Cuadro 3.) como desprendimiento del epitelio seminífero, sin embargo presentaron una adecuada espermatogénesis con abundantes elementos celulares representados por espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y células de Sertoli (Fig. 7).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

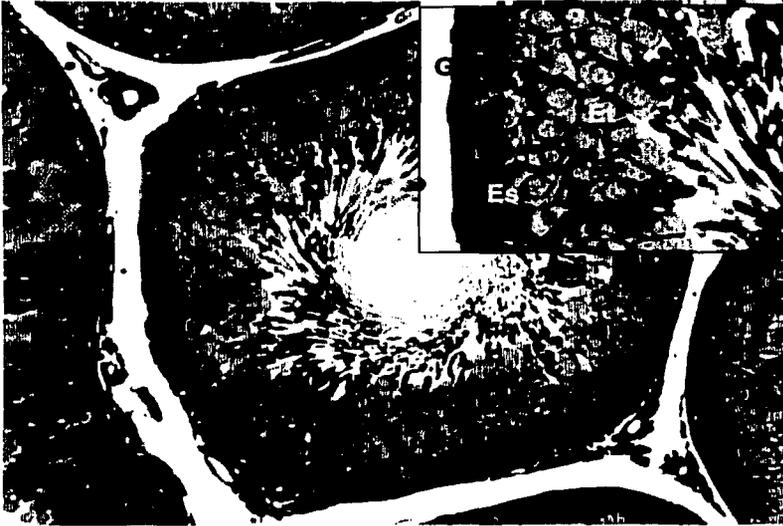


Fig. 7.- Túbulo seminífero de rata en etapa VII perteneciente al grupo CS-LHRH de 190 días de edad, en donde se muestra desprendimiento celular en menor grado (*) (10x).

En el recuadro se representa con mayor claridad la citoarquitectura del epitelio seminífero integrado por Espermatogonias (G), Espermatocitos (Es), Espermatíidas redondas (Et). Téc. azul de toluidina (40x).

Criptorquidicos bilaterales

En los animales pertenecientes al grupo CB-hCG el análisis histológico mostró vacuolización intracelular en espermatoцитos, presencia de desprendimiento epitelial, así como plegamiento de la membrana basal (Fig. 8). En comparación con los organismos pertenecientes al grupo CB-LHRH los cuales mostraron ligeros daños histológicos, como vacuolización intracelular y un menor grado de desprendimiento celular (Fig. 9).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

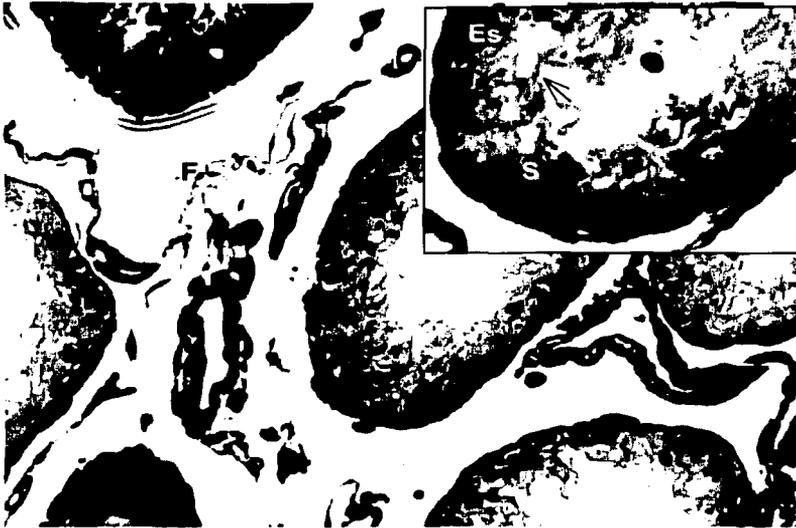


Fig.8.- Corte transversal de túbulos seminíferos de rata perteneciente al grupo CB-hCG de 190 días de edad. Se muestra una clara atrofia con disminución del número de células germinales, fibrosis (F) (10X). En el recuadro se aprecia con mayor claridad vacuolización (V), prolongaciones citoplasmáticas de células de Sertoli (→), células de Sertoli (S), y espermatocitos (Es), en menor cantidad como componentes del epitelio seminífero. Téc. azul de toluidina (40x).

El grado de maduración del epitelio seminífero nos permitió identificar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos CB-hCG y CB-LHRH (Graficas 2 a 5), consistentes en una alteración celular en espermatocitos, espermátidas, células de Sertoli, a excepción de las espermatogonias, las cuales no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

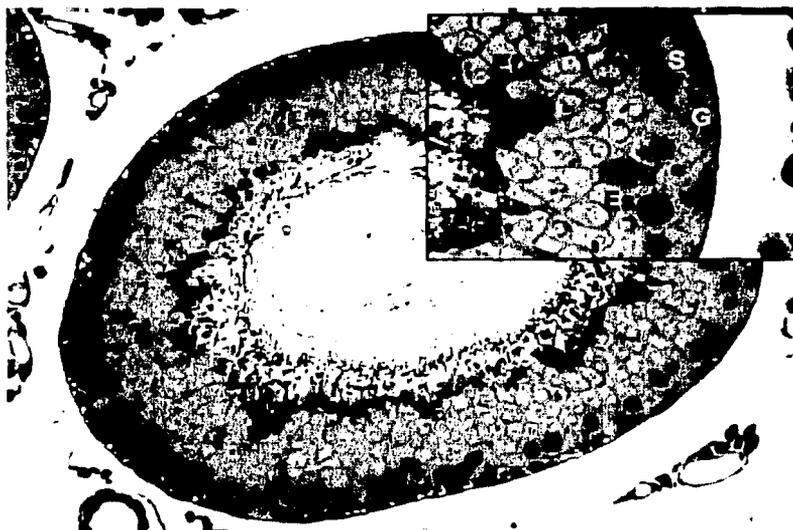


Fig. 9.- Túbulo seminífero de rata en etapa VIII del CES perteneciente al grupo CB-LHRH de 190 días de edad (10X). Donde se puede observar en el recuadro: Espermatogonias (G), Espermatocitos (Es), Espermatidas redondas (Et), células de Sertoli (S), conformando una citoarquitectura organizada. Téc. azul de toluidina (40x).

Testículos Ipsilaterales con Criptorquidia Unilateral

En los grupos con CU-hCG y CU-LHRH se apreció un menor grado de daño histológico, mostrando vacuolización intracelular desprendimiento del epitelio seminífero, plegamiento de la membrana basal en comparación con los animales sanos (Fig.10 y 11).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

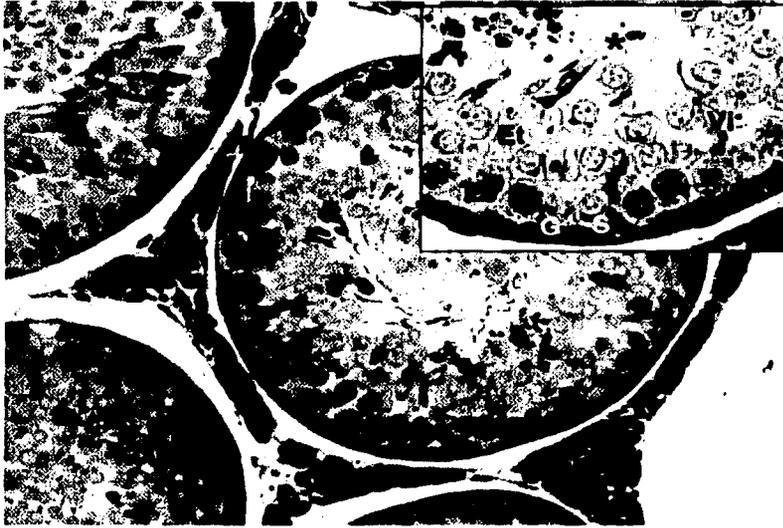


Fig. 10.- Túbulos seminíferos de rata perteneciente al grupo CU-hCG de 190 días de edad, donde se aprecia una disminución en la población de sus células germinales (10x). En el recuadro se aprecia con mayor claridad gran cantidad de vacuolización intracelular (Vi), desprendimiento celular (*), célula de Sertoli (S), Espermatogonias (G), Espermatocitos (Es), disminución de espermátidas redondas (Et)). Téc. azul de toluidina (40x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 11.- Túbulo seminífero de rata en etapa VIII perteneciente al grupo CU-LHRH de 190 días de edad; donde se muestra gran población de células germinales (10X). En el recuadro se representa con mayor definición la citoarquitectura celular normal conformada por células de Sertoli (S), Espermatogonias (G), Espermatocitos (Es), Espermátidas redondas (Et). Téc. azul de toluidina (40x).

Testículos Contralaterales de los animales con Criptorquidia unilateral

La observación microscópica de los testículos contralaterales reveló ligeras anomalías en el epitelio seminífero, observándose desprendimiento celular (Fig. 12) comparado con el grupo contralateral con LHRH en donde se mostró una organización adecuada representada por una gran cantidad de espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y células de Sertoli (Fig. 13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

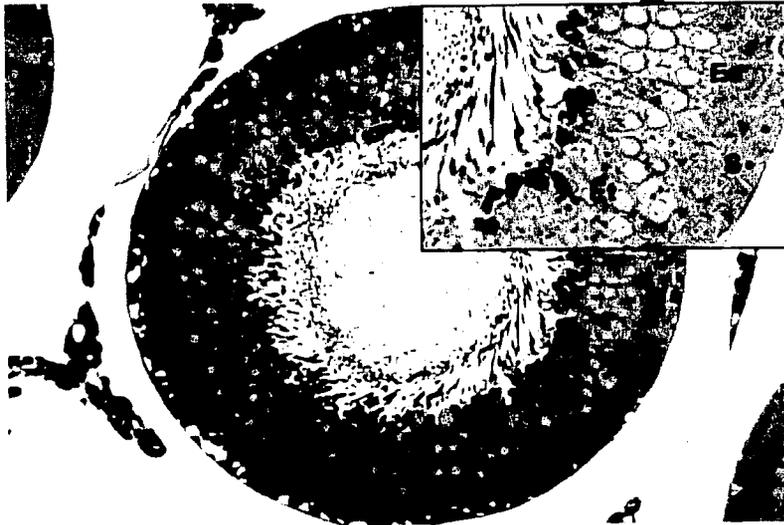


Fig. 12.- Túbulo seminífero en etapa VIII del CES perteneciente al grupo CU-hCG de 190 días de edad; el cual muestra los distintos elementos celulares normales (10X). En el recuadro se aprecian los diferentes elementos celulares: célula de Sertoli (S), Espermatocitos (Es), Espermatidas redondas (Et). Conformando una citoarquitectura celular normal. Téc. azul de toluidina (40x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

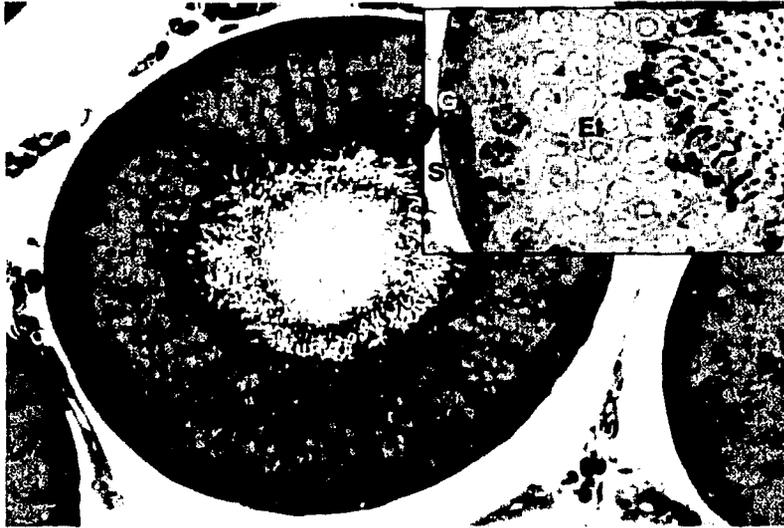


Fig. 13.- Túbulo seminífero en etapa VIII del CES perteneciente al grupo contralateral del CU-LHRH de 190 días de edad; donde se puede observar gran población de células germinales (10X). En el recuadro se representa con mayor claridad: células de Sertoli (S), Espermatogonias (G), Espermatocitos (Es), Espermatidas redondas (Et). Téc. azul de toluidina (40x).

Los resultados estadísticos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de espermatogonias y espermatidas, repercutiendo en el número total de células, área del epitelio seminífero y en el grado de maduración del mismo epitelio (Graficas 6,8).

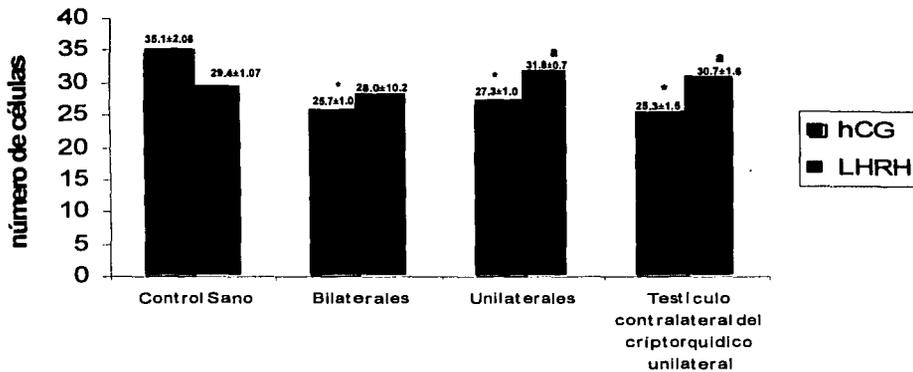
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Alteraciones morfológicas en los túbulos seminíferos de rata con diferentes condiciones experimentales.

Grupo	Desprendimiento	vacuolización	Plegamiento de	Fibrosis
	celular	intracelular	la membr. basal	
CS-hCG	0/5	0/5	0/5	0/5
CS-LHRH	1/5	0/5	0/5	0/5
CB-hCG	5/5	5/5	3/5	2/5
CB-LHRH	1/5	1/5	0/5	0/5
CU-hCG	5/5	3/5	1/5	0/5
CU-LHRH	1/5	0/5	0/5	0/5

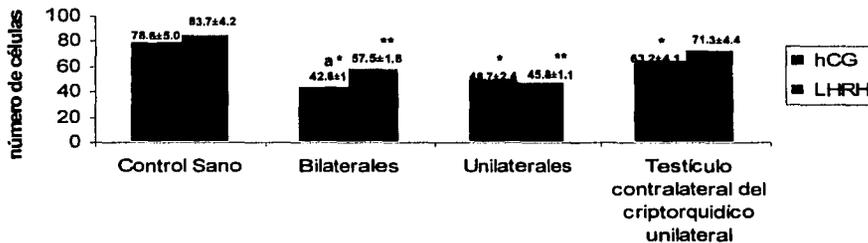
CS-hCG Control sano con administración de hCG
 CS-LHRH Control sano con administración de LHRH
 CB-hCG Criotorquídico bilateral con administración de hCG
 CB-LHRH Criotorquídico bilateral con administración de LHRH
 CU-hCG Criotorquídico unilateral con administración de hCG
 CU-LHRH Criotorquídico unilateral con administración de LHRH

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 1.- NÚMERO DE ESPERMATOGONIAS

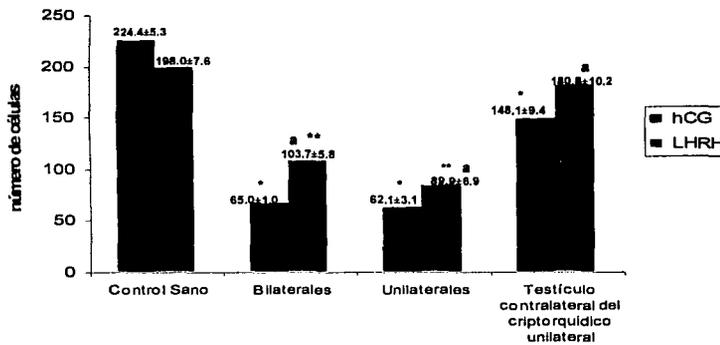
a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo ($p < 0.05$)
 * Denota diferencias significativas del grupo CS-hCG Vs CB-hCG, CU-hCG y contralaterales con hCG ($p < 0.05$)



Gráfica 2.- NÚMERO DE ESPERMATOCITOS

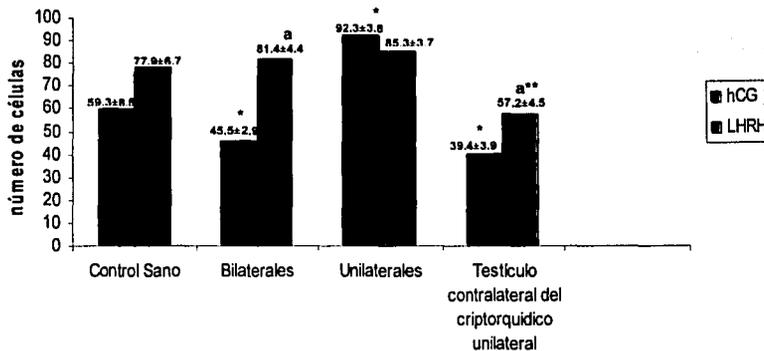
a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo ($p < 0.05$)
 * Denota diferencias significativas del grupo CS-hCG Vs CB-hCG, CU-hCG y contralateral ($p < 0.05$)
 ** Denota diferencias significativas del grupo CS-LHRH Vs CB-LHRH y CU-LHRH ($p < 0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Grafica 3.- NÚMERO DE ESPERMÁTIDAS REDONDAS

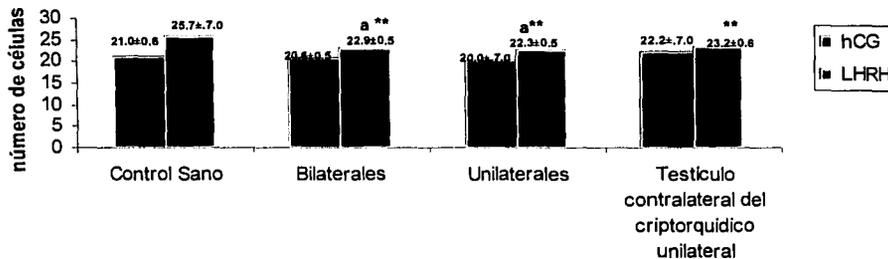
- a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo ($p < 0.05$)
- * Denota diferencias significativas del grupo CS-hCG Vs CB-hCG, CU-hCG y contralaterales hCG ($p < 0.05$)
- ** Denota diferencias significativas del grupo CS-LHRH Vs CB-LHRH, CU-LHRH y contralaterales LHRH ($p < 0.05$)



Grafica 4.- NÚMERO DE ESPERMÁTIDAS ELONGADAS

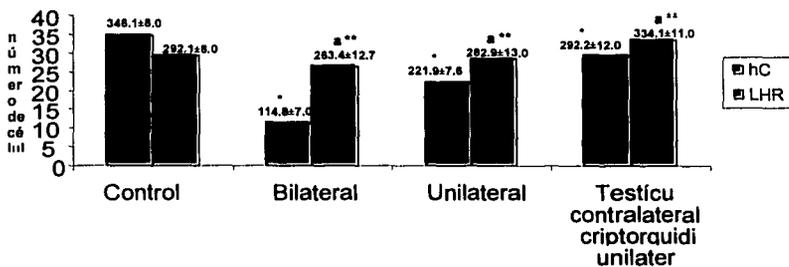
- a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo ($p < 0.05$)
- * Denota diferencias significativas del grupo CS-hCG Vs CB-hCG, CU-hCG y contralaterales hCG ($p < 0.05$)
- ** Denota diferencias significativas del grupo CS-LHRH Vs los contralaterales LHRH ($p < 0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Grafica 5.- NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI

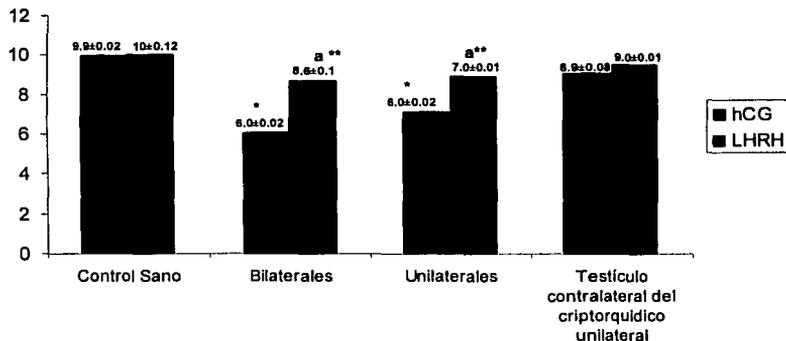
a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo (P<0.05)
 ** Denota diferencias significativas del grupo CS-LHRH Vs CB-LHRH, CU-LHRH y contralaterales LHRH (p<0.05)



Grafica 6.- TOTAL DE CÉLULAS POR TUBO SEMINÍFERO

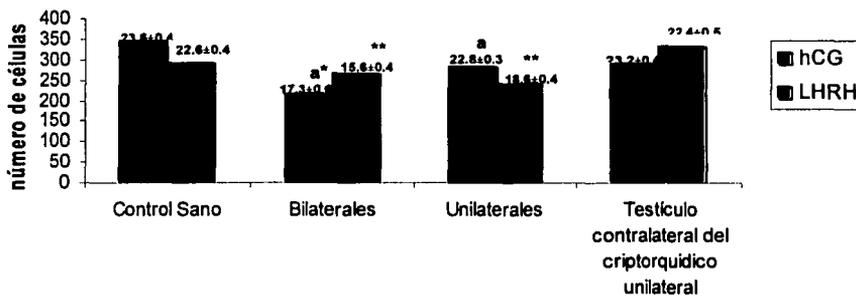
a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo (P<0.05)
 * Denota diferencias significativas del grupo CS-hCG Vs CB-hCG, CU-hCG y contralaterales hCG (p<0.05)
 ** Denota diferencias significativas del grupo CS-LHRH Vs CB-LHRH, CU-LHRH y contralaterales LHRH (p<0.05)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Grafica 7.- INDICE DE JOHNSEN

- a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo ($p < 0.05$)
 * Denota diferencias significativas del grupo CS-hCG Vs CB-hCG, CU-hCG ($p < 0.05$)
 ** Denota diferencias significativas del grupo CS-LHRH Vs CB-LHRH, CU-LHRH ($p < 0.05$)



Grafica 8.- ÁREA DEL EPITELIO SEMINÍFERO

- a Denota diferencias significativas al comparar tratamientos con hCG y LHRH del mismo grupo ($P < 0.05$)
 * Denota diferencias significativas del grupo CS-hCG Vs CB-hCG ($p < 0.05$)
 ** Denota diferencias significativas del grupo CS-LHRH Vs CB-LHRH, CU-LHRH ($p < 0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII.- DISCUSIÓN

Los pacientes con criptorquidia bilateral sometidos a cirugía tienen un pobre diagnóstico de fertilidad, ya que del 50 al 60% de los casos se reportan como fértiles, comparados con pacientes con testículos no descendidos unilaterales, de los cuales el 80% son fértiles (Elder y Bogan, 1987).

Los esfuerzos realizados para mejorar la tasa de fertilidad se han enfocado a la intervención quirúrgica a temprana edad y más recientemente a la aplicación de hormonas (Hadziselimovic y cols., 1987; Kogan y cols., 1990). Varias hormonas han sido empleadas para el tratamiento del criptorquidismo, como es la administración de hCG (Rajfer y cols., 1986; Christiansen y cols., 1992) o de LHRH (Karpe y cols., 1983; Harberg y Westphal, 1987). La tasa de éxito al emplear hCG se reporta del 10 al 65%, comparado con la aplicación de LHRH que se presenta con una mejor tasa de éxito hasta del 78% (Schwarz y cols., 1989).

Sin embargo, hoy en día se pone en duda el efecto benéfico de la terapia hormonal, ya que se ha demostrado una disminución en el tamaño testicular y aumento en la cantidad de células en apoptosis en hombres adultos que durante la infancia presentaron criptorquidia y fueron tratados con hCG (Dunkel y col., 1997). Algunos investigadores indican que los efectos dañinos inmediatos de la hCG como son la interrupción focal de la espermatogénesis con degeneración de las células germinales y picnosis (León y col., 1987; Kerr y Sharpe, 1989) pueden ser reversibles a largo plazo (Demirbilek y cols., 1997).

Es por este motivo que nuestro equipo de trabajo consideró importante comparar los efectos producidos por la hCG contra los producidos por la LHRH en animales con criptorquidia unilateral y bilateral inducida experimentalmente.

En los animales con criptorquidia bilateral y administración de hCG, la fertilidad disminuyó tal y como lo reporta Quinn y Crocker (1991) quienes al comparar la terapia con hCG en pacientes con criptorquidia, observaron inhibición en el proceso de espermatogénesis, teniendo un efecto irreversible en la fertilidad. Esto probablemente se debió a la aplicación de la hormona, pero no hay que descartar la manipulación testicular, la posición inguinal de ambos testículos, así como las adherencias producidas por la cirugía, las cuales son pronóstico negativo para el desarrollo de la espermatogénesis.

En el presente estudio observamos que el grupo criptorquídico bilateral con hCG mostró severos daños histológicos, como la pérdida de células germinales y de células de Sertoli, teniendo como consecuencia una disminución en el índice de Johnsen, el cual se considera como un parámetro para evaluar la espermatogénesis.

Resultados similares se encontraron en el testículo criptorquídico unilateral con administración de hCG es decir, vacuolización, disminución en la población de células germinales, aunque cabe aclarar que las lesiones que se presentaron en este grupo fueron menos severas en comparación con animales criptorquídicos bilaterales con hCG. Esto probablemente se debió al hecho de presentar un testículo sano con adecuada producción de testosterona, que podría contribuir a mejorar la espermatogénesis del testículo contralateral criptorquídico.

Lo observado en el presente trabajo demuestra que la hCG produce deterioro en la espermatogénesis y ésto se reflejó en una menor población celular, es probable que la hCG induzca la apoptosis de las células germinales, tal como lo reporta Dunkel y cols., (1997) al estudiar humanos.

El mecanismo propuesto por Dunkel y cols., (1997) es que la hCG estimula directamente a las células de Leydig provocando la producción y liberación en gran cantidad de testosterona, la cual es indispensable para promover el mantenimiento de la línea germinal, sin embargo, al interrumpir el tratamiento con la terapia de hCG los niveles de testosterona decaen súbitamente, teniendo como consecuencia muerte celular por apoptosis, es probable que la apoptosis sea un factor que contribuya en la disminución del número de células germinales. En general la apoptosis puede ser activada por la falta de un factor trófico específico del tejido, en muchos casos una hormona (Berges e Isaacs, 1993; Tapanainen y cols., 1993).

Contrariamente a los resultados obtenidos con hCG en los diferentes grupos experimentales, La terapia con LHRH en los animales con criptorquidia unilateral y bilateral ha demostrado tener un efecto reparador sobre el epitelio seminífero, es probable que se deba a que la LHRH actúa a un nivel superior sobre la hipófisis estimulando la producción y liberación tanto de LH como de FSH.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la terapia con LHRH corrige los daños histológicos producidos por esta patología, esto es que tiene mejores efectos sobre la morfología e histología testicular.

Debido a que el daño histológico producido por la criptorquidia experimental en los animales unilaterales y bilaterales se ven ligeramente disminuidos con el empleo de la terapia con LHRH, es necesario que se realicen más estudios de investigación enfocados en la búsqueda de otros tratamientos que induzcan el descenso testicular y disminuyan el daño testicular provocado por la criptorquidia, mejorando la fertilidad futura.

IX.- CONCLUSIONES

El tratamiento con hCG altera la morfología testicular, y por consiguiente disminuye la tasa de fertilidad comparada con el tratamiento de LHRH.

El tratamiento con LHRH restaura los daños histológicos y funcionales a largo plazo, sin alcanzar los mismos niveles de un animal control sano.

X.- REFERENCIAS

Alvarez, V. J. (1988). Anatomía comparada básica. Edit. Trillas, México. PT 581.

Austín, C. R. y R.V. Short. (1982). Células germinales y fertilización. Edit. Prensa Médica Mexicana, México.

Banks, J. W. (1986). Histología veterinaria Aplicada. Edit. Manual Moderno, México.

Beasley, S. W. y J. M. Hutson. (1987). Effect of division of genitofemoral nerve on testicular descent in the rat. Aust. NZ J Surg 57:49-51.

Bergada, C. (1979). Use of gonadotropins for the evaluation of testicular function and correlation to biopsy of cryptorchi testis. In Job J.C (ed): Cryptorchidism. Diagnosis and Treatment. Basel, Switzerland, Karger, pp 97-107.

Berges, R. y J. T. Isaacs. (1993). Programming events in the regulation of cell proliferation and death. Clin Chen 39: 359-361.

Bergh, A., P. Rooth., A. Widmark y cols. (1987). Treatment of rat with hCG induces inflammation-life changes in testicular microcirculation. J. Reprod. Fertil. 79: 135-143.

Berta, P., J. R. Hawkins., A. H. Sinclair., A. Taylor., B. L. Griffiths, P. N. Goodfellow and M. Follows. (1990). Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. Nature. 348: 248-250.

Brady, J. R. (1978). Curso programado de anatomía y fisiología. Sistema Reproductor. Edit. Limusa, México.

Browne, D. (1949). Treatment of undescended testicle. Proc. R. Soc. Med. 42:643.

Cinti, S., G. Barbatell., C. Pierleoni. (1988). The normal, cryptorchidism with human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone. A double blind controlled study of 243 boys. *Horm Res.* 30: 187.

Christiansen, P., J. S. Muller., O. R. Hansen., N. Hobolth., B. B. Jacobsen., P.H. Jorgensen., K. W. Kastrup., L. B. Nielsen., L. Pedersen-Bjergard., K. E. Petersen., S. A. Petersen., E. Thamdrup., E. Thisted., tranebjaerg., N. E. Skebaek. (1992). Hormonal treatment of cryptorchidism-hCG or GnRH: a multicentre study. *Acta Paediatr.* 81: 605-608.

Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52:198-236.

Connell, C. J. (1974). The Sertoli cell of the sexually mature dog anat res. 178-333.

Demirbilek, S., H. F. Atayurt., N. Celik and G. Aydin. (1997). Does treatment with human chorionic gonadotropin induce reversible changes in undescended testes in boys. *Pediatr. Surg. Int.* 12:591.

De Rosa, G., S. Della Casa and S. M. Corsello. (1987). Treatment of undescended testes with hMG and hMG plus hCG: clinical, hormonal and sonographic evaluation. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 48: 468.

Dominguez, C. R. (1991). Tópicos selectos de biología de la reproducción, Edit. Porrúa. México. PT 396.

Dunkel, L. J., J. Perheentupa and D. Apter. (1981). Kinetics of the steroidogenic response to single versus repeated doses of human chorionic gonadotropin in boys in prepuberty and early puberty. *Pediatr Res.* 19:1.

Dunkel, L., S. Taskinen., O. Huvatta., L. J. Tilly and S. Wikstrom. (1997). Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult. *J. Clin Invest.* 100:2341.

Dym, M. y W. Fawcett. (1970). The blood-testis barrier in rat and the physiological compartmentation of the seminiferous. *Biol. Reprod.* 3:308-326.

Elder, J. S. (1987). Cryptorchidism: isolated and associated with other genitourinary defect. *Pediatr. Clin. North. America.* 34:1033.

Elder, J. S. (1988). The undescended testis: hormonal and surgical management. *Surgical Clinics of North America.* 68:983.

Fawcett, D. M. (1975). Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: Hamilton, D.W. and R. D. Greep. (eds) *Handbook of physiology endocrinology* section 1. Vol.V, PP 21-55, Baltimore: Williams and Wilkins.

Forest, M. G. (1984). Maturation of the human testicular response. *Ann NY Acad Sci.* 438:304-328.

Frick, J., C. H. Danner., G. Kunit., G. Galvan and G. Bernroder G. (1980). The effect of chronic administration of a synthetic LHRH analogue intranasally in cryptorchid boys. *Int. J. Androl.* 3: 469.

Genis, G. J.M. (1970). *Biología del desarrollo.* Edit. Expaxa, Barcelona. PT 390.

Gilbert, F. Scotts. (2000). *Developmental biology.* Sunderland Massachusetts snaver. PT. 749.

Heyns, C. F., J. M. Hutson. (1995). Historical review of theories of testicular descent. *J. Urol.* 153:754.

Hadziselimovic, F. (1983). Embryology of testicular descent and mal-descent. In: Hadziselimovic, F. (eds) Cryptorchidism: Management and Implications. Springer-Verlag, Berlin, PP 11-34.

Hadziselimovic, F. Duckett JW, Snyder III HM, Schnaufer L, Huff D. (1987). Om phalocele, Cryptorchidism and brain malformations. J. Pediatr Surg. Int. 4:403-407

Hadziselimovic, F., J. Girard., B. Herzog and Stalder. (1982). Hormonal treatment of cryptorchidism. Horm Res. 16: 188.

Hagberg, S. y O. Westphal. (1987). Results of combined hormonal and surgical treatment for undescended testis in boys under 3 years of age. Eur J. Pediatr. 146 (Suppl 2) 38.

Happ, J., T. Weber and W. Callense. (1978). Treatment of cryptorchidism with a potent analog of gonadotropin-releasing hormone. Fertil Steril. 29:552.

Heyns, C. F. y J. M. Hutson. (1995). Historical review of theories of testicular descent. J. Urol. 153: 754.

Hinman, F. Jr. Opening remarks: Cryptorchidism. Eur J. Pediatr. (1993). 152 (Suppl 2): 53.

Hjertkvist, M., A. Bergh and J-E. Dember. (1988). hCG treatment increases intratesticular pressure in the abdominal testis of unilateral cryptorchid rats. J. Androl 9:116-120.

Houillon, Ch. (1972). Sexualidad. Edit. Omega, Barcelona. PC 184

Husmann, A. D. and B. J. Levy. (1995). Current concepts in the pathophysiology of testicular undescended. Urology. 47:267.

Huhtaniemi, I. T., D. W. Werren and K. J. Catt. (1984). Functional natural of rat testis Leydig cell. *Ann NY Acad. Sci.* 438:283-303.

Hutson, J. M. and P. K. Donahoe. (1986). The hormonal control of testicular descent. *Endocr. Rev.* 7:270-283.

Hutson, J. M., M. Terada., B. Zhou and M. PL. Williams. (1995). Normal testicular descent and the etiology of cryptorchidism. *Adv. Anat Embryol Cell Biol.* 132:1-56.

Hutson, J. M., S. Hasthorpe and C. F. Heyns. (1997). Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr. Rev.* 18:259-280.

Jegou, B. Le Gac-Jegou, F. Krester, D.M. (1982). Seminiferous tubule and interstitial fluid production I. Effects of age hormonal regulation in immature rats. *Biol. Reprod.* 27 :590-595.

Jegou, B. (1992). The Sertoli cell *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism.* 6: 273-311.

Jimenez, G. L. (1978). *Embriología humana normal y patológica.* Edit. Expaxa, Barcelona. PC 24-29.

Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count-A method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1:2-25

Junqueira, L. C. (1983). *Histología Básica,* Edit. Salvat, México. PT 506.

Karnovsky, M. J. (1965). A Formaldehyde-Glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. cell Biol.* 27:137A.

Karpe, M. D., M. D. Eneroth and M. D. Ritzen. (1983). LHRH Treatment in unilateral cryptorchidism: effect on testicular descent and hormonal response. *Journal Pediatric*. V. 103 N: 892-897.

Kerr, J. B. and R. M. Sharpe. (1989). Focal disruption of spermatogenesis in the testis of adults rats after a single administration of human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res*. 257: 163.

Kogan, S. J., S. Tennenbaum., B. Gill., E. Rada and S. B. Levitt. (1990). Efficacy of Orchiopexy by patient age 1 year for chryptorchidism. *J. Urol. Part 2*, 144:508.

Kogan, B. A., R. Gupta and K. P. Juenemann. (1998). Fertility in Cryptorchidism: Further developmen o fan experimental model. *J Urol*. 137:128-131.

Koopman, P., A. Münsterberg., C. Blanche., N. Vivian and R. Lovell-Badge. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450-452.

Lala, R., P. Matarazzo., P. Chiabotto., C. De Sanctis and F. Canavase. (1993). Combined therapy with LHRH and hCG in cryptorchid infant. *Eur J. Pediatr*. 152 (Suppl 2): 531.

Langman, J. (1976). *Embriología médica*. Interamericana, México. PC 159-172.

Langman, T. W. y Ph. P. Saller. (1994). *Edit. Panamericana*, México. PT 414.

Leblond, C. P. and Y. Clermont. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55:548-573.

Lein, M., D. Tahlenkamp., B. Schönberger., S. Prollius. (1996). The pharmacological effect of the gonadotrophin-releasing hormone on experimental cryptorchidism in rats. *Scand. J. Urol.* 30:185.

Lesli, P. G. y L. H. James. (1995). *Atlas de histología*. Edit. Panamericana, México. PC 342-345.

León, M. D., V. A. Chiauuzzi and J. C. Calvo. (1987). Acute hCG administration induced seminiferous tubule damage in adult rats. *Acta Physiol. Pharmacol Latinam.* 37: 277.

Leonhardt, H. (1977). *Histología, citología y microcirugía humana*. Edit. Salvat, México. PT 509.

Lesson, S. T. (1990). *Histología*. Edit. Interamericana, México, PT 276.

Lewis, L. G. (1948). Cryptorchidism. *J. Urol.* 60:345-356.

Meyer, P. (1985). *Fisiología humana*, Edit. Salvat, México. PT. 383.

Momose Y., L. Griffiths and J. M. Hutson. (1992). Testicular descent III. The neonatal mouse gubernaculum shows rhythmic contraction in organ culture in response to calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology.* 131: 2881.

Nef S. y L. F. Parada. (1999). Cryptorchidism in mice mutant for *Ins13*. *Nat Genet* 22:295-299.

Netter, H. F. (1988). *Sistema Reproductor*. Edit Salvat, México. PT 273

Nicander, L. I. (1976). An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals. *Zellforsch Milkrosk Anat.* 83:375-397.

Ozdzenski, W. (1967). Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica.* 17:367-369.

Perey, B., Clermonnt, Y., y C. P. Leblond. (1961). The wave of the seminiferous epithelium in rat. Am. J. Anat. 108: 47-77

Parvinen, M., K. K. Vinko y J. Toppari. (1986). Cell interaction during the seminiferous epithelial cycle. Int. Rev. Cit. 104: 115-151.

Pomerol, J. L. y Arrondo, J. L. (1994). Práctica androgénica. Edit. Salvat. México. PC. 234-239, 780-785.

Quinn, F. MJ., A. D. Crockard and S. Brown. (1991). Reversal of degenerations changes in the scrotal testis of the Orchidopexy in experiment unilateral cryptorchidism. J. Pediatr Surg. 26: 451-454.

Quiroz, F. (1981). Tratado de anatomía humana. Edit. Purrua, México. PC 265-267.

Rajfer, J. D. J. Handelsman and R. S. Swerdloff. (1986). Hormonal therapy of cryptorchidism. A randomized, doble-blind study comparing human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone N. Engl. J. Med. 314:466-470.

Regaud, C. (1901). Etudes sur la structure des tuber seminiferes Arcg Anat Microscop. 4: 101-156.

Ross, Ph. D. y J. L. Romrell. (1998). Histología. México. PT 817.

Rozanski, A. T. y A. D. Bloom. (1995). The undescended testis Urol. Clin. Nort. AMER. 22:107.

Rusell, L.; D. (1978) The Blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study Anat. Rec. 190: 99-112.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Scapiro, B. Kann man mit hypofysenvorderlappen den unterentwickelten mannlichen Genitalapparat beim Menschen zum wachstum an regen. (1930). Dtsch. Med. Wochenschr. 56: 1605

Schwarz, H. P., S. Aebi. And AA. Perisic. (1989). Succes and relapse rate after treatmen cryptorchidism with intranasal LHRH. Acta Pediatr. Scand. 74:274-280.

Scorery, G. and G. H. Farrington. (1971). Congenital deformities of the testis and the epididymis. New York, Appleton-Century-Crofts.

Sharpe, R. M., H.M. Fraser., Cooper y F. F. G. Rommerts. (1981). Sertoli-Leydig cell communication via an LHRH-Like factor. Nature. 290: 785-788.

Shono, T. Ramm-Anderson S, Hutson, J.M. (1994). Transabdominal testicular descent. Sience. 211.

Tapanainen J., J. L. Tilly., K. Vihko and A. LW. Hsueh. (1993). Hormonal control of apoptotic cell in the testis: Gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. Mol. Endocrinol. 7: 643-650.

Testut, L. y A. Latarjet. (1992). Compendio de anatomía descriptiva, Edit. Salvat. México. PT 776.

Urban, M. D., P. A. Lee and R. Lanes. (1987). hCG stimulation in children with cryptorchidism. Clin. Pediatr. 26:512.

Weiss, L. (1986). Histología. Edit. El Ateneo, México. PT 1100.

Widmark, A., A. Bergh y J. E. Damber y cols. (1987). Leucocytes mediate the hCG-induced increase in testicular venular permeability. Mol Cell Endocrinol. 53:25-31.

Whitaker, R. M. (1992). Undescended testis-the for a standar classification
B. J. Urolo. 70:1.

Yamanaka, J., S. A. Metcalfe and J. M. Hutson. (1993). Testicular descent
II. Ontogeny and response to denervation of calcitonin gene-related peptide
receptors in neonatal rat gubernaculum. Endocrinology. 132:280.

Zhou, B., L. M. Watts and J. M. Hutson. (1993). Germ cell developmen in
stance. J. Urol. 150:1-4.

APÉNDICE A

INCLUSIÓN EN EPON

(Tejido fijado en Karnovski)

- Lavar con solución amortiguadora de cacodilatos 0.1M y PH 7.4.
- Postfijación en tetroxido de osmio al 1% durante 1hr.
- Lavar 3 veces con agua destilada, cambios de 5 minutos.
Posteriormente se inicia la deshidratación con:
- Un cambio de OH 60% durante 10 minutos.
- Tres cambios en OH 70% dejándolo 10 minutos en el último cambio.
- Tres cambios en OH 80% dejándolo 10 minutos en el último cambio.
- Tres cambios en OH 90% dejándolo 10 minutos en el último cambio.
- Tres cambios en OH 96% dejándolo 10 minutos en el último cambio.
- Tres cambios en OH 100% dejándolo 10 minutos en el último cambio.
- Tres cambios en OH 100% dejándolo 20 minutos en el último cambio.
- Un cambio en óxido de propileno y dejándolo por 20 minutos en el último cambio.

- Un cambio en óxido de propileno y dejándolo por 20 minutos en el último cambio.

Impregnación en EPON

- * Un cambio en EPON-óxido de propileno 1:1 durante 1hr.
- * Un cambio en EPON-óxido de propileno 2:1 durante 1hr.
- * Cambiar a EPON puro durante 24hrs.

Inclusión

- * EPON puro durante 12hrs. a 60° C para su polimerización
- * (Karnovski, 1985).

APÉNDICE B

ÍNDICE DE JOHNSEN

(Grado de maduración del epitelio seminífero).

- 10 Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides.
- 9 Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 /tubo).
- 8 No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátidas maduras en diferenciación.
- 7 Gran cantidad de espermátidas sin algún signo de diferenciación.
- 6 Presencia de pocas espermátidas (5 por tubo).

- 5 Gran cantidad de espermatocitos presentes.
- 4 Pocos espermatocitos presentes (5 por tubo).
- 3 Presencia únicamente de espermatogonias.
- 2 No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli.
- 1 No hay células en el tubo seminífero.