



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**PAPEL DE LA MELATONINA SOBRE EL DAÑO PRODUCIDO  
POR LA LIBERACIÓN DE RADICALES LIBRES EN EL  
TESTICULO CRIPTORQUIDICO**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA  
GABRIELA BONETA TRUJILLO

TUTOR:  
ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

COMITÉ TUTORAL:  
MARIA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA  
NORMA ANGELICA MORENO MENDOZA

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIA

A mis padres Esther Trujillo Colio y Gerardo Boneta de la Parra, por darme la oportunidad de estar aquí y por enseñarme a ser quien soy.

A mi compañero incondicional y ahora esposo Benito, gracias amor por estar ahí brindándome tu apoyo, enseñándome la importancia real de este trabajo, simplemente te amo.

A mis suegros Benito A. Fernández Lueje y María Cristina Martínez Sanz, por hacerme sentir como una hija, por su cariño incondicional y por darme una nueva familia.

A Diego y Claudia gracias por su apoyo.

A Lucy, amigui gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, eres un valioso tesoro te quiero mucho.

A mi perro Milka, y a mis hurones Shaka y Tammy por ser mis libros vivientes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la doctora Rosa Ma. Viguera Villaseñor por su amistad e invaluable enseñanza, por estar siempre dispuesta a ayudarme y a aclarar todas mis dudas, sin su apoyo no lo hubiera logrado.

A las doctoras María de Lourdes Juárez Mosqueda y Norma Angélica Moreno Mendoza gracias por su paciencia y sus comentarios durante el desarrollo de este trabajo.

A Pedro, Gaby y Edgar, sin su apoyo y sus conocimientos seguiría haciendo cirugías, frotis y cortando bloques; por acompañarme, orientarme, socorrerme y sobre todo brindarme su amistad durante este proceso han sido unos compañeros invaluable.

A Edna gracias por tus aportaciones en las pruebas de diclorofluoresceína.

A Instituto Nacional de Pediatría por permitirme realizar en sus instalaciones este trabajo.

Al CONACYT que me apoyó con una beca durante el desarrollo de mi maestría.

A los miembros del jurado, por su tiempo, interés y sus valiosas aportaciones para el mejoramiento de este trabajo.

## INDICE

<b>1 RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
1.1 ABSTRACT.....	8
<b>2 INTRODUCCION.....</b>	<b>9</b>
2.1 Formación de los testículos.....	9
2.2 Descenso testicular.....	12
2.3 Anatomía del aparato reproductor.....	16
2.4 Espermatogénesis.....	19
2.5 Espermatocitogénesis o fase de proliferación.....	21
2.6 Meiosis.....	23
2.7 Espermiogénesis.....	24
2.8 Espermiación.....	25
2.9 Regulación Hormonal.....	25
2.10 Ciclo del Epitelio Seminífero.....	27
<b>3 ANTECEDENTES.....</b>	<b>28</b>
3.1 Criptorquidia.....	28
3.1.1 Etiología.....	30
3.1.2 Tratamientos.....	31
3.2 Radicales Libres.....	33
3.3 Estrés calórico.....	37
3.4 Radicales Libres y Criptorquidia.....	37
3.5 Antioxidante.....	39
3.5.1 Melatonina.....	39
3.5.2 Biosíntesis.....	41
3.5.3 Antioxidante.....	42

<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
	5.1 Objetivo General.....	44
	5.2 Objetivos Específicos.....	44
<b>6</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
	6.1 Procedimiento Quirúrgico.....	45
	6.2 Procesamiento del Material Biológico.....	45
	6.3 Determinación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs).....	46
	6.4 Índice histopatológico y Área epitelial.....	46
	6.5 Apoptosis celular.....	47
	6.6 Proliferación celular.....	47
	6.7 Análisis Estadístico.....	48
<b>7</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
	7.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno (EROs).....	49
	7.2 Índice histopatológico y determinación del área epitelial.....	50
	7.3 Índice de Johnsen.....	53
	7.4 Apoptosis celular.....	54
	7.5 Proliferación celular.....	55
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS EMPLEADAS.....</b>	<b>63</b>
<b>11</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>66</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>67</b>

## INDICE DE TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS

Tabla 1. Tiempo de diferenciación gonadal en diferentes especies.....	11
Tabla 2. Fases del descenso testicular en diferentes especies.....	15
Tabla 3. Duración de la espermatogénesis en algunas especies.....	20
Tabla 4. Duración del ciclo del epitelio seminífero en diferentes especies.....	27
Tabla 5. Genes involucrados en la supresión o iniciación de apoptosis en diferentes tejidos....	38
Figura 1. Corte histológico del gubernaculo.....	13
Figura 2. Mecanismo de acción de la testosterona en el descenso testicular.....	15
Figura 3. Cito arquitectura del epitelio celular del tubo seminífero.....	19
Figura 4. Imagen de Cordones Seminíferos.....	22
Figura 5. Esquema de la división meiótica.....	23
Figura 6. Esquema del sistema porta hipotálamo-hipófisis.....	25
Figura 7. Esquema de la a sincronía del epitelio seminal.....	28
Figura 8. Corte longitudinal de testículo de rata con criptorquidia.....	30
Figura 9. Producción de enzimas antioxidantes y especies reactivas de oxígeno.....	34
Figura 10. Sitios de producción de melatonina en el organismo.....	40
Figura 11. Síntesis de melatonina.....	41
Figura 12. Imágenes histológicas de tubos seminíferos provenientes de diferentes condiciones experimentales.....	51
Gráfica 1. Incidencia de criptorquidia en algunas especies.....	29
Gráfica 2. Producción de especies reactivas de oxígeno.....	50
Gráfica 3. Índice histopatológico.....	52
Gráfica 4. Área del epitelio seminífero.....	53
Gráfica 5. Índice de Johnsen.....	54
Gráfica 6. Apoptosis celular.....	55
Gráfica 7. Proliferación celular.....	55

## 1 RESUMEN

La elevada temperatura a la que se somete un testículo fuera del escroto, interrumpe la espermatogénesis. Esto se asocia a la degeneración de células germinales por la liberación de radicales libres (RL) producidos por el estrés calórico. Se propone que el RL producido es el anión hidroxilo, altamente tóxico para las células germinales que carecen de la enzima glutatión reductasa que lo inactiva. La melatonina es un potente antioxidante capaz de favorecer la síntesis endógena de dicha enzima además de actuar como atrapadora de RL, por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto protector de la melatonina en ratas con criptorquidia inguinal inducida, a través de la formación de radicales libres (RL), el índice histopatológico (IHP), el área del epitelio seminífero (AES), la maduración testicular, apoptosis y la proliferación celular. Al analizar los parámetros mencionados, se observó que la melatonina redujo significativamente la producción de EROs la cual alcanzó los niveles del grupo control sano, indicando el papel de la melatonina como antioxidante y atrapadora de radicales libres principalmente de especies reactivas de oxígeno. A pesar de esto, la melatonina fue incapaz de disminuir las alteraciones epiteliales y la apoptosis ya que el grupo criptorquídico con melatonina presentó el mismo grado de daño que el grupo criptorquídico sin melatonina, por lo que se sugieren vías alternas de agresión a las células. Otra alteración observada fue una reducción en el grado de maduración de las células del grupo control sano (CS) con melatonina, lo cual pudiera deberse a un efecto tóxico de la melatonina en animales que no liberan elevadas cantidades de EROs. Por lo tanto en este trabajo la dosis empleada de melatonina probablemente potenció el efecto del estrés calórico induciendo un aumento en las células apoptóticas. Si bien con la dosis, periodo y hora de administración utilizados no se obtuvieron los resultados deseados, estudios a largo plazo y con diferentes dosis y horas de aplicación podrían evaluarse utilizando animales con menor variabilidad genética.

Palabras clave: criptorquidia, melatonina, radicales libres.



## 1.1 ABSTRACT

Spermatogenesis is interrupted by the high temperature reached by a testicle when out of the scrotum. This is associated with germ cell degeneration given the release of free radicals (FR) caused by the heat shock. The FR produced is mainly hydroxyl anion, highly toxic for germ cells which lack the glutathione reductase enzyme that neutralizes it. Melatonin is a potent antioxidant capable of favoring the endogenous synthesis of such enzyme besides working as an FR trap. In this study we evaluate the protective effect of melatonin in inguinal induced cryptorchidism rats. Measure of free radicals (FR), histopathologic rate (IHP), seminiferous epithelium area, testicle grade of maturation, apoptosis and cell proliferation were evaluated. After analyzing these parameters it was found that melatonin significantly reduced EROs production, which reached the healthy control group levels, confirming melatonin's role as antioxidant and scavenger of free radicals mainly EROs. In spite of this, melatonin was unable to reduce epithelium alterations and apoptosis given that the cryptorchidism group with melatonin showed the same damage level than the one without, which suggests alternate ways of harming the cells. Another alteration observed was a reduction in the maturation level in cells from the healthy control group with melatonin, which could be a toxic effect of melatonin on animals that don't release high quantities of EROs. It is possible that the dose of melatonin used in this work increased the potency of the heat shock effect inducing an increase in the apoptotic cells. Even if the dose, period and time of administration in this study didn't render the desired results, longer term studies with different doses and administration times could be evaluated on animals with less genetic variability.

Key words: cryptorchidism, melatonin, free radicals.

## 2 INTRODUCCION

### 2.1 Formación de los testículos

La diferenciación gonadal hacia ovario o testículo es el punto de inicio de la determinación sexual de los mamíferos. Al poseer un solo cromosoma X y un cromosoma Y, los machos dependen de un gen ligado al cromosoma Y, conocido como el gen SRY o factor determinante del testículo (FDT), el cual es necesario para comprometer a la gónada totipotencial a diferenciarse hacia testículo (Berta *et al*, 1990). Si bien el sexo del embrión es determinado genéticamente en el momento de la fertilización, las gónadas solo adquieren caracteres masculinos o femeninos dentro de las primeras etapas del desarrollo.

En los embriones de mamíferos, las gónadas se forman a través de la interacción de las células germinales primordiales (CGP) o células *stem* con las células somáticas representadas por dos poblaciones principales: las células mesenquimatosas de la región mesonéfrica y las células epiteliales procedentes del epitelio celómico circundante (Sofikitis *et al*, 2005).

Durante la vida embrionaria temprana se observa la formación de un par de eminencias longitudinales llamadas pliegues o crestas gonadales, originadas a partir de un engrosamiento del epitelio celómico que cubre la cara medial del mesonefros en la embriogénesis, las CGP migran a través del intestino primitivo al borde de las crestas gonadales (Ozdzenski *et al*, 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. Las CGP se desplazan desde el saco vitelino, lugar donde son originadas estimuladas por la fibronectina que provee un sustrato adhesivo desplazándose a través de movimientos ameboides hasta las crestas gonadales incrementando en número, al llegar empiezan a realizar interacciones entre ellas, así como con el epitelio celómico y las células mesenquimatosas para organizar los cordones testiculares (Rogulska, *et al*, 1971, De Felici, *et al*, 2000, Bianchi, 2001).

En esta etapa tanto en la hembra como en el macho se forman varios cordones irregulares llamados cordones sexuales primitivos imposibles de diferenciar en la gónada, por lo que recibe el nombre de gónada indiferenciada (Houillon *et al*, 1984).

Si el embrión es genéticamente macho, las CGP expresarán el factor determinante testicular (FDT) por influencia del cromosoma Y, los cordones sexuales primitivos darán origen a los túbulos de la *rete testis*. Al continuar el desarrollo de los cordones testiculares, estos pierden contacto con el epitelio superficial y se separan de él por una capa de tejido conectivo fibroso llamada túnica albugínea (Langman *et al*, 1976), en esta etapa los cordones testiculares se encuentran formados por CGP, posteriormente células sustentaculares derivadas del epitelio celómico de la gónada y cercanas a la zona migran rodeando a las CGP. En el macho, estas células se diferenciarán en células de Sertoli fetales, las cuales producirán la hormona antimülleriana (MIS), induciendo la degeneración de los conductos de Müller, dicha hormona también interfiere con las células de Leydig, que se desarrollaron a partir del mesénquima original de la cresta gonadal. De 2 a 3 días después de su diferenciación, las células de Leydig empezarán a secretar testosterona en grandes cantidades y el péptido similar a la insulina 3 (INSL3) (Vigueras, *et al*, 2003).

Inicialmente la secreción de testosterona es producida constitutivamente o bajo control autócrino o parácrino en roedores, mientras que en humanos ocurre bajo la estimulación de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) de origen materno en etapas tempranas de la gestación (Langman *et al*, 1976, Amann *et al*, 2007). En etapas avanzadas la regulación de la secreción de testosterona está dada por la hormona luteinizante (LH) fetal. La testosterona determinará el desarrollo y la diferenciación de los conductos de Wolff. Alrededor del tercer trimestre el testículo fetal sintetiza testosterona que actuará en el hipotálamo determinando el ritmo de liberación de las gonadotropinas hipofisarias (hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) que regulan la función testicular de manera tónica y pulsátil (Meyer *et al*, 1985).

Después de la llegada de las células de Sertoli fetales, otras células del mesonefros dan origen a la lámina basal, así como a células mioideas que rodean a las células de Sertoli, formando parte del tubo seminífero en la vida post natal.

El periodo entre la entrada de las CGP en la gónada indiferenciada hasta la formación de los cordones seminíferos, requiere un promedio de 7 días post coito en mamíferos no roedores, mientras que en los roedores requiere de 12 días post coito (Amann *et al*, 2007).

Dependiendo de la especie, la diferenciación de la gónada en testículo, la producción de hormonas y factores de crecimiento es completada en diferentes días de la gestación (Amann *et al*, 2007). (tabla 1)

TABLA 1. Tiempo de diferenciación gonadal en diferentes especies (Amann *et al*, 2007).

<b>Especie</b>	<b>Días de gestación</b>
Ratón	14
Rata	16
Conejo	22
Perro	34
Caballo	35
Cerdo	36
Toro	42
Humano	56

Debido a que las gónadas masculinas requieren un ambiente térmico óptimo con el fin de producir una adecuada espermatogénesis, una vez diferenciada la gónada hacia testículo, se presenta el descenso testicular de la cavidad abdominal hacia el escroto. Si bien algunos mamíferos como los elefantes, rinocerontes y los mamíferos marinos, mantienen los testículos intraabdominales, el requerimiento de una temperatura menor a la corporal, pareciera ser un proceso evolutivo entre las especies (Morgentaler *et al*, 1999).

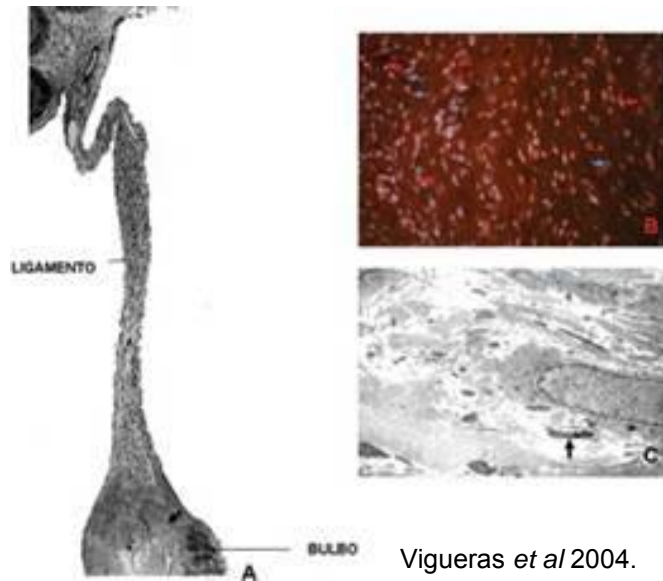
## 2.2 Descenso testicular

Es un proceso complejo, multifactorial e influenciado por eventos genéticos, hormonales y anatómicos que involucran diferentes estructuras como: el o los testículos, los epidídimos, conductos deferentes, ligamento suspensor craneal del testículo, el proceso vaginal y la evaginación del peritoneo, el músculo cremáster que difiere en forma entre especies, el nervio genitofemoral, el desarrollo del gubernaculo y el escroto (Heyns *et al* 1995, Viguera *et al*, 2001, Hutson *et al*, 2005, Amann *et al*, 2007). El descenso testicular se presenta en dos fases, la primera denominada transabdominal y la segunda inguinoescrotal.

Durante la primera fase los testículos y epidídimos migran desde su posición original cercana a los riñones en la cavidad abdominal hasta la posición inguinal. Para que se lleve al cabo se requiere del crecimiento del gubernaculo y la regresión del ligamento suspensor craneal bajo la acción de la testosterona, (Hutson *et al*, 2005) permitiendo que el testículo migre (Fig. 1A) (Kumagai *et al*, 2002). También se mencionan varios genes y productos de estos (Baumans *et al*, 1983). Klonish, *et al* (2004) mencionan los genes: factor asociado a insulina 3 (INSL3) su receptor el LGR8 y el gen Hoxa 10, péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) y receptores de andrógenos. El gubernaculo (Fig. 1A) en el humano y la rata se encuentra constituido por un ligamento y un bulbo gubernacular de consistencia mucofibrinosa, rico en ácido hialurónico y glicosaminoglicanos con capacidad hidrofílica (Hutson *et al*, 2005). La porción apical del gubernaculo, se encuentra dirigida hacia el testículo y el epidídimo y la base hacia el fondo del escroto. El gubernaculo presenta, un sobre crecimiento bajo la participación del INSL3 su receptor LGR8 y el Hoxa 10, en esta fase que permite la dilatación del canal inguinal.

En los bovinos, el gubernaculo se encuentra suficientemente desarrollado alrededor del día 50 de gestación (Viguera *et al*, 2001, Amann *et al*, 2007).

Fig. 1.-Corte histológico del gubernaculo en donde se aprecia el ligamento y el bulbo gubernacular, en esta última porción se aprecian fibras de músculo estriado (flecha). B.-Bulbo gubernacular de una rata durante el descenso testicular inguinoescrotal. La inmunofluorescencia detectó la presencia de receptores para andrógenos en los fibroblastos (flechas rojas) y ausencia de estos en las fibras de músculo estriado (flechas azules). C-. Micrografía electrónica de un fibroblasto del bulbo gubernacular durante el descenso testicular en donde se aprecia colágena semidigerida (flecha).



Vigueras *et al* 2004.

Al concluir la fase transabdominal, los testículos se encuentran cerca del anillo inguinal interno y la cauda del epidídimo se encuentra dentro del canal inguinal, el gubernaculo y el proceso vaginal se extienden sobre el canal inguinal recién formado. Durante la fase inguinoescrotal el tamaño de los testículos decrece para facilitar su paso a través del canal inguinal, la reducción en el tamaño testicular es substancial, especialmente en los fetos equinos. La incompatibilidad entre la talla testicular y el diámetro del canal inguinal es considerado un factor que contribuye al criptorquidismo abdominal en dicha especie (Amann *et al*, 2007).

La migración inguino escrotal de los testículos desde el anillo inguinal externo hasta el escroto es dependiente de los andrógenos (Fig. 1B). Los fibroblastos presentan receptores para andrógenos lo que permite la involución del ligamento y el bulbo gubernacular, debido a un incremento en la cantidad de secreción de la fosfatasa ácida y las colagenasas para la

remoción de la matriz extracelular (Fig. 1C); el ligamento del gubernaculo tiende a acortarse y se incorpora al bulbo gubernacular mientras el proceso vaginal se alarga para permitir el paso del testículo desde el anillo inguinal externo hasta el escroto. Después del descenso el proceso vaginal se oblitera con el fin de impedir la formación de hernias inguinales y el gubernaculo permanece como un tejido fibroso que mantiene anclado el testículo al escroto (Vigueras *et al*, 2001, Hutson *et al*, 2004).

También se propone que bajo la influencia de la testosterona sobre las neuronas que forman parte del nervio genito femoral (NGF) ubicadas en la porción espinal L1-L2 (Fig. 2) (Hutson *et al*, 1997, Hutson & Hasthorpe, 2005, Amann *et al* 2007) se produce y libera al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en sus ramas sensoriales, generando las contracciones del músculo gubernacular (Hutson *et al*, 2004). El bulbo gubernacular se desenvaina y termina envolviendo al testículo.

Dependiendo de la especie, esta etapa ocurre antes o después del parto (Goh *et al*, 1994, Barthold *et al*, 1996, Hutson *et al*, 2005). (Tabla 2)

Los principales factores que permiten el paso de los testículos a través del canal inguinal son: la testosterona, la presión ejercida por las vísceras, el fluido peritoneal de los testículos, la expansión del proceso vaginal y el crecimiento del abdomen (Amann *et al*, 2007).

Se ha sugerido que el microambiente proveído por los fetos machos o hembras cercanos y la posición relativa en el cérvix, pudieran afectar el descenso testicular, principalmente en bovinos (Even *et al*, 1992, Nonneman *et al*, 1992).

Fig. 2

Esquema que representa el mecanismo de acción de la testosterona (T) en el descenso testicular: Directa sobre los fibroblastos gubernaculares (1); Indirecta sobre las neuronas del núcleo motor del NGF (2), y estas a su vez regulan de alguna forma la liberación del CGRP producido por el núcleo sensitivo del NGF(3).

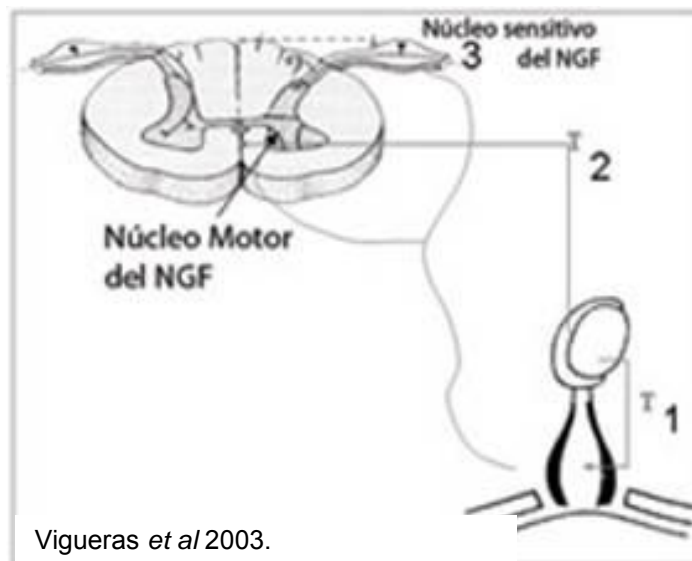


Tabla 2. Fases del descenso testicular en las diferentes especies

Especie	Fase transabdominal	Fase inguino escrotal
Humano	12-16 días de gestación	182-224 días de gestación
Cerdo	16-22 días de gestación	65-113 días de gestación
Caballo	45-75 días de gestación	270-330 días de gestación
Perro	38-60 días de gestación	0-50 días postnatal
Rata	15.5 días de gestación	1-21 días postnatal
Ratón	15-17 días de gestación	1-21 días postnatal



### **2.3 Anatomía del aparato reproductor.**

Los testículos son glándulas parácrinas, de forma ovoide, de volumen y localización variable. La porción exócrina es una glándula espiral compuesta que produce células haploides llamadas espermatozoides como producto de secreción. La porción endócrina esta compuesta por las células de Leydig y de Sertoli, las cuales producen testosterona y factores de crecimiento respectivamente como productos de secreción (Quiroz *et al*, 1981, Banks *et al*, 1986).

La posición testicular en el escroto y la dirección de su eje longitudinal en relación con el cuerpo, varía de acuerdo a la especie. En los rumiantes los testículos son pendulosos con su eje longitudinal en posición vertical, en los humanos, equinos, roedores y caninos el eje longitudinal se acerca mucho a la horizontalidad y son inguinales, en los suinos el eje se encuentra diagonal y en los felinos poseen una localización perineal (Galina, 2008).

Los testículos se sitúan dentro del escroto, el cual es un órgano especializado que permite el funcionamiento normal de los testículos, para lo cual actúa como órgano termorregulador. Esta formado por 2 bolsas cutáneas y por varias capas que de fuera hacia dentro son:

a) Piel: delgada elástica, lisa y untuosa que presenta diseminados pelos finos y cortos al igual que glándulas sebáceas y una gran cantidad de glándulas sudoríparas, estas últimas importantes por su contribución a la pérdida de calor en el testículo. Entre ambos testículos se encuentra un rafe escrotal longitudinal, que se continua por delante con el prepucio y por detrás con el perineo. A lo largo del rafe se forma un tabique que parte en dos bolsas al escroto, separando a los dos testículos.

b) Dartos: de color rojizo e íntimamente adherido a la piel, esta constituido por tejido fibroelástico y fibras musculares lisas que al contraerse o relajarse acercan o alejan del cuerpo a los testículos, el tejido conectivo de esta capa se extiende hacia adentro para formar el septo que divide la cavidad escrotal en dos compartimientos independientes, uno para cada testículo.

c) Fascia escrotal: derivada aparentemente de los músculos oblicuos abdominales y esta constituida principalmente por tejido conectivo laxo.

d) Fascia espermática externa: es una prolongación de la fascia oblicua externa de la pared abdominal.

e) Fascia cremastérica: formada por una doble capa de tejido conjuntivo laxo areolar y elástico y una fina capa de músculo estriado, además contiene fibras del músculo abdominal transversal que permiten la retracción de los testículos ya sea para protegerlos de traumas externos o ayudando a la termorregulación para obtener así la temperatura ideal para la espermatogénesis.

f) Capa parietal de la túnica vaginal: que contiene vasos y nervios.

g) Plexo pampiniforme: es un sistema de intercambio calórico, entre la sangre venosa con mayor temperatura y la sangre arterial con menor temperatura (Morgentaler *et al*, 1999, Zarco *et al*, 2000, Galina, 2008).

Existen porciones anteriores y posteriores del peritoneo que forman dos capas que recubren a los testículos durante su descenso. La porción peritoneal posterior forma la túnica vaginal visceral o lámina visceral alrededor del testículo donde se adhiere a la túnica albugínea del testículo, mientras que la túnica vaginal externa o lámina parietal procede del peritoneo del abdomen anterior y se encuentra adherido a la fascia espermática. Ambas son membranas serosas, pero el tejido conjuntivo laxo areolar de la túnica vaginal visceral se mezcla de manera imperceptible con el tejido conjuntivo de la túnica albugínea (Junqueira *et al*, 1983, Weiss *et al*, 1986, Alvarez *et al*, 1988, Zarco *et al*, 2000, Netter, *et al*, 2002).

Los testículos se encuentran rodeados por una gruesa capa fibrosa denominada túnica albugínea que se continúa con el mediastino testicular, el cual los divide en pequeños lóbulos a través de trabéculas fibrosas (Testut *et al*, 1992).

Histología del testículo

Arquitectura del tubo seminífero

Los tubos seminíferos están revestidos por una capa basal de tejido conectivo, que contiene fibras elásticas y células epiteliales o mioideas de forma aplanada. Sobre esta capa se dispone el epitelio seminífero, constituido por células sustentaculares o de Sertoli y células germinales en diferentes fases de diferenciación (Fig. 3).

#### Células de Sertoli

Las células de Sertoli son las únicas células somáticas presentes en el tubo seminífero. Durante el desarrollo fetal regulan la proliferación y desarrollo de las CGP. En la etapa postnatal actúan como regulador central del desarrollo y función testicular, además de ejercer un rol importante dentro de la espermatogénesis, a través de interacciones con las células germinales en desarrollo, regulan la actividad, función y supervivencia de las células de Leyding, (Johnston *et al*, 2004) y forman la barrera hematotesticular, al presentar entre ellas uniones estrechas dividen al epitelio seminífero en dos regiones: la región basal y la región ad luminal. La región basal contiene a las espermatogonias mientras que la región ad luminal contiene a los espermátocitos, espermátidas redondas y elongadas.

Las células de Sertoli intervienen en la diferenciación de las células germinales, se ha reportado que el número de células germinales, está directamente relacionado con el número de células de Sertoli (Griswold *et al*, 1998, Johnston *et al*, 2004).

Algunas sustancias secretadas por las células de Sertoli, importantes para la espermatogénesis son:

- a) Sustancias facilitadoras del transporte de iones, hormonas y bioprotectores como la proteína unidora de andrógenos (ABP), la transferrina y la celuloplasmina.
- b) Proteasas e inhibidores de proteasas, utilizadas principalmente en la remodelación del tejido durante la espermiación.
- c) Componentes estructurales de la membrana basal entre las células de Sertoli y las células peritubulares
- d) Factores de crecimiento y factores parácrinos como MIS, c-kit e inhibina

e) Cadherinas que intervienen en el mantenimiento de la arquitectura del epitelio germinal y en la adhesión de las células germinales.

Además de proveer sustento, factores de crecimiento y nutrientes dichas células poseen receptores para FSH y testosterona, las cuales son las principales hormonas reguladoras de la espermatogénesis; además expresan factores reguladores de apoptosis (Sofikitis, *et al*, 2005).

La regulación de la proliferación y actividad de estas células ya sea durante el desarrollo o en la vida post natal es crucial para asegurar una fertilidad normal durante la vida adulta (Johnston *et al*, 2004).

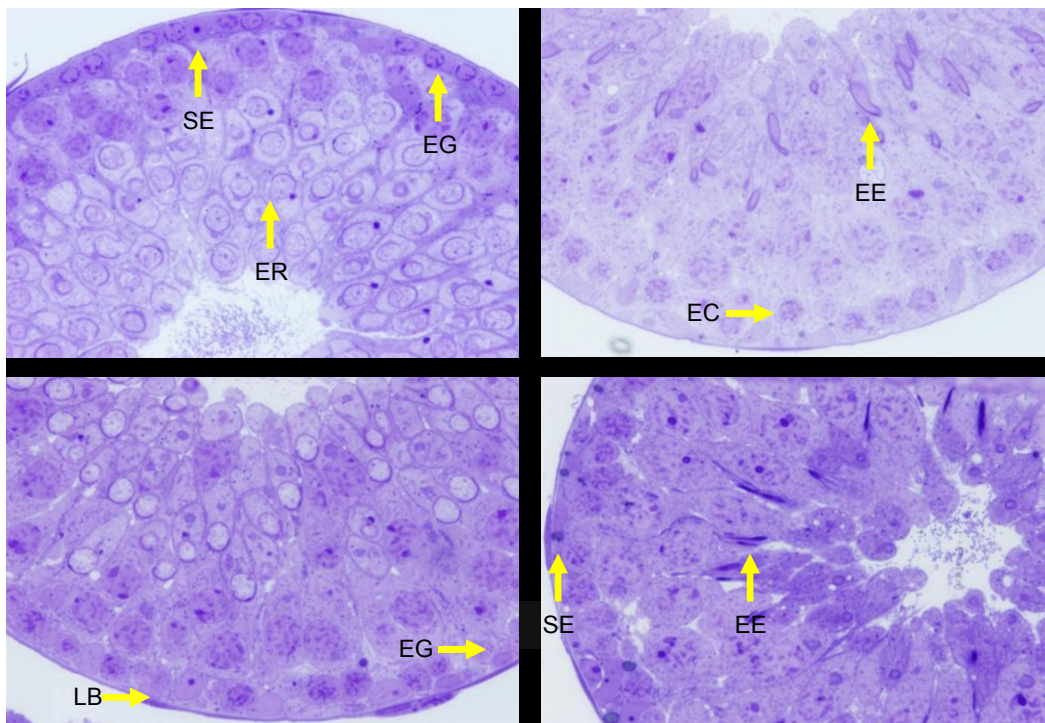


Fig 3

Microscopía de luz en la que se muestra la cito arquitectura normal del epitelio celular del tubo seminífero.

Lámina basal (LB), Células de Sertoli (SE), Espermatogonias (EG), Espermatocitos (EC),

Espermátidas redondas (ER)

Espermátidas elongadas (EE)

## 2.4 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un elaborado proceso cronológico de maduración celular, que tiene lugar en las paredes de los tubos seminíferos. Inicia con el proceso de proliferación,

división y diferenciación de las espermatogonias que finaliza con la formación de los espermatozoides (Cupps *et al*, 1987, Lesson *et al*, 1990).

El aporte hormonal y los factores medioambientales son importantes para el inicio de la espermatogénesis en los mamíferos. Se han encontrado una gran cantidad de genes como DEAH9, ranBP5, GC3, CG12 y CG14 involucrados en la regulación del proceso de diferenciación y maduración espermática, estos genes se han localizado en las espermatogonias, los espermatoцитos en paquíteno y las espermátidas redondas (Sofikitis *et al*, 2005).

La duración de la espermatogénesis en los mamíferos toma varias semanas y varía de acuerdo a las especies (Tabla 3).

Tabla 3. Duración de la espermatogénesis en algunas especies

<b>Especie</b>	<b>Duración (días)</b>
Bovinos	54
Ovinos	47.7
Equinos	49
Caninos	54.4
Suinos	34.4
Aves de corral	12.8
Rata	51.6-53.2
Ratón	35
Humano	74-76

Para la mayoría de las especies, la duración de la espermatogénesis puede ser dividida en cuatro etapas, que son denominadas espermatocitogénesis, meiosis, espermiogénesis y espermiación.

## 2.5 Espermatocitogénesis o fase de proliferación

El desarrollo de las células germinales es un proceso multifacético, que inicia durante la etapa fetal y continúa hasta la pubertad.

A las 4-6 semanas del desarrollo en el humano, las células germinales primordiales (CGP) o células *stem* migran de la parte caudal del saco vitelino hasta las crestas gonadales proliferando y diferenciándose en gonocitos (Fig. 4). Al nacimiento estas células son llamadas gonocitos neonatales y ocupan los tubos espermáticos pequeños y sin lumen que se encuentran rodeados de tejido intersticial que contiene principalmente células mesenquimatosas precursoras de las células de Leyding (Galina, 2008). (Fig. 4) Alrededor de los 3 meses postnatales en humanos, los gonocitos migran desde la posición central en los tubos seminíferos hasta entrar en contacto con la membrana basal de estos, donde empiezan a diferenciarse en espermatogonias tipo A0, a partir de las cuales se originaran los diferentes tipos de células germinales que permanecerán en arresto mitótico en fase G1-G0 hasta el inicio de la pubertad (Vigeras, *et al*, 2006).

La fase inicial de la espermatogénesis es la multiplicación mitótica de las espermatogonias, las cuales se localizan en la porción basal de los tubos seminíferos, este proceso coincide con un pico de secreción de LH, testosterona y MIS.

Las espermatogonias tipo A1, se dividen mitóticamente para formar espermatogonias tipo A2 y A3, aunque en algunas especies también se observan espermatogonias A4. Para los 3-4 años de edad en el humano, la espermatogonia tipo A2 comienza a diferenciarse en espermatogonia tipo B y finalmente en espermatoцитos primarios (Hutson *et al*, 2005, Sofikitis *et al*, 2005).

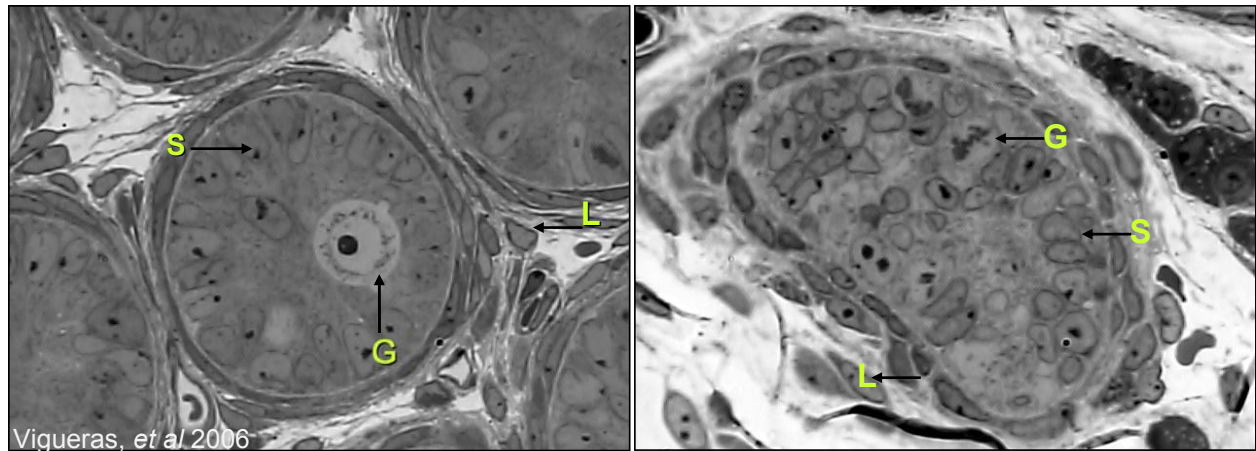


Fig. 4

Microscopía electrónica, de cordones seminíferos (1 dpp) con gonocitos (G) en proliferación, se observan también células de Sertoli (S) y células de Leydig (L) inmaduras.

Si bien la mayoría de las CGP se diferenciarán en gonocitos y estos a su vez en espermatogonias, que degeneraran en la fase de paquíteno por falta de estímulo hormonal antes de la madurez sexual (Galina, 2008) una pequeña cantidad de CGP permanecerá sin diferenciarse durante toda la vida del individuo, conservando la población de estas dentro del testículo actuando como un reservorio de células *stem*. Yamashita *et al* (2003) mencionan que la orientación de las CGP dentro de los tubos seminíferos juega un papel crítico en el mecanismo que asegura el balance entre la renovación de CGP y la diferenciación de estas en espermátidas.

Durante la madurez sexual, las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva. La división de las células germinales, al igual que el resto de las células del organismo se encuentra regulada por el ciclo celular, el cual consiste en varias fases y cuyo objetivo es la división ordenada y correcta de estas en dos, cuatro, seis, etc. número de células con el fin de asegurar la transmisión de la información genética a la siguiente generación (Smith, 1973, Cupps, 1987, Stillman, 1996).

## 2.6 Meiosis

Los espermatoцитos primarios resultantes de la división mitótica de las espermatogonias, entran en una nueva división celular denominada meiosis, que al igual que el ciclo celular es un proceso secuencial y ordenado en el que al final de este se obtendrán cuatro células hijas con un solo juego de cromosomas de la especie, (Fig. 5). Es importante resaltar que la meiosis solo se realiza en las células germinales de hembras y machos (Galina, 2008).

(Fig. 5)

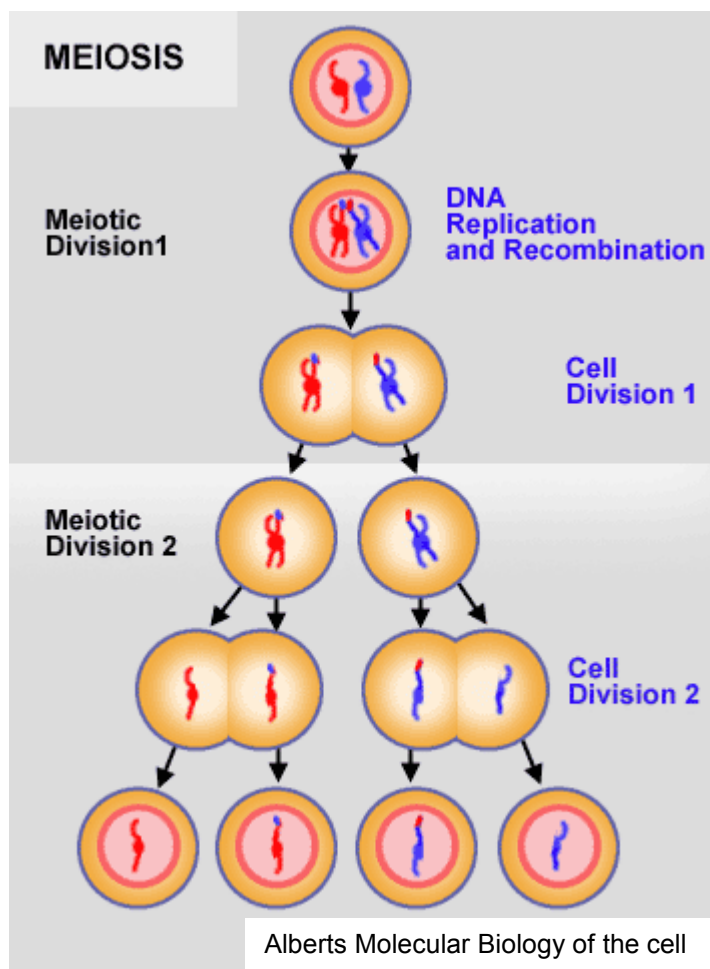


Fig 5

Esquema de la división meiótica, este proceso tiene lugar solo en las células germinales, ya que al finalizar se obtendrán cuatro células hijas haploides.



## 2.7 Espermiogénesis

La espermiogénesis es un proceso de metamorfosis, involucrado en la maduración y diferenciación de células germinales inmaduras hacia la formación de espermatozoides. Durante la espermiogénesis, ocurren alteraciones en las proteínas nucleares, talla y forma celular, la posición y tamaño de los gránulos del acrosoma y la localización de los centriolos con el fin de obtener una célula capaz de moverse por sí sola. Este fascinante proceso se encuentra regulado por mecanismos complejos y está dividido en cuatro fases: (Hafez, 2002).

Fase de Golgi: se caracteriza por la formación de gránulos pro-acrosómicos dentro del aparato de Golgi que se fusionan para formar un solo gránulo acrosómico de mayor tamaño, además del acercamiento del centriolo proximal al núcleo.

Fase de encasquetamiento: el gránulo acrosómico se dispersa en la superficie del núcleo de la espermatida hasta que dos tercios de la porción anterior del núcleo queda cubierta por un delgado saco membranoso adherido íntimamente a la envoltura nuclear. Durante esta fase los componentes axonémicos de la cola en desarrollo se alargan más allá de la periferia del citoplasma celular.

Fase acrosómica: el acrosoma se dirige a la pared externa del túbulo seminífero y se alarga alrededor del núcleo que a su vez toma una forma aplanada, así como la cola de la espermatida se dirige hacia la luz del tubo, la cromatina nuclear se condensa en gránulos densos, el citoplasma se ubica contrario al núcleo y los microtúbulos se asocian para formar el flagelo, las mitocondrias se ubican cerca del axonema, donde forman la vaina que caracteriza al segmento medio de la cola del espermatozoide. La remodelación del núcleo y el acrosoma de cada espermatida producen espermatozoides con características morfológicas específicas de cada especie.

Fase de maduración: esta fase comprende la transformación final de las espermatidas, la cromatina nuclear se compacta con protaminas y el flagelo culmina su desarrollo, el citoplasma excedente forma el cuerpo residual completando así la maduración final.

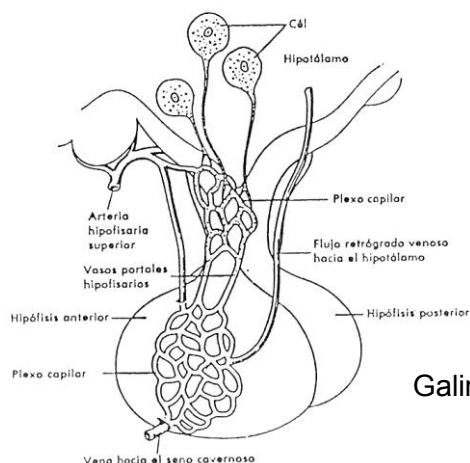
## 2.8 Espermiación

Este proceso consiste en la expulsión final de los espermatozoides hacia la luz del tubo seminífero mediante un proceso de exocitosis.

## 2.9 Regulación Hormonal

Mientras que en la hembra la ovogénesis se inicia durante la vida fetal, en el macho la espermatogénesis inicia en la pubertad, para lo cual es necesaria la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

El hipotálamo es el órgano central del sistema neuroendocrino, se encuentra formado por núcleos de neuronas altamente especializadas que tienen a su cargo diversas funciones. Así en el área preóptica y ventromedial se localizan las neuronas productoras de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que controla la secreción de las gonadotropinas hipofisarias como la FSH y la LH y en el núcleo arqueado se encuentran neuronas liberadoras de dopamina, sustancia que estimula o inhibe la secreción de hormonas hipofisarias. Entre el hipotálamo y el lóbulo posterior de la hipófisis existen conexiones neurales a través del sistema porta hipotalámico-hipofisiario que consiste en una red capilar que permite el paso de sustancias desde la eminencia media hasta la adenohipófisis sin pasar por la circulación general evitando que la concentración de hormonas sea diluída. Adicionalmente este sistema permite la circulación retrógrada de sustancias adenohipofisarias hacia el hipotálamo (Hafez, 2002, Galina, 2008) (Fig. 6).



Galina 2008

Fig. 6  
Sistema porta hipotalámico-hipofisiario que permite el paso de hormonas sin pasar por la circulación general.

La LH, secretada por la adenohipófisis estimula la producción de testosterona por las células de Leydig y de la FSH que actúa directamente en las células de Sertoli para la producción de factores necesarios para la espermatogénesis (Galina, 2008).

La presencia de la proteína unidora de andrógenos (ABP) inmunoreactiva en el citoplasma de las células de Sertoli que rodean a las espermátidas elongadas, sugiere la necesidad de elevadas concentraciones de andrógenos. De hecho algunos estudios reportan que concentraciones bajas de testosterona intratesticular provoca la apoptosis de las células germinales, además de favorecer la pérdida de adhesión entre las espermátidas redondas y las células de Sertoli (Kim, 2001, Sofikitis *et al*, 2005).

Por su parte la FSH, interviene en el reemplazamiento de las histonas por protaminas durante la espermiogénesis, además estudios en humanos reportan que la presencia de concentraciones elevadas de FSH estimulan a la célula a iniciar el proceso de meiosis II, mientras que Sousa (2002) reporta que concentraciones elevadas de FSH provoca la extrusión del flagelo en las espermátidas redondas.

Recientemente se ha demostrado la importancia de la insulina en el proceso de espermiogénesis, esto debido a la presencia de receptores para insulina en espermátidas redondas de humanos y ratas, lo que sugiere un papel importante tanto de esta hormona como del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF). Otra hormona que posee un papel dentro de este proceso es la prolactina, la cual se ha observado en espermátidas redondas y elongadas de borregos, sin embargo esta hormona no se ha observado en células germinales de ratas, sugiriendo una probable diferencia entre especies en las hormonas que regulan la espermiogénesis (Sofikitis, *et al*, 2005).

## 2.10 Ciclo del epitelio seminífero

La apariencia general de los tubos seminíferos es característica, ya que sus células están ordenadas y presentan una asociación celular definida, dando lugar así a las etapas del ciclo del epitelio seminífero que varían en número dependiendo de la especie (Tabla 4), para el caso de la rata se han descrito 14 etapas o asociaciones celulares diferentes y se clasifican con base al grado de desarrollo de la espermatida y la posición que ocupan los diferentes tipos celulares en el epitelio seminífero. Cuando se estudian los tubos seminíferos del testículo de cualquier especie es importante considerar que en un corte transversal de testículo encontraremos diferentes asociaciones celulares. La asincronía en la etapas del ciclo seminífero permite que día con día se maduren y produzcan espermatozoides listos para la espermiación de lo contrario existiría un ciclo espermático semejante al ciclo estral en donde únicamente en cierto día se presentaría la espermiación (Fig 7).

Tabla 4. Duración del ciclo del epitelio seminífero en diferentes especies

<b>Especie</b>	<b>Duración (días)</b>
Bovinos	13.5
Ovinos	10.6
Caprinos	10.4
Suinos	8.6
Equinos	12.2
Caninos	13.6
Ratas	12.5-13.3
Ratones	8.6
Humanos	16

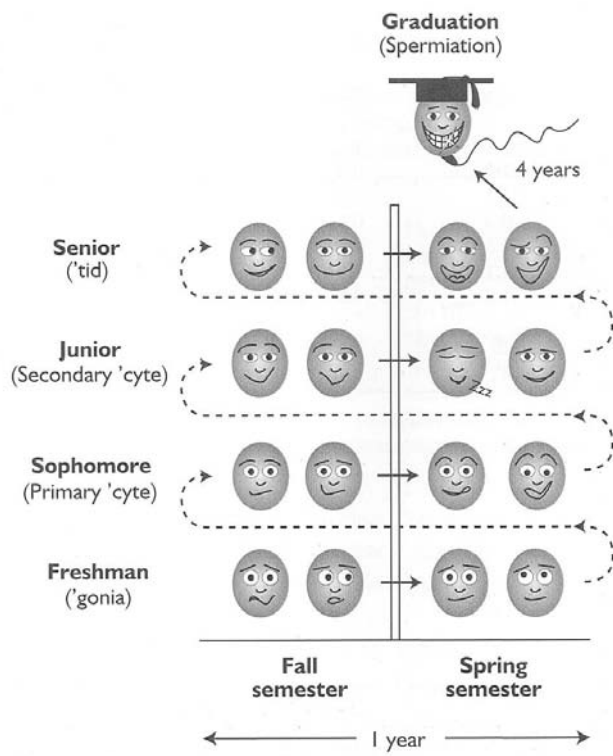


Fig 7 Esquema que muestra la asincronía del epitelio seminal, asegurando así la producción diaria de espermatozoides

Hafez, 2000

### **3 ANTECEDENTES**

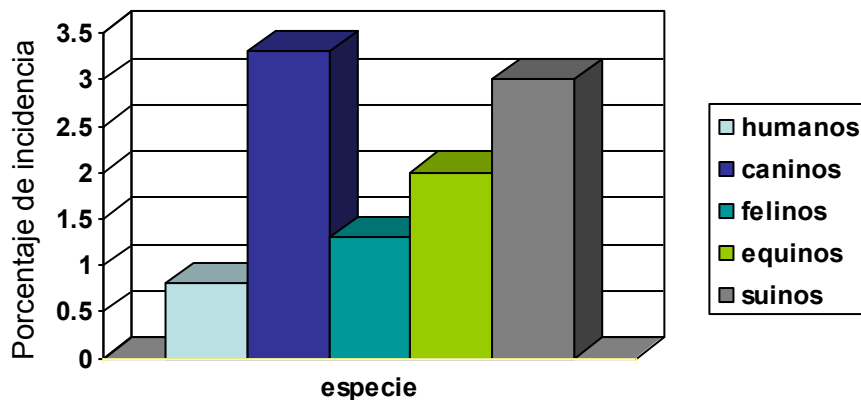
#### **3.1 Criptorquidia**

La temperatura en la que se encuentra el testículo en posición escrotal es de 1.5 a 2.0°C menor que la temperatura corporal. Esta localización es esencial para que se desarrolle una espermatogénesis normal, así como una función óptima del epidídimo (Campbell, 1959). Cuando el o los testículos no descienden ocurre lo que en la clínica se denomina como criptorquidia.

La criptorquidia es la alteración sexual masculina mas frecuente en los mamíferos, posee una heredabilidad moderada y tiene una expresión sexo específica. Es una alteración multifactorial, que incluye elementos genéticos, epigenéticos y ambientales (Hutson *et al*, 1997, Klonish *et al*, 2004, Hutson *et al*, 2005). Es común en el humano, caninos, felinos, equinos y suinos (Bernal-Mañas *et al*, 2005).

En el humano, la incidencia de la criptorquidia es de 2.6% al nacimiento, cifra que se incrementa en niños prematuros hasta el 30% pero a causa del descenso espontáneo en ambas poblaciones disminuye al 0.8% al año de edad (Husmann *et al*, 1995). En los animales domésticos, se reporta una incidencia del 3.3% en caninos; siendo mayor en perros de raza pequeña y con alta consanguinidad, en felinos se observa una incidencia de entre 1.0 y 1.3% (Mansfield *et al*, 2002, Yates *et al*, 2003), en equinos la incidencia varía de acuerdo a la raza y es mas frecuente en animales de razas pequeñas, (Cox *et al*, 1979), mientras que en suinos, la criptorquidia se reporta como una anomalía frecuente (Bernal-Mañas *et al*, 2005).(Gráfica 1) Por otra parte los testículos abdominales son menos frecuentes que los inguinales, comprendiendo únicamente del 5 al 10% de los casos de criptorquidia (Cox *et al* 1979, Abney *et al*, 1989).

Gráfica 1. Incidencia de criptorquidia en algunas especies

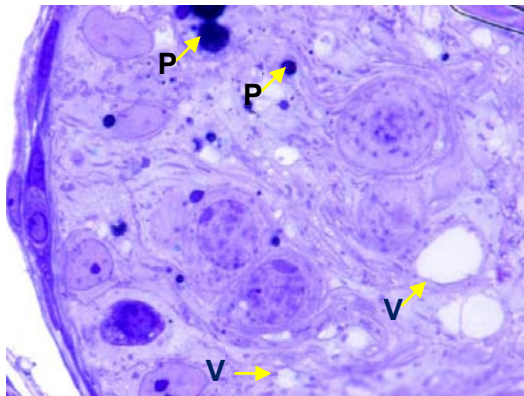


Una de las principales secuelas de la criptorquidia a largo plazo es la elevada probabilidad de desarrollar neoplasias testiculares (Farrer *et al*, 1985, Hinman, 1993; Viguera *et al*, 2001) y esterilidad. Aún corregida la criptorquidia se tiene un pobre incremento en el porcentaje de fertilidad, siendo mayor el porcentaje en criptorquidias unilaterales (Elder, 1988). También se ha reportado una reducción en el peso testicular y en la población de células

germinales en el testículo contralateral a la criptorquidia unilateral (Srinivas *et al*, 1998, Zakaria *et al*, 1998).

Los problemas en la fertilidad se asocian a la degeneración del epitelio germinal inducido por el estrés calórico de la condición criptorquídica (Chowdhury *et al*, 1970, Bogh *et al*, 2001, Kumagai *et al*, 2002) (Fig. 8).

Este aumento de la temperatura provoca daño en el epitelio germinal durante los primeros meses de vida, debido a una disminución en la secreción de gonadotropinas y testosterona fetales, lo cual produce alteraciones en la diferenciación de los gonocitos en espermatogonias maduras y la consecuente degeneración de las células inmaduras. Además el daño al epitelio germinal se debe a un desbalance entre la producción de enzimas antioxidantes y radicales libres causado por el estrés calórico durante el tiempo que permanezca la condición criptorquídica (Canavese, 1998).



Corte longitudinal de testículo de rata con criptorquidia

Fig. 8  
Sección semifina de testículo de rata con criptorquidia. Se pueden observar algunas alteraciones del epitelio como: vacuolización (V), picnosis (P), descamación celular y ausencia de varios tipos celulares, debido a la degeneración ocasionada por la criptorquidia.

### 3.1.1 Etiología

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



- A) Fallas en la producción de INSL3, testosterona o MIS. Se sugieren deficiencias en la producción de gonadotropina coriónica placentaria, la cual estimula la producción de testosterona en la segunda mitad de la gestación, por lo que su deficiencia provocaría una migración deficiente del gubernaculo y del testículo de la región inguinal al escroto (Hutson, 2005).
- B) Altos niveles de estradiol en las etapas tempranas de la gestación, al ocasionar una disminución significativa de testosterona, así como atrofia de las células de Leydig a causa de las alteraciones en la secreción de las gonadotropinas (Hadziselimovic, 1987).
- C) Disfunción hormonal constituida por distintas alteraciones como el síndrome de Kalman, aplasia, síndrome de Reifenstein, síndrome de feminización testicular (Weidner *et al*, 2002).
- D) Disfunción mecánica causada por presencia de obstáculos mecánicos que se oponen a la migración testicular como: anomalías en el gubernáculo, inexistencia del canal inguinal, diafragmas a nivel del conducto inguinal o hernias inguinales (Weidner *et al*, 2002).
- E) Daños en el nervio genitofemoral (NGF) previniendo la contracción gubernacular (Hutson, 1997).

### **3.1.2 Tratamientos**

#### Quirúrgico

La corrección quirúrgica a temprana edad puede ser benéfica para la fertilidad, debido a que tanto estudios clínicos como experimentales, han demostrado que el o los testículos retenidos en posición abdominal experimentan regresión progresiva por lo que la cirugía es potencialmente preventiva mediante la recolocación de los testículos en el escroto lo que permite en algunos casos la fisiología normal testicular al restaurar la temperatura correcta, (Hutson *et al*, 2005) ya que una de las principales causas de la degeneración del epitelio

seminífero es la elevada temperatura a la que se somete el testículo en la región abdominal (Zhou, 1996).

La terapia quirúrgica u orquidopexia, consiste en el descenso manual del testículo y la localización de este en el escroto. Estudios indican la disminución de daños histológicos así como la restauración de la secreción hormonal del testículo si esta técnica es realizada durante el primer año de vida en humanos (Canavese, 1998).

## Hormonal

Esta terapia ha sido abordada tanto para inducir el descenso testicular así como para crear las condiciones óptimas (desarrollo del escroto, elongación del cordón espermático, etc.) para poder realizar el descenso testicular.

El tratamiento hormonal fue introducido desde 1930, la primera hormona empleada fue la gonadotropina coriónica humana (hCG), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la combinación de estas (Happ, 1978, Hadziselimovic, 1987, Pyörälä S, 1995) Sin embargo estudios recientes mencionan el empleo de LH sola o combinada con GnRH obteniendo resultados favorables al emplear la mezcla de ambas hormonas (Canavese, 1998).

El principal objetivo de la terapia hormonal, además de promover el descenso testicular es restaurar un ambiente endocrino normal que promueva la cascada de eventos que llevan a la maduración de las células germinales (De Matteis *et al*; 1998, Lala, 1993; Viguera *et al*, 1999). Se ha reportado que la aplicación de terapia hormonal (GnRH, LH) durante el primer año de vida en humanos podría restaurar la insuficiencia de gonadotropinas y testosterona combinado con el descenso testicular (Canavese, 1998).

Sin embargo a pesar de que la criptorquidia sea corregida por alguno de los dos tratamientos, a futuro se presentan problemas en la fertilidad. Esto debido a que los problemas de la fertilidad en la condición criptorquídica, se encuentran asociados con la degeneración del epitelio germinal causado por el estrés calórico (Fig. 8) (Chowdhury, 1970; Kumagai *et al*, 2002). El estrés calórico induce la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) ya sea

en el testículo o en el espermatozoide, sin embargo el origen de las EROs es desconocido. (Alvarez Dorantes, 1985; Ahotupa, 1992, Ikeda *et al*, 1999; Ishii *et al*, 2005).

### 3.2 Radicales libres

El metabolismo celular aeróbico, al utilizar dioxígeno ( $O_2$ ) como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria causa inevitablemente la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que son capaces de oxidar cualquier macromolécula a su alcance (ADN, lípidos y proteínas). La ventaja que presenta el dioxígeno para la obtención de energía por medio de cadenas de transporte de electrones lleva a olvidar su toxicidad, debido a que es un radical altamente energético.

El dioxígeno es un radical, ya que presenta dos electrones no apareados pero de *spin* o giro paralelo, por lo cual no es *per se* altamente reactivo. No obstante existen otras formas más reactivas de oxígeno, tales como el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el ozono ( $O_3$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (proradical). En realidad son poco reactivas pero su toxicidad radica en que a partir de ellas se generan especies mucho más tóxicas como el radical hidroxilo ( $HO^\cdot$ ) y el oxígeno en singlete ( $O_2$ ), ambos son formados como productos finales de la interacción de los EROs. Cuando el  $H_2O_2$  se reduce con metales divalentes como el hierro y el cobre aceptando un electrón no apareado se produce el radical  $HO^\cdot$  por medio de la reacción de Fenton. Por otra parte, el  $O_2$  se genera por la excitación del dioxígeno, la dismutación espontánea de  $O_2^-$  y la descomposición de  $H_2O_2$  (Halliwell *et al*, 1990). Además de ser poderosos oxidantes celulares reaccionan rápidamente con el ADN, las proteínas y los lípidos produciendo daños y cambios estructurales en las células que muchas veces son irreversibles.

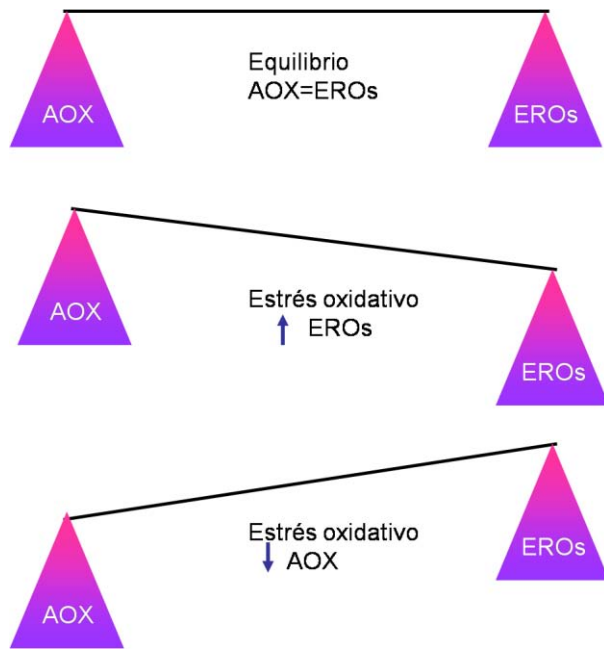


FIG. 9

El desbalance entre la producción de EROs y enzimas antioxidantes pueden provocar estrés calórico, sin embargo la producción de EROs en bajas cantidades es necesaria para la realización de ciertos procesos fisiológicos. Antioxidantes (AOX) Especies reactivas de oxígeno(EROs)

La generación de las EROs ocurre constantemente durante el metabolismo normal de cualquier célula del cuerpo, siendo el ambiente aeróbico una fuente constante de estos, algunas células

poseen mecanismos para su producción ya que en bajas concentraciones son necesarios para la realización de ciertas funciones celulares, tales como la capacitación espermática (Halliwell *et al*, 1989, Yu, 1994, Agarwal *et al*, 2004) (Fig. 9). El desbalance entre la producción y la eliminación de EROs intracelularmente a favor de su producción se denomina estrés oxidativo (Diemer *et al*, 2003, Díaz-Acosta *et al*, 2006) (Fig. 9).

La acción sinérgica del sistema de enzimas antioxidantes es esencial en la protección contra el daño producido por las EROs. Varios sistemas antioxidantes están presentes para ayudar a proteger contra el daño producido en las células, (Chapple, 1997, Sanoka, 2004) tales como enzimas antioxidantes: la glutatión, la catalasa y la superóxido dismutasa que actúan atrapando radicales libres y como donadores de electrones. El sistema oxido-reducción (Redox) dona electrones con el fin de estabilizar a las sustancias pro radicales y algunas proteínas

antioxidantes que intervienen en la expresión genética, también donan electrones y sirven como sustrato para la síntesis de enzimas antioxidantes (Fujii *et al*, 2003).

Durante el desarrollo de la espermatogénesis, diferentes tipos celulares muestran variaciones remarcables en su susceptibilidad a estímulos estresantes, por ejemplo las espermatogonias son más sensibles al daño causado por rayos X, mientras que las espermátidas redondas son altamente susceptibles a los agentes alquilantes como la ciclofosfamida. Una respuesta diferencial al estrés calórico ha sido reportada, observándose una alta resistencia por parte de las espermatogonias y los espermatozoides, mientras que los espermatoцитos y las espermátidas redondas presentan una alta susceptibilidad al estímulo; desencadenando una amplia gama de respuestas celulares como: apoptosis, reparación del ADN y respuesta de choque térmico (Aguilar-Mahecha *et al*, 2001). Bauche *et al*, 1994) proponen que los espermatoцитos y espermátidas son células vulnerables a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ya que se conoce que la proporción de sus enzimas antioxidantes son diferentes a las encontradas en las células de Sertoli y células peritubulares. También se ha reportado un aumento de EROs en el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas durante la espermatogénesis indicando que el sistema reproductivo por sí mismo genera altos niveles de EROs (Fujii *et al*, 2003).

Las células germinales cuentan con un elevado sistema endógeno antioxidante de superóxido dismutasa (SOD) y reducido sistema para glutatión (GHS) que incluye a glutatión peroxidasa (GHS-px), glutatión reductasa (GHS-rd) y glutatión-S-transferasa (GHST). También se sabe que los espermatoцитos y las espermátidas son capaces de convertir  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , pero con mayor dificultad metabolizan  $H_2O_2$  y llevan a la saturación de un sistema protector contra peróxido. Por lo tanto el peróxido formado puede convertirse en radical hidroxilo.

Los genes que se expresan bajo condiciones de estrés son expresados diferencialmente durante la espermatogénesis, confinando el estado específico de la susceptibilidad de las células germinales al estrés. Se han encontrado una alta cantidad de factores apoptóticos y antiapoptóticos durante las primeras etapas de la espermatogénesis, lo cual propone una

elevada capacidad de las células para activar señales de muerte o sobrevivencia celular que regulan la apoptosis durante el desarrollo de las células germinales. También se ha observado un aumento en el patrón de expresión de genes en ciclo celular, afirmando su importancia en los mecanismos de supervisión de daño al DNA que tiene lugar durante la meiosis en los espermatocitos. Se ha reportado un aumento en la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) durante las respuestas al estrés, así como en espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas en estados fisiológicos (Aguilar-Mahecha *et al*, 2001, Díaz-Acosta *et al*, 2006).

Los niveles de algunas enzimas como la GHS son bajos en las espermatogonias, los espermatocitos y las espermátidas. Sin embargo, se localizan en grandes cantidades en las células de Sertoli, en contraste con el incremento en los niveles de la SOD y la hemooxigenasa 2 (HO-2) durante la espermatogénesis, la cual es expresada en grandes cantidades en el cerebro y el testículo además de ayudar al desarrollo celular (Aguilar-Mahecha *et al*, 2001, Kaneko *et al*, 2002). El GHS posee una amplia gama de funciones, entre las que se encuentran el mantenimiento de las células en un estado reducido sirviendo como donadores de electrones para ciertas enzimas antioxidantes, posee un rol importante durante la espermatogénesis y en el mantenimiento de la calidad espermática durante su maduración y almacenamiento en el epidídimo. Un aumento excesivo en la producción de las EROs puede disminuir el mecanismo de protección antioxidante de lípidos y/o proteínas en espermatozoides, ya que estas células son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, plasmalógenos y espingomielinas que le dan flexibilidad y habilidad funcional a las células espermáticas. Aunque altas concentraciones de EROs son dañinas para los espermatozoides, se han reportado niveles mínimos de EROs requeridos para la maduración de estos (Kaneko *et al*, 2002).

La generación de las EROs en los organismos puede ser causada por diversos factores, tales como: radiación ionizante, células inflamatorias, aumento en el metabolismo celular, descompartmentalización de metales de transición, activación de oxidasas y oxigenasas, pérdida de la capacidad antioxidante, estrés calórico, entre otras (Sanoka *et al*, 2004).

### **3.3 Estrés calórico.**

Cuando hay un aumento en la temperatura las células presentan una condición denominada estrés calórico, la respuesta de las células al estrés calórico, es un aumento en la transcripción de genes que inician la síntesis de un pequeño grupo de proteínas, denominadas proteínas de choque térmico (hsp), entre las que se incluyen HSP90, HSP70, and HSP 20-30 y ubiquitina las cuales siempre están presentes en las células, aunque su concentración aumenta en situaciones de estrés. Se encuentran altamente conservadas sugiriendo un papel vital de estas para la sobrevivencia del organismo (Schlesinger M, 1986, Shikone et al, 1994). Estudios recientes demuestran una mayor sensibilidad al estrés calórico cuando las células se encuentran en crecimiento o replicación, como es el caso de las células germinales (Delgado - Olivares, *et al*, 2006).

### **3.4 Radicales libres y criptorquidia.**

Los problemas en la fertilidad se asocian a la degeneración del epitelio germinal provocado por el estrés calórico de la condición criptorquídica (Chowdhury *et al*, 1970, Arighi, 1987, Bogh *et al* 2001, Kumagai *et al*, 2002). Se conoce que la criptorquidia experimental en la rata adulta tiende a incrementar la peroxidación lipídica, la cual es un signo de estrés oxidativo, causado por EROs (Ahotupa *et al*, 1992, Viguera *et al*, 2008).

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno causan daño al tejido por diversos mecanismos que incluyen daño al DNA, peroxidación lipídica y daño a proteínas (Diemer *et al*, 2003), los cuales llevan a cambios degenerativos como la apoptosis o necrosis (Buttke *et al*, 1994, Viguera *et al*, 2008).

Aunque se propone que los niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el testículo criptorquídico son elevados (Ikeda *et al*, 1999, Ishii *et al*, 2005) el origen de estos no se conoce. Se ha propuesto que uno de los EROs producidos es el anión superóxido que es reducido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que al administrar catalasa previo a estrés por calor en células testiculares

esta mostró un significativo efecto protector en dichas células (Ikeda *et al*, 1999). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene la facilidad de convertirse a radical hidroxilo que es altamente tóxico debido a su rápida distribución en la célula. Otra fuente posible de especies reactivas es el oxido nítrico (ON) que es un gas altamente reactivo. De las diferentes formas de oxido nítrico sintasa (NOS) la forma endotelial (eNOS) tiene un papel en la apoptosis de las células germinales en el testículo humano (Buttke *et al*, 1994) estudios reportan el efecto de los inhibidores de NOS tales como el sustrato competitivo N-nitro-L-arginina methyl ester (L-NAME) en la mejora de la función testicular en ratas en condiciones criptorquídicas.

Cuando hay un desbalance entre la producción de EROS y enzimas antioxidantes, como ocurre en la criptorquidia, se provoca la activación de ciertos genes, los cuales provocan la apoptosis de las células germinales (Tabla 5). Durante la espermatogénesis, la apoptosis es un proceso normal durante el desarrollo testicular, los picos de pérdida de células germinales se han observado dentro de tres fases de la espermatogénesis: durante la división mitótica de las espermatogonias tipo A, durante la división de los espermatocitos y durante la espermiogenesis (Billing *et al*, 1996). Pero cuando esto sobrepasa las condiciones normales se presenta un cuadro patológico.

TABLA 5

Genes involucrados en la supresión o iniciación de apoptosis en diferentes tejidos (Billing *et al*, 1996)

<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Origen</b>
Ced-9	Previene apoptosis	Nematodos
Bcl-2	Previene apoptosis	Mamíferos
Bax	Inhibe a bcl-2	Mamíferos
Bcl-x forma alargada	Previene apoptosis	Mamíferos
Bcl-x forma corta	Promueve apoptosis	Mamíferos



A1	Previene apoptosis	Mamíferos
Bak	Promueve apoptosis	Mamíferos
Ced-3	Promueve apoptosis	Nemátodos
Ced-4	Promueve apoptosis	Nemátodos
Ice	Promueve apoptosis	Mamíferos
Nedd-2/Ich-1	Promueve apoptosis	Mamíferos
Apopain/cpp32	Promueve apoptosis	Mamíferos

---

### 3.5 Antioxidantes

#### 3.5.1 Melatonina

La melatonina es una molécula altamente conservada derivada del triptófano su presencia puede ser rastreada hasta los ancestros de los procariotas fotosintéticos. Es capaz de cruzar todas las barreras morfofisiológicas como la barrera hematoencefálica o placentaria y esparcirse por toda la célula haciéndola altamente biodisponible (Oaknin-Bendahan *et al*, 1995, Ravindra *et al*, 2006).

Se sabe que es un inductor del sueño, una señal química de la luz y la oscuridad, así como un regulador del ciclo reproductivo en animales con ciclos estacionales como los ovinos, caprinos, equinos y algunos roedores. Utilizando fluctuaciones endógenas de melatonina, los vertebrados sincronizan los ritmos circadianos, así como las actividades reproductivas circanuales. Se ha observado una considerable variabilidad individual en su actividad secretoria, además de ser influenciada por la edad y género; disminuyendo conforme la edad y siendo mayor en hembras que en machos. También se ha observado una disminución de esta en condiciones patológicas como: problemas cardiacos coronarios, esquizofrenia y cáncer (Ravindra *et al*, 2006, Tan *et al*, 2007).

Originalmente se creía que la melatonina solo se sintetizaba en la glándula pineal, estudios recientes han reportado su producción en tejidos como: retina, placenta, ovarios, testículos, huesos; (Fig. 10) aumentando su producción en órganos sometidos a ambientes hostiles como: piel e intestino y también en órganos que consumen altas cantidades de oxígeno como pulmones y cerebro (Tijmes *et al*, 1996, Tan *et al*, 2007).

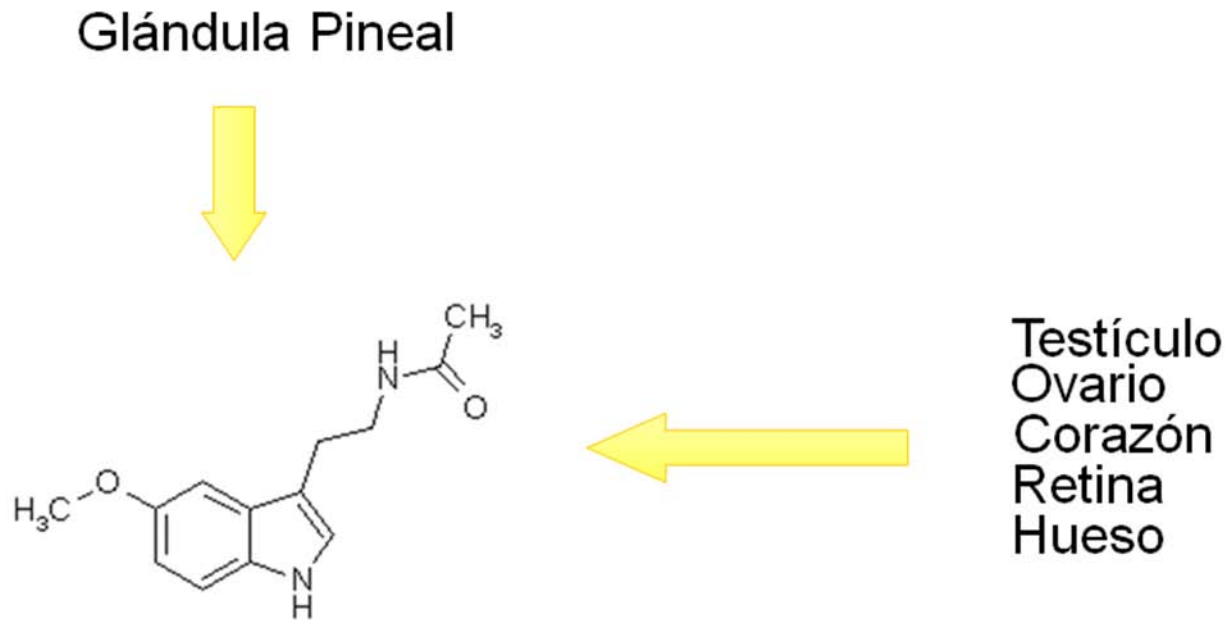


Fig. 10 Sitios de síntesis de melatonina en el organismo

Un fenómeno interesante, es que la melatonina producida fuera de la glándula pineal, parece no contribuir significativamente en la regulación de los ritmos circadianos, así como la síntesis de melatonina extrapineal parece no estar regulada por los cambios luz-oscuridad, estudios con animales en los que se extrae la glándula pineal así lo demuestran (Vakkuri *et al*, 1985, Vaughan *et al*, 1986).

Se sabe que la melatonina generada localmente es consumida por los tejidos en los cuales es producida como respuesta a condiciones de estrés oxidativo.

### 3.5.2 Biosíntesis

El precursor inicial es el aminoácido triptófano. Se cree que existen dos enzimas que juegan un papel importante dentro del proceso: la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT) y la enzima hidroxindol O-metiltransferasa (HIOMT), estudios recientes reportan que una vez iniciada la producción de melatonina por la activación de AA-NAT esta es limitada por el nivel de HIOMT (Tamarkin *et al*, 1985, Tan *et al*, 2007) (Fig. 11).

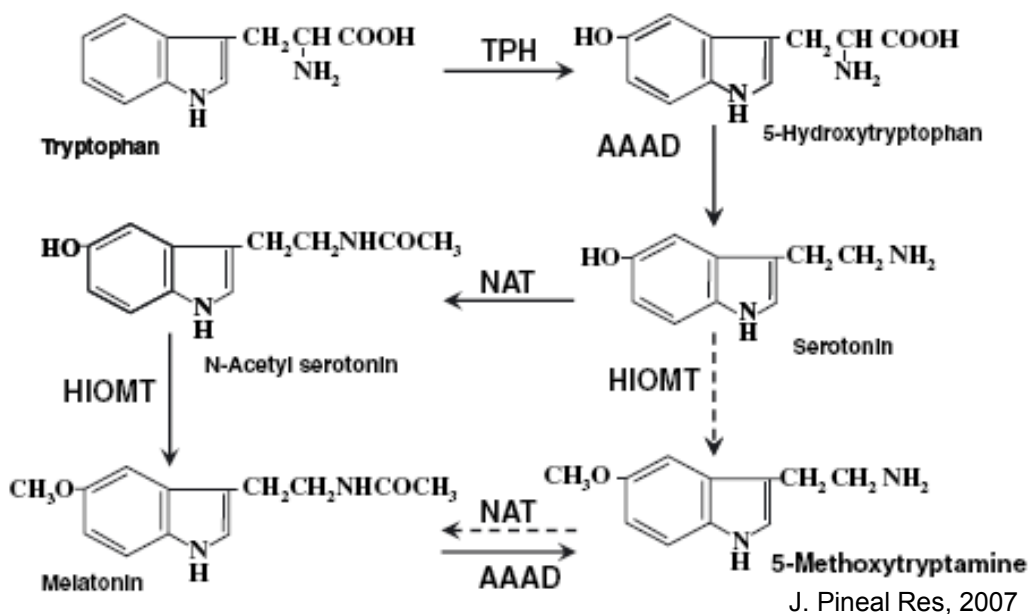


Fig 11 Síntesis de melatonina, la producción se inicia con la activación de la enzima AA-NAT, que encuentra un factor limitante con la enzima HIOMT. Journal Pineal Research, 2007

Actúa a través de receptores celulares específicos, de los cuales se conocen dos tipos: uno de membrana, acoplado con la proteína de unión al GTP; y otro nuclear, miembro del grupo de los receptores huérfano-retinoides. Pero se describen otros mecanismos de acción, no mediados por receptores, como la unión a la calmodulina citosólica a través de la cual modula las señales de calcio y las proteínas de la estructura citoesquelética. Reconoce variados tejidos

y órganos dianas, e influye en funciones como la inducción del sueño, las del sistema inmune y los mecanismos de oxidación-reducción (Romero *et al*, 2002).

La melatonina es metabolizada en el hígado por enzimas microsomales; alrededor del 50-80% de melatonina producida es convertida en el principal metabolito: 6-hidroxi sulfato melatonina. Posteriormente la melatonina es rápidamente liberada al torrente sanguíneo para difundirse a otros fluidos corporales como la saliva, fluido ovárico folicular y semen (Ravindra *et al*, 2007). Estudios recientes en humanos han demostrado una correlación positiva entre la cantidad de melatonina sérica y dentro del semen, observándose una marcada reducción en los niveles de melatonina en grupos de individuos que presentan infertilidad sugiriendo que la melatonina pudiera estar relacionada con la modulación del eje neuroendocrino reproductivo en machos con infertilidad. Además de que en grupos de pacientes con infertilidad que presentan una reducción en la motilidad espermática, leucocitospermia y varicocele no obstructiva se observaron niveles reducidos de melatonina en semen (Awad *et al*, 2006).

### **3.5.3 Antioxidante**

La melatonina es un potente agente antioxidante; no solo es un atrapador directo de: anion peroxinitrito, (el cual es producto de la reacción del superóxido y oxido nítrico) (Um *et al*, 1996, Abasiyanik *et al*, 2004), oxígeno singulete, radical súper óxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo, (Ravindra *et al*, 2006) sino que además estimula la actividad endógena de varias enzimas antioxidantes como glutathion peroxidasa, glutathion reductasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenada, superóxido dismutasa y catalasa, al mismo tiempo inhibe la enzima pro oxidativa oxido nítrico sintaza (Montilla *et al*, 1997).

El radical peroxido producido durante la oxidación de ácidos polinsaturados es atrapado por la melatonina con una eficiencia mayor que la vitamina E, además de proteger lípidos membranales, proteínas en el citosol, ADN en el núcleo y la mitocondria del daño de los radicales libres reduciendo la severidad de las enfermedades con radicales libres implicados. Es más efectiva en concentraciones fisiológicamente tolerables cuando se compara con otros

atrapadores de radicales libres como la vitamina E y glutathion entre otras (Tan *et al*, 1993, Hampton *et al*, 1997, Abasiyanik *et al*, 2004, Ravindra *et al*, 2006).

El proceso mediante el cual la melatonina y sus metabolitos atrapan EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) es mediante una cascada atrapadora de radicales libres la cual la hace altamente efectiva aún en bajas concentraciones, una molécula de melatonina tiene el potencial para atrapar 4 o mas moléculas de especies reactivas (Tan *et al*, 2007).

Su lipofilidad e hidrofiliidad provoca que la melatonina rápidamente entre a la célula y se acumule en el núcleo (Barlow-Walden *et al*, 1995; Antolin *et al*, 1996; Kim *et al*, 2006) protegiendo al ADN contra el daño oxidativo (Wakatsuki *et al*, 1999; Fei *et al*, 2002; Mao *et al*, 2006). Se ha demostrado que la melatonina incrementa los niveles de mRNA para glutathion peroxidasa y superóxido dismutasa en la corteza cerebral de la rata (Peltola *et al*, 1995; Wakatsuki *et al*, 1998). Gorman y Yellon (1996) han demostrado que la melatonina estimula el desarrollo del testículo (Abasiyanik *et al*, 2004), además se ha reportado que la melatonina previene el daño bioquímico e histopatológico por liberación de EROs en la torsión testicular (Valenti *et al*, 2002). Sainz *et al* (2003) reportaron que la melatonina neutraliza directamente las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, además de estimular la síntesis de enzimas antioxidantes y reducir la síntesis de enzimas pro oxidantes, por lo que el interés del uso terapéutico de la melatonina se ha incrementado recientemente, especialmente en enfermedades en donde la pérdida celular es un componente importante como en la criptorquidia.

Tomando en cuenta todas las propiedades de la melatonina, resulta interesante estudiar su papel en una condición patológica generadora de EROs debido al estrés calórico característico de la criptorquidia.

#### **4 HIPOTESIS**

Si las alteraciones morfológicas en el epitelio seminífero son debidas a la generación de EROs, entonces la administración de un neutralizador de EROs y estimulador endógeno antioxidante como la melatonina, se reducirá el daño histopatológico al epitelio.

#### **5 OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto protector de la melatonina en ratas neonatas con criptorquidia inguinal inducida quirúrgicamente.

##### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Evaluar en testículos de rata con criptorquidia experimental y administración de melatonina:

- a) La producción de EROs
- b) La morfología testicular
- c) La apoptosis
- d) La proliferación celular

## **6 MATERIAL Y METODOS**

Se emplearon 48 ratas macho de la línea Wistar de 10 días post parto (dpp) (día 1=día del nacimiento) las cuales fueron alojadas con las madres en cajas colectivas con alimento y agua a libre demanda hasta el día 21 cuando se destetaron y se colocaron en cajas individuales. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a los principios éticos y regulación especificada por la Norma oficial mexicana NOM-062-200-1999 descrita en el diario oficial el 22 de agosto de 2001 y según el reglamento interno del Instituto Nacional de Pediatría.

A 24 animales se les practicó la criptorquidia quirúrgica unilateral, el resto de los animales sirvieron como controles sanos sin administración de melatonina y controles sanos con administración de melatonina. Los animales criptorquídicos y controles fueron distribuidos en 4 grupos de 12 animales cada uno y se sacrificaron a los 40 dpp. A 6 animales por grupo se les determinó en ambos testículos la cantidad de EROs y a los 6 restantes se les realizó el análisis histológico. Los grupos fueron dispuestos como sigue:

GRUPO 1: Animales control sano sin procedimiento quirúrgico ni farmacológico (grupo CS sin administración de melatonina).

GRUPO 2: Animales control sano sin procedimiento quirúrgico y administración de 10mg/Kg de melatonina (N-acetyl-5metoxitriptamina, SIGMA) diariamente durante 15 días, a partir del día 25 post parto por vía intraperitoneal (grupo CS con administración de melatonina).

GRUPO 3: Animales con criptorquidia experimental unilateral y administración de solución salina por vía intraperitoneal (grupo criptorquidico sin administración de melatonina).

GRUPO 4: Animales con criptorquidia experimental unilateral y administración de 10mg/Kg de melatonina (N-acetyl-5metoxitriptamina, SIGMA) diariamente durante 15 días, a partir del día 25 post parto (grupo criptorquidico con administración de melatonina).

## **6.1 Procedimiento quirúrgico**

Se realizó la técnica quirúrgica para inducir criptorquidia unilateral del testículo izquierdo a los 10 días postparto. La técnica empleada fue la descrita por Shono *et al* (1996), la cual consistió en la exposición extra-abdominal del gubernáculo a través de una incisión inguinal transversal fijándolo a la fascia de la ingle con sutura no absorbible de nylon 6-0 impidiendo así el descenso testicular. Como anestésico se administro, vía intramuscular hidroclocluro de xilazina (10mg/Kg.) y Ketamina (80mg/Kg.) y como analgésico se empleo dipirona (5mg/kg).

## **6.2 Procesamiento del material biológico**



Los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia a los 40 días post parto y se les practico la exploración post-mortem. Se corrobora la ubicación de los testículos: criptorquídico izquierdo y escrotado contralateral derecho o ambos testículos escrotados en el caso de los grupos control, se disecaron y pesaron. Los testículos que se destinaron para la determinación de EROs fueron lavados con solución salina y colocados en hielo, mientras que los testículos para análisis histológico fueron lavados a través de la arteria espermática con solución salina, la mitad de cada testículo fue procesado para su inclusión en EPON o en parafina.

### **6.3 Determinación de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (EROs)**

Las EROs fueron determinadas por el método basado en la formación de 2´7´-diclorofluoresceina (DCF) en el tejido testicular, adaptado para experimentos *in vivo*. Los resultados fueron expresados como mg/DCF/mg de proteína/ml.

### **6.4 Índice histopatológico y área epitelial**

Se obtuvieron cortes semifinos de 1µm de grosor, teñidos con azul de toluidina al 0.5% y se montaron en porta objetos para su estudio.

El análisis histológico se realizo en el microscopio óptico por un solo observador. Por cada animal se observaron de 20 a 30 secciones transversales de tubos seminíferos. El índice histopatológico (IHP) fue evaluado mediante la sumatoria del puntaje asignado por daño histopatológico (Anexo 1) mediante una escala de cuantificación otorgando un valor según el daño (0 a 6) (Vigueras *et al*, 2008).

El grado de maduración celular fue determinado a través del índice de Johnsen.

La determinación del área del epitelio seminífero se realizo mediante un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 5.1) evaluando únicamente cortes transversales.

## **6.5 Apoptosis celular**

Para este fin se llevó a cabo la técnica de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, laboratorios Santa Cruz). Las muestras de testículo fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 18 hrs. Posteriormente se procesaron para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor, colocándose en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Las laminillas se desparafinaron e hidrataron en alcoholes graduales. Para lograr la identificación de las células germinales, en primer lugar se contrastaron con DAPI de la siguiente forma: se lavaron con solución balanceada de Hank y se incubaron con DAPI (SIGMA, México) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ , posteriormente se incubaron en proteinasa K durante 30 minutos, y se les colocó una solución de bloqueo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.3% en metanol. Se lavaron con PBS y se incubaron en una solución permeabilizadora de tritón X-100. Se lavaron con PBS y las laminillas, que sirvieron como controles positivos, se incubaron con DNasa y se lavaron en PBS incubándose posteriormente en la solución de TUNEL (Roche Diagnostic Corporation, USA). Todas las laminillas se lavaron con PBS y se montaron para su observación al microscopio de fluorescencia. Se determinó el índice apoptótico (IA) en cortes transversales considerando el número de células apoptóticas en relación a la población total de las células por tubo y se contaron al menos 50 tubos seminíferos por animal.

## **6.6 Proliferación celular**

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 18 horas y se procesaron para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor, que fueron colocados en laminillas con poly-L-lisina (SIGMA, México). Aproximadamente seis secciones del testículo fueron tomadas. Las laminillas fueron desparafinadas e hidratadas. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% en metanol durante 30 minutos. Se continuó con lavados en agua destilada. Las laminillas fueron incubadas en solución de tritón X-100% durante 10 minutos, se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1% en buffer de fosfatos (PBS) durante 2 horas e incubadas toda la noche con el anticuerpo primario. Para

determinar la proliferación celular, se utilizó el anticuerpo policlonal producido en conejo anti-histona-H3 sulfatado (Upstate, USA) (1:100). Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-rabbit IgG conjugado con HRP, (Santa Cruz, Biotechnology, USA) durante 30 minutos, las laminillas fueron lavadas en PBS. Los sitios de unión del anticuerpo se demostraron usando diaminobencidina durante 6 a 8 minutos. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Las laminillas se contrastaron con hematoxilina -eosina, se deshidrataron, aclararon y montaron.

Se determinó el porcentaje de tubos seminíferos cortados transversalmente con células positivas al anticuerpo anti-histona-H3, y se evaluaron al menos 200 tubos seminíferos por animal.

## **6.7 Análisis estadístico**

Los resultados paramétricos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de "Tukey", considerando una  $p < 0.05$  como diferencia significativa, la prueba de kruskal-Wallis a una  $p < 0.05$ , fue empleada para la comparación de las especies reactivas de oxígeno. Los resultados fueron expresados como la  $X \pm ES$

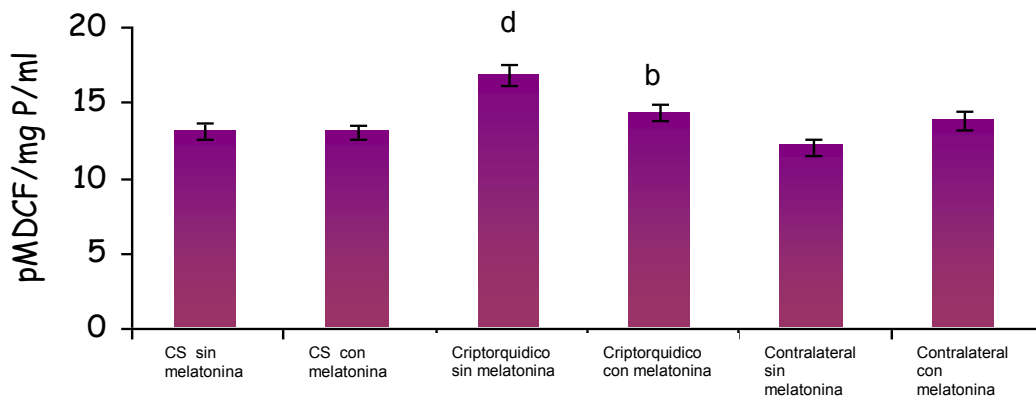
## 7 RESULTADOS

Al sacrificio todos los animales presentaron una condición corporal buena, sin signos clínicos de enfermedades aparentes.

Los animales a los que se les realizó criptorquidia quirúrgica mostraron, al sacrificio, el testículo izquierdo localizado en el canal inguinal, con un peso menor que el testículo escrotado (datos no mostrados) y una apariencia normal, mientras que el testículo derecho se ubicó dentro del escroto; en los animales control sano ambos testículos se localizaron en la cavidad escrotal.

### 7.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno (EROs)

En los testículos de los animales CS las especies reactivas de oxígeno se generan de forma normal. Al comparar la producción de RL en los testículos de los animales CS sin melatonina contra testículos de animales CS con melatonina no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). Al comparar los testículos de los grupos con criptorquidia sin melatonina contra el grupo con criptorquidia con melatonina se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) así como al comparar los testículos contra laterales con y sin melatonina tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Es interesante mencionar que los niveles de RL son iguales entre los CS con respecto al grupo criptorquidia con melatonina, pero la producción de RL en los testículos de los animales CS fue menor que en los testículos criptorquídicos sin melatonina ( $p < 0.05$ ). Esto muestra que la administración de melatonina en animales con criptorquidia reduce los niveles de RL significativamente, alcanzando niveles similares a los del control sano (Gráfica 2).



a  $p < 0.05$  control sano sin melatonina vs control sano con melatonina  
 b  $p < 0.05$  criptorquidia sin melatonina vs criptorquidia con melatonina  
 c  $p < 0.05$  contralateral sin melatonina vs contralateral con melatonina  
 d  $p < 0.05$  todos los grupos experimentales vs control sano sin melatonina

Gráfica 2. Producción de EROs,  $X \pm ES$

## 7.2 Índice Histopatológico y determinación del área epitelial

A nivel histológico observamos que los testículos de animales CS presentaron una citoarquitectura normal (Fig. 12A) con presencia de tubos seminíferos en diferentes etapas del ciclo del epitelio y células germinales en diversos grados de desarrollo, desde espermatogonia hasta espermátida elongada.

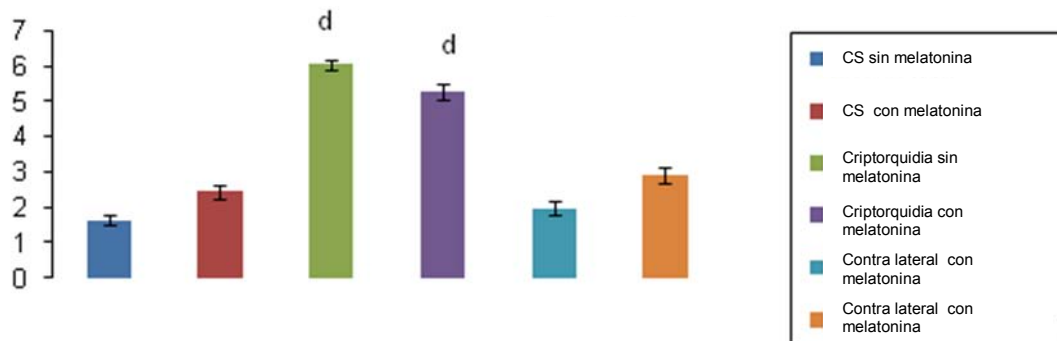
En los testículos CS con melatonina se observaron ligeras alteraciones del epitelio seminífero, tales como vacuolización, picnosis y descamación celular, (Fig.12B) sin embargo, estas alteraciones no fueron significativas al compararse con el grupo CS. El índice histopatológico de este grupo fue de  $2.44 \pm 0.19$ , sin mostrar diferencias significativas con el CS ( $p < 0.05$ ).



Fig. 12 Imágenes histológicas de tubos seminíferos provenientes de diferentes condiciones experimentales: A) control sano, B) control sano con melatonina, en donde se observa una citoarquitectura normal con abundantes células germinales, C) criptorquidia sin melatonina, en donde se aprecian alteraciones histológicas como vacuolas (v), picnosis (p), sincicios (c) y descamación celular, D) criptorquidia con melatonina, en donde se aprecia también alteraciones como células picnóticas (p) y la espermatogénesis no prosigue mas allá de espermatidas redondas (er), E) contra lateral sin melatonina y F) contralateral con melatonina en donde se observan tubos seminíferos sanos: espermatogonias (eg), espermatocitos (ec), espermatidas redondas (er) y espermatidas elongadas (ee). Azul de toluidina 20X.

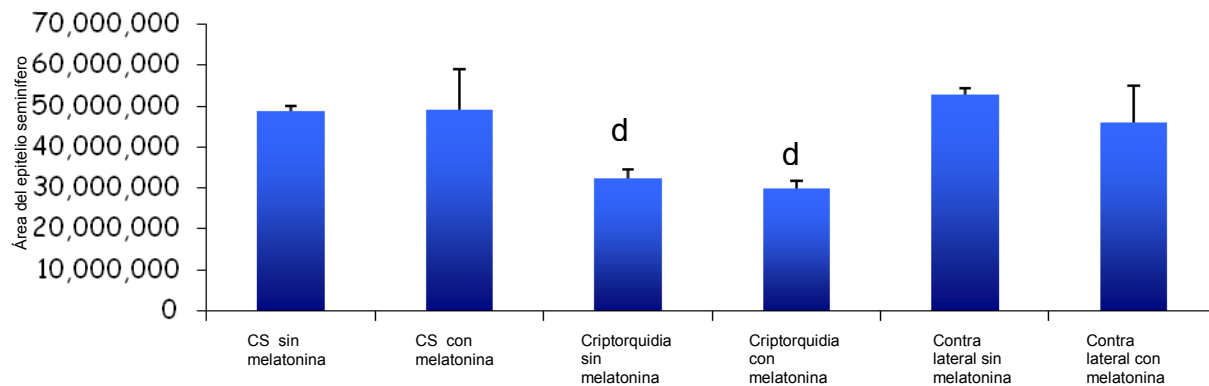
No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos contralateral con y sin melatonina, con respecto al CS. (Gráfica 3). Al analizar el índice histopatológico entre los grupos criptorquídicos con y sin melatonina, no se observaron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ), los cuales presentaron alteraciones como: picnósis, plegamiento de la lámina basal, vacuolización, presencia de cincitios celulares, así como ausencia de espermátidas en algunos tubos seminíferos (Fig. 12). El índice histopatológico fue de  $6.03 \pm 0.14$  en el grupo sin melatonina y de  $5.25 \pm 0.23$  en el grupo con melatonina (Gráfica 3).

No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al analizar el área epitelial en los grupos estudiados entre si (control sano con y sin melatonina, criptorquidia con y sin melatonina, contralateral con y sin melatonina). Al comparar todos los grupos experimentales con el grupo control sano sin melatonina, observamos que el área de los tubos seminíferos de los animales con criptorquidia con y sin melatonina fue menor ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 4).



- a:  $p < 0.05$  control sano sin melatonina vs control sano con melatonina
- b:  $p < 0.05$  criptorquidia sin melatonina vs criptorquidia con melatonina
- c:  $p < 0.05$  contralateral sin melatonina vs contralateral con melatonina
- d:  $p < 0.05$  todos los grupos experimentales vs control sano sin melatonina

Gráfica 3. Índice histopatológico,  $X \pm ES$



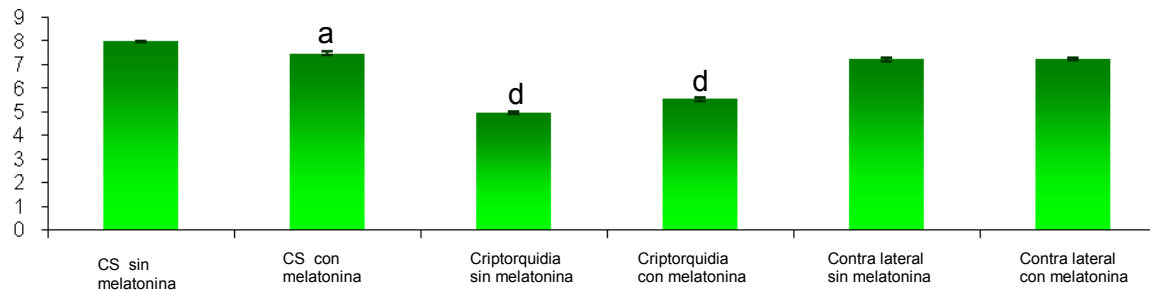
- a:  $p < 0.05$  control sano sin melatonina vs control sano con melatonina
- b:  $p < 0.05$  criptorquidia sin melatonina vs criptorquidia con melatonina
- c:  $p < 0.05$  contralateral sin melatonina vs contralateral con melatonina
- d:  $p < 0.05$  todos los grupos experimentales vs control sano sin melatonina

Gráfica 4. Área del epitelio seminífero, los resultados se expresan en  $X \pm ES$

### 7.3 Índice de Johnsen

Al analizar el grado de maduración celular a través del índice de Johnsen, se observó que el grupo CS sin melatonina presentó un grado de maduración mayor con respecto al CS con melatonina ( $p < 0.05$ ). En los testículos contra laterales con y sin melatonina no se presentaron diferencias significativas entre ellos, y al comparar los testículos criptorquidia sin melatonina y criptorquidia con melatonina, no se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ), ambos grupos criptorquídicos mostraron un grado de maduración del epitelio seminífero por debajo del grupo CS sin melatonina (Gráfica 5).



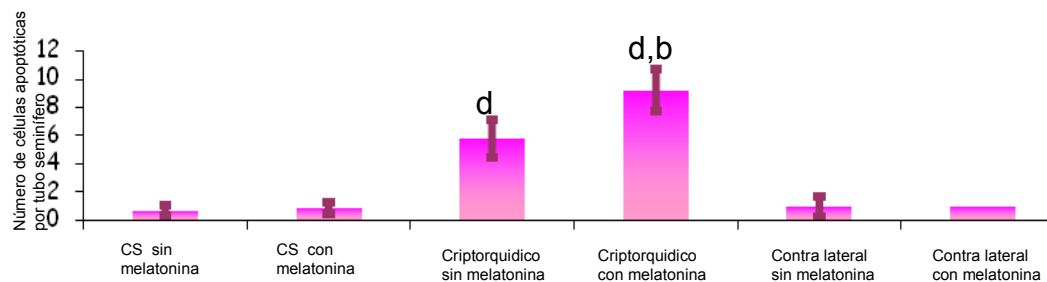


- a:  $p < 0.05$  control sano sin melatonina vs control sano con melatonina
- b:  $p < 0.05$  criptorquidia sin melatonina vs criptorquidia con melatonina
- c:  $p < 0.05$  contralateral sin melatonina vs contralateral con melatonina
- d:  $p < 0.05$  todos los grupos experimentales vs control sano sin melatonina

Gráfica 5. Índice de Johnsen los resultados se expresan como  $X \pm ES$

#### 7.4 Apoptosis celular

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al analizar la apoptosis en los testículos CS sin y con melatonina y los testículos contralaterales con y sin melatonina, sin embargo al analizar los testículos criptorquidia sin melatonina y criptorquidia con melatonina si se observaron diferencias significativas, presentando niveles de  $5.78 \pm 1.31$  en el grupo criptorquidia sin melatonina y de  $9.18 \pm 1.45$  en el grupo criptorquidia con melatonina. También se observaron diferencias significativas al compararlos con respecto a los testículos CS sin melatonina (Gráfica 6).

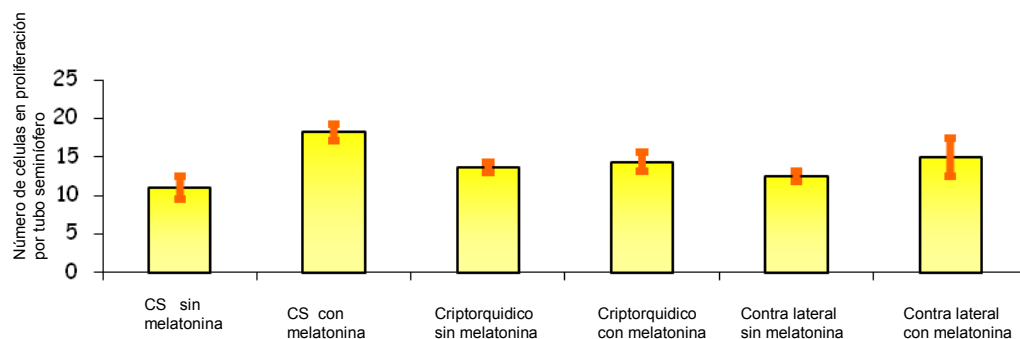


- a:  $p < 0.05$  control sano sin melatonina vs control sano con melatonina
- b:  $p < 0.05$  criptorquidia sin melatonina vs criptorquidia con melatonina
- c:  $p < 0.05$  contralateral sin melatonina vs contralateral con melatonina
- d:  $p < 0.05$  todos los grupos experimentales vs control sano sin melatonina

Gráfica 6. Apoptosis celular expresada como  $X \pm ES$

### 7.5 Proliferación celular

La actividad proliferativa de la melatonina, depende de su concentración y el tiempo durante el cual es administrada, por lo que al analizar la proliferación celular, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos (Gráfica 7).



- a:  $p < 0.05$  control sano sin melatonina vs control sano con melatonina
- b:  $p < 0.05$  criptorquidia sin melatonina vs criptorquidia con melatonina
- c:  $p < 0.05$  contralateral sin melatonina vs contralateral con melatonina
- d:  $p < 0.05$  todos los grupos experimentales vs control sano sin melatonina

Gráfica 7. Proliferación celular expresada como  $X \pm ES$

## 8 DISCUSIÓN

La criptorquidia se ha asociado con una reducida actividad de enzimas antioxidantes (Fei, *et al*, 2002) o a una elevada producción de EROs (Ikeda, *et al*, 1999, Ishi, *et al*, 2005) tal y como se observo en este trabajo.

Debido a la alta biodisponibilidad de la melatonina y considerando que puede atrapar el peróxinitrito el cual es producto de la reacción del radical superóxido y el óxido nítrico (Um, *et al*, 1996, Dagdönderen, 2004), así como ser capaz de atrapar otros radicales y prorradicales presentes como el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Ravindra, *et al*, 2006) además de estimular la actividad endógena de enzimas antioxidantes, es lógico pensar que puede reducir la producción de EROs generados por la criptorquidia.

Cuando se administro melatonina a los animales con criptorquidia inguinal inducida, se observó una disminución en la producción de EROs la cual alcanzo los niveles del grupo CS, indicando el papel de la melatonina como antioxidante y atrapadora de radicales libres principalmente de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Reiter, 1993, 1995, 2000).

A pesar de que la melatonina redujo la producción de EROs, esta fue incapaz de disminuir el daño epitelial, ya que el grupo criptorquídico con melatonina presento el mismo grado de daño que el grupo criptorquídico sin melatonina, por lo que se sugieren vías alternas de daño que no pudo eliminar la melatonina ocasionando la degeneración del epitelio celular, como la generación de radicales libres derivados de nitrógeno que pudieran activar proteínas de choque térmico e inducir la producción de p53 y FAS así como una disminución en el aporte de factores de crecimiento a las células germinales por parte de las células de Sertoli, estrés calórico, expresión de "receptores de muerte" en la superficie celular, disminución en el aporte de GnRH o testosterona (Huff, *et al*, 1993, Zhou, *et al*, 1996, Wu, 1996, Sinha *et al*, 1999, Pinart, 2001, Yin Y, *et al*, 2002; Kurokawa, *et al*, 2005).

No se conoce el origen de los EROs, aunque se proponen elevados niveles de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en el testículo criptorquídico (Ikeda, *et al*, 1999). El peróxido tiene la capacidad de convertirse en radical hidroxilo el cual es altamente tóxico debido

a su rápida capacidad de distribución en la célula. Otra posible fuente podría ser el óxido nítrico que es un gas altamente reactivo.

La producción elevada de especies reactivas de oxígeno se encuentra asociada a una pérdida de la función espermática a través de mecanismos que incluyen lipoperoxidación de membranas y alteraciones en el metabolismo; que se traducen en una disminución en la movilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides. Además se ha demostrado que el estrés oxidativo afecta directamente la integridad genómica de las células espermáticas induciendo el entrecruzamiento de la cromatina, defectos en la compactación de esta durante la espermiogénesis, oxidación de las bases nitrogenadas, microdeleciones y alteraciones cromosómicas durante la meiosis, además de ruptura de las hebras de ADN lo que trae como consecuencia una aceleración de la apoptosis en las células germinales. Smith *et al*, 2007, reportaron una gran cantidad de espermatoцитos apoptóticos en los tubos seminíferos de testículos criptorquídicos, concordando con los resultados observados en este trabajo.

La elevada temperatura a la cual los testículos son expuestos fuera del escroto interrumpe la espermatogénesis, causando daños en la fertilidad futura (Chowdhury, *et al* 1970, Kumagai, *et al*, 2002). Se ha sugerido que la degeneración de las células germinales asociadas al calor involucra la apoptosis (Shikone, *et al*, 1994, Kocak, *et al*, 2002, Barkawi, *et al*, 2004) y por consiguiente una pérdida de algunos grupos celulares (Saalu *et al*, 2006, Smith, 2007) concordando con los resultados obtenidos, al observar las alteraciones histopatológicas de los testículos criptorquídicos en donde se observo la pérdida principalmente de espermátidas redondas y elongadas. Los testículos criptorquídicos presentaron incremento en la apoptosis al compararlos con los controles sanos y los testículos contralaterales. El mecanismo que induce la apoptosis por el calor aún no se conoce, varios grupos han reportado la presencia de señales intracelulares que tienden a la apoptosis como la activación de proteínas (Um, *et al*, 1996, Hampton, *et al*, 1997), lo cual se asocia con un incremento en la producción de EROs intracelulares, sugiriendo que la vía que promueve la apoptosis involucra los radicales libres o el sistema antioxidante celular. Se ha reportado que muchas células siguen la vía apoptótica

cuando son sometidas a estrés oxidativo *in vitro* (Ikeda, *et al*, 1999, Kim, *et al*, 2006, Mao, *et al*, 2006).

Por otro lado se observaron diferencias significativas en el grado de maduración del epitelio seminífero de las células de los testículos CS sin melatonina y CS con melatonina, observándose una reducción en el grado de maduración de las células CS con melatonina, lo cual pudiera deberse a un efecto tóxico de la melatonina en animales que no liberan elevadas cantidades de EROs (Danilova *et al*, 2004, Hipler *et al*, 2003). Al comparar los testículos con criptorquidia con melatonina no se observaron diferencias significativas con respecto a los testículos con criptorquidia sin melatonina.

Al analizar la proliferación celular, se observó que estos resultados no coinciden con los reportados por D'Istria, *et al*, 2003 quienes observaron un marcado efecto inhibitorio de la melatonina en la proliferación celular en animales estacionales. Otros estudios reportan un papel inhibitorio de la melatonina en mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación en varios tipos celulares, incluyendo las células estrógeno receptoras cancerosas de tumores mamarios MCF-7. En adición Zhao *et al* (2002) demostraron que la melatonina posee un efecto antiproliferativo en las células anti-mesometriales uterinas en la rata, pero Danilova *et al*, 2004 reportan un efecto dosis dependiente de la melatonina, por lo que los resultados obtenidos en este reporte en los que no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio, pudieran evaluarse a diferentes tiempos y dosis. Si bien la melatonina administrada a esta dosis y durante este intervalo de tiempo (10 mg/kg durante 15 días) no propicio efectos antiproliferativos, se sugiere evaluar diferentes dosis y tiempo con el fin de utilizarla como un tratamiento antineoplásico, ya que una de las principales secuelas de la criptorquidia a largo plazo es la elevada probabilidad de desarrollar neoplasias testiculares (Farrer *et al*, 1985, Hinman, 1993). La melatonina ejerce acciones antiproliferativas en diversos cultivos de líneas celulares derivadas de tumores como el carcinoma de ovario, de vejiga urinaria, los prolactinomas, hepatomas y neuroblastomas. Pero los trabajos más relevantes se han hecho con las células MCF-7, procedentes de cáncer mamario humano positivo a receptores

estrogénicos. La melatonina inhibe el crecimiento de éstas, así como el de otras líneas también positivas para esos receptores, como la T47D y la ZR75-1, mientras que no es efectiva contra las negativas: BT20, MDA-MB-231 y Hs0587t. De manera que la acción oncostática parece depender del efecto estrogénico mediado por receptores nucleares, a lo que tal vez pueda contribuir la semejanza de esta molécula con los derivados de fenilindoles, reconocidos antagonistas estrogénicos. La intervención antineoplásica de la melatonina se ejerce en diversas fases de la evolución tumoral: iniciación, promoción, progresión y metástasis. Además del estradiol, otros factores mitogénicos —prolactina y factor de crecimiento epidérmico— son contrarrestados "*in vitro*" por la hormona pineal. La melatonina bloquea los efectos estimulantes de la prolactina sobre el crecimiento de células mamarias cancerosas. El proceso de formación de tumores es influido por la disposición de algunas grasas; el ácido linoleico, una molécula esencial para el organismo humano, promueve el crecimiento tumoral, y la melatonina inhibe su captación y metabolismo por los tumores, lo que ha sido estudiado en células de hepatoma. La melatonina bloquea la transformación del linoleico en el ácido 13-hidroxi-9,11-octadecadienoico, una señal amplificadora para la mitogénesis inducida por el factor de crecimiento epidérmico, lo que puede explicar parcialmente los cambios que induce en células de tumores mamarios (Romero, *et al*, 2002, Sainz R.M, *et al*, 2003).

La apoptosis es una forma fisiológica de suicidio celular, que juega un rol crítico en la embriogénesis y en la homeostasis celular, así como un mecanismo de defensa para eliminar células infectadas, mutadas o dañadas. Estudios previos reportan un efecto protector de la melatonina en las células y tejidos en contra de los estímulos estresantes, Cabrera, *et al*, (2003) reportan que las células incubadas con melatonina, adquieren una resistencia a la apoptosis inducida mediante *shock* térmico al desarrollar un efecto protector sinérgico con las proteínas de choque térmico como HSP27. Muchos de los cambios ocurridos en la apoptosis son activados específicamente por un *set* de proteasas que forman parte de una familia de proteínas conocidas como caspasas. Si bien la melatonina inhibe la apoptosis en células inmunológicas y previene la muerte de células neuronales también actúa incrementando la

apoptosis de células cancerosas principalmente hormono dependientes. Uno de los mecanismos de la acción de la melatonina se ejerce directamente sobre el ciclo celular. La indolamina incrementa la duración de éste por alargamiento de la fase G1 y retarda la entrada en fase S, permitiendo a la célula llegar a un mayor grado de diferenciación; disminuye la síntesis de ADN en las células no quiescentes que están en fase S; y estimula la expresión de las proteínas antitumorales p53 y p21WAF1, involucradas en la apoptosis de las células germinales inducidas por el calor (Sainz, *et al*, 2003, Ishikawa, *et al*, 2005, Tan, *et al*, 2007). La melatonina activa también la apoptosis inducida por la activación de Fas e incrementando la formación intracelular de radicales libres inducidos por Fas, es remarcable que una substancia que puede inducir apoptosis en células cancerosas la prevenga en células normales (Sainz, *et al*, 2003).

Por lo tanto en este trabajo la dosis empleada de melatonina probablemente potenció el efecto del estrés calórico induciendo un aumento en las células apoptóticas.

Onur, *et al*, (2004) reportan dosis iguales de melatonina (10mg/kg de peso) obteniendo un efecto antiapoptótico de la melatonina, con una administración diaria de esta entre las 4 y 5 de la tarde, ya que durante este periodo se considera que tiene su concentración natural mas baja en la sangre, por lo cual difieren con los resultados obtenidos, ya que la administración de la melatonina, si bien fue diaria esta fue administrada durante la mañana. De aquí la importancia de la cronobiología en estudios experimentales.

Al administrar melatonina en los animales con criptorquidia, se observó una reducción en la producción de EROs, lo que deja entrever el papel de la melatonina como un atrapador de radicales libres. Si bien la melatonina actúa como atrapadora de radicales libres y estimuladora de la producción endógena antioxidante, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren un papel no relevante en la maduración del epitelio seminífero y en la proliferación celular, tal y como se reporta en tratamientos contra el cáncer en humanos en donde inhibe la proliferación de las células cancerosas. Es interesante observar que este tipo de estudios permite apoyar las investigaciones sobre el uso de esta hormona en tratamientos de patologías

en donde esta presente la proliferación celular como en el cáncer, sin embargo hay que controlar la concentración, periodo de tratamiento y la hora de administración.

Si bien con la dosis, periodo y hora de administración utilizados no se obtuvieron los resultados deseados, estudios a largo plazo y con diferentes dosis y horas de aplicación podrían evaluarse utilizando animales con menor variabilidad genética.

Otra alternativa de tratamiento que pudiera mejorar la fertilidad a largo plazo puede ser el inducir la proliferación de células de Sertoli, maduración de gonocitos a espermatogonia y la diferenciación de células mesenquimatosas a células de Leyding, procesos que se sabe son afectados en pacientes con criptorquidia.



## **9 CONCLUSIONES**

En el presente estudio, la melatonina disminuyó la producción de EROs, sin embargo esto no se vio reflejado en una disminución de las alteraciones histológicas o del índice de apoptosis, por lo que se sugieren vías alternas de daño a la producción de EROs que alteran la espermatogénesis. Por lo anterior se propone se diseñen estudios en animales experimentales que traten de identificar dichas vías alternas, ya que la mejora en el conocimiento sobre los procesos involucrados en esta patología permitirá continuar con la búsqueda de tratamientos que mejoren la fertilidad a largo plazo en los pacientes con criptorquidia.

## 10 ABREVIATURAS Y SIGLAS EMPLEADAS

EROS	Especies reactivas de oxígeno
RL	Radicales libres
IHP	Índice histopatológico
AES	Área del epitelio seminífero
CS	Control sano
FR	Free radicals
FDT	Factor determinante del testículo
CGP	Células germinales primordiales
G	Gonocitos
L	Células de Leyding inmaduras
S	Células de Sertoli
EG	Espermatogonias
EC	Espermatocitos
ER	Espermátidas redondas
EE	Espermátidas elongadas
INSL3	Péptido similar a la insulina 3
hCG	Gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
NGF	Nervio genito femoral
CGRP	Péptido asociado al gen de la calcitonina
MIS	Substancia inhibidora de los conductos de Müller
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
ABP	Proteína unidora de andrógenos

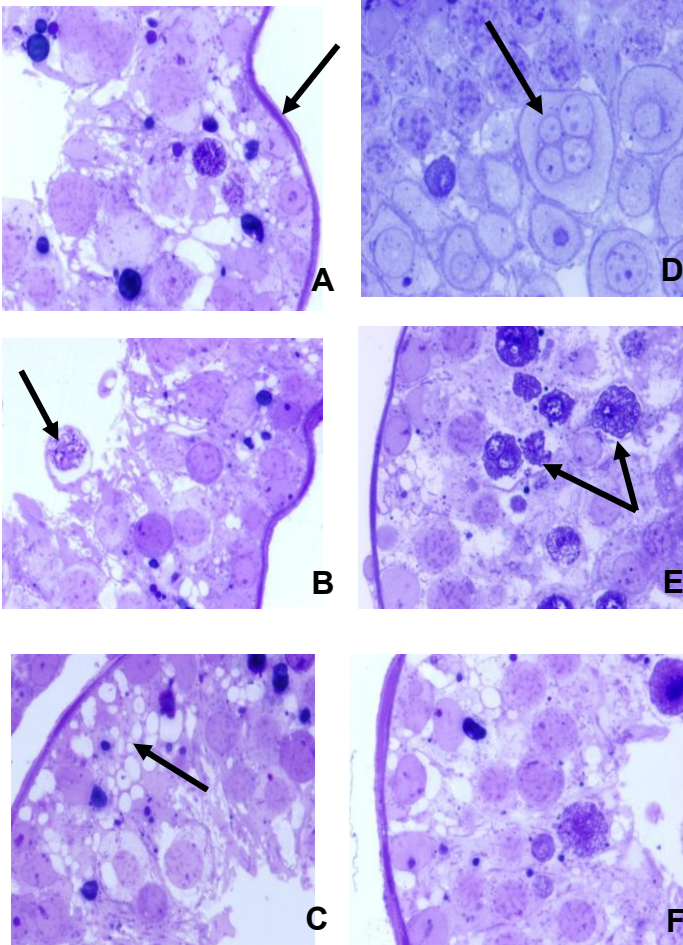
IGF	Factor de crecimiento asociado a la insulina
O <sub>2</sub>	Dioxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HO <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AOX	Antioxidante
Redox	Sistema óxido-reducción
SOD	Enzima superóxido dismutasa
GHS	Enzima glutatión
GHS-px	Enzima glutatión peroxidasa
GHS-st	Enzima glutatión s transferasa
GHS-rd	Enzima glutatión reductasa
HO-2	Enzima hemo oxigenasa 2
ON	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintasa
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil-éster
HIOMT	Enzima hidroxindol-O-metil transferasa
AA-NAT	Enzima arilalquilamina-N-acetil transferasa
ERNS	Especies reactivas de nitrógeno
dpp	Días post parto
DCF	Diclorofluoresceína

IA	Índice apoptótico
Hsp	Proteína de choque térmico

## 11 ANEXO

### 11.1 Anexo 1 Índice Histopatológico

Alteraciones histológicas	Puntaje
A) Plegamiento de lámina basal	1
B) Descamación celular	1
C) Vacuolización epitelial	2
D) Cincisio celular	2
E) Picnosis	2
F) Tubos sin espermatidas	3
G) Tubos sin espermatozoides	4
H) Tubos sin espermatogonias	5
I) Ausencia de todo tipo celular	6



## 11 REFERENCIAS

- Abney TO, Keel BA: The criptorchid testis. CRC Press, Boca Raton Fl. 176-186, 1989.
- Abasiyanik A, Dagdönderen L: Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. *Journal of Pediatric Surgery* 39: 1238-1241, 2004.
- Agarwal A, Allamaneni S: Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal* 9(3): 187-197, 2004.
- Aguilar-Mahecha A, Hales B, Robaire, B: Expression of stress response genes in germ cell during spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 65: 119-127, 2001.
- Ahotupa M, Huhtaniemi I: Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biology of Reproduction* 46: 1114-1118, 1992.
- Akgur FM, Kilinc K, Aktug T, *et al*: The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *Jornal of Urology* 151:1715-1717, 1994.
- Alberts B, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. *Biología Molecular de la célula*. Editorial Omega, Barcelo.
- Alvarez Dorantes L., Urbina Rincón V., Campo Martínez N.: Resultados del tratamiento con gonadotropina coriónica en niños con criptorquidia. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 42(10):610-614, 1985.
- Alvarez V.: *Anatomía Comparada Básica*. Editorial Trillas, México, PT 581, 1988.
- Amann R, Veeramachaneni D.: Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction* 13: 541-561, 2007
- Antolin I., Rodríguez C., Sainz R., *et al*: Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 10: 882-890, 1996.
- Arighi M., Singh A., Bosu W., *et al*: Histology of the normal and retained equine testis. *Acta Anatómica* 129(2): 127-130, 1987.

- Awad H, Halawa F, Mostafa T, Atta A: Melatonin hormone profile in infertile males. *International Journal of Andrology* 29 (3): 409–413, 2006.
- Banks J. *Histología Veterinaria Aplicada. Editorial Manual Moderno, México*, 1986.
- Bauché F, Fouchard MH, Jégou B: Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Letters* 349:392-396, 1994.
- Baumans V, Dijkstra G, Wensing C: The role of a non-androgenic testicular factor in the process of testicular descent in the dog. *International Journal of Andrology* 6 (6): 541-552, 1983.
- Barqawi A, Trummer H, Meacham R: Effect of Prolonged Cryptorchidism on Germ Cell Apoptosis and Testicular Sperm Count. *Asian Journal of Andrology* 6:47-51, 2004.
- Barlow-Walden L., Reiter R., Abe M., *et al*: Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry International* 26(5): 497-502, 1995.
- Barthold JS., Kumasi-Rivers K., Upadhyay J., *et al*: Lack of feminization of the cremaster nucleus by prenatal flutamide administration in the rat and pig. *Journal of Urology* 156: 767-771, 1996.
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, *et al*: Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. *Nature* 348: 248-250, 1990.
- Bernal-Mañas C, Morales-C, Pastor L, *et al*: Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochemica* 107(5): 365-372, 2005.
- Bianchi C, Argibay P: Características de las células primordiales germinales murinas y su relación con la hematopoyesis. *Medicina* 61: 491-494, 2001.
- Billig H, Sang-Yoing Chun, Eisenhauer K, J.W. Hsueh A: Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human Reproduction Update* 2(2): 103-107, 1996.
- Bogh IB, Baltzen M, Byskov AG, *et al*: Testicular concentration of meiosis-activating sterol is associated with normal testicular descent. *Theriogenology* 55:983-992, 2001.

- Bonfoco E, Kraine D, Ankarerona M, Nicotera P, Lipton SA.: Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA 92: 7162-7166, 1995.
- Buttke TM, Sandstrom PA: Oxidative stress as mediator of apoptosis. Immunology Today 15: 7-10, 1994.
- Cameron I, Greulich R: Evidence for an essentially constant duration of DNA synthesis in renewing epithelia of the adult mouse. The journal of Cell Biology (18): 31-40, 1963.
- Campbell H.E: The incidence of malignant growth of the undescended testicle: a reply and reevaluation. Journal of Urology 81:664. 1959.
- Canavese F., Cortese M.G., Magro P: Cryptorchidism: medical and surgical treatment in the 1<sup>st</sup> year of life. Pediatric Surgery 14: 2-5, 1998.
- Chapple IL: Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. Journal of Clinical Periodontology 24:287-296, 1997.
- Chilvers C, Dudley NE, Gough MH, *et al*: Undescended testis: the effect of treatment on subsequent risk of subfertility and malignancy. Journal Pediatric Surgery 21:691, 1986.
- Chowdhury AK, Steinberger E: Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. J Reprod Fertil 22: 205-212, 1970.
- Cox JE, Edwards G, Neal P.: An analysis of 500 cases of equine cryptorchidism. Equine Veterinary Journal, 11(2): 113-116, 1979.
- Cupps, P. Reproduction in Domestic Animals. Editorial Academic Press, 4<sup>o</sup> ed, capítulos 5-6, 1987.
- Danilova N, Krupnik V, Sugden D, *et al*: Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. The FASEB Journal 18: 751-753, 2004.
- Dagdonderen A: Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. : Journal of Pediatric Surgery 39:1238-41, 2004.



- De Felici M: Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *International Journal Development Biology*. 44: 575-580, 2000.
- De Foor WR, Kuan CY, Pinkerton M, *et al*: Modulation of Germ Cell Apoptosis with a Nitric Oxide Synthase Inhibitor in a Murine Model of Congenital Cryptorchidism. *Journal of Urology* 172:1731-1735, 2004.
- Delgado-Olivares L, Díaz-Acosta A, Membrillo-Hernández J.: Un acercamiento a las condiciones ambientales de vida de *Escherichia coli*. Respuesta al estrés oxidativo y térmico en condiciones de limitación de oxígeno y fase estacionaria. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2): 162-172, 2006.
- De Matteis R, Ricquier D, Cinti S: TH-, NPY-, SP-, and CGRP-immunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult rats acclimated at different temperatures: an immunohistochemical study. *Journal of Neurocytology* 27, 877–886, 1998.
- Diaz-Acosta AE, Membrillo-Hernández J: Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonización en diversos sistemas biológicos. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 9(1): 34-44, 2006.
- Diemer T, Allen JA, Hales KH, *et al*: Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* 144: 2882-2891, 2003.
- D'Istria M., Palmiero C., Serino I., *et al*: Inhibition of the basal and oestradiol-stimulated mitotic activity of primary spermatogonia by melatonin in the testis of the frog, *Rana esculenta*, in vivo and in vitro. *Reproduction* 126: 83-90, 2003.
- Elder JS: The undescended testis: hormonal and surgical management. *Surg Clin North Am* 68:983-1005, 1988.
- Elledge S: Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science*, 274 (5293): 1664-1672, 1996.

- Even M, Dhar M, Vom Saal F: Transport of steroids between fetuses via amniotic fluid in relation to the intrauterine position phenomenon in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96: 709-716, 1992.
- Farrer J.H., Walker A.H., Rajfer J.: Management of the post pubertal cryptorchid testis: A statistical review *Journal of Urology* 134:1071, 1985.
- Fei QJ, Zheng XM, Li SW, *et al*: The effect of antioxidant enzyme on germ cell apoptosis in cryptorchidism. *Asian Journal Andrology* 8: 255-7, 2002.
- Fujii J, Luchi Y, Matsuki S, *et al*: Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal Andrology* 5: 231-242.
- Fujisawa M, Yamanaka K, Tanaka H, *et al*: Expression of endothelial nitric oxide synthase in the Sertoli cells of men with infertility of various causes. *British Journal of Urology International*. 1(87): 85-88. 2001.
- Galina C, Valencia J.: *Reproducción de Animales Domésticos*. Editorial Limusa: 43-81, 2008.
- Gho DW., Middlesworth W., Farmer P.J., *et al*: Prenatal androgen blockade with flutamide inhibits masculinization of the genitofemoral nerve and testicular descent. *Journal of Pediatric Surgery* 40: 434-441. 1994.
- Gorman M., Yello S.: Three daily melatonin infusions alter gonadal development but not GnRH neuron number in the medial preoptic area or diagonal band of Broca in Siberian hamsters. *Neuroscience Letters* 210(3): 165-168, 1996.
- Griswold MD.: The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Developmental Biology* 9: 411-416, 1998.
- Hadziselimovic F., Herzog B., Buser M.: Development of cryptorchid testes. *European Journal of Pediatrics*, 146(supl 2): S8-S12, 1987.
- Hafez E, Hafez B: *Reproducción e Inseminación artificial en animales*. Editorial McGraw Hill Interamericana: 101-105, 2002.

- Halliwell B.: Tell me about free radicals doctor: a review. J R Soc Med 82: 747-752, 1989.
- Halliwell B., Gutteridge JMC eds: Free radicals in biology and medicine, 2<sup>nd</sup> edition Oxford University Press, 1990.
- Hampton MB, Orrenius S.: Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett 414: 552-556, 1997.
- Happ J., Kollmann F., Krawehl C., Neubauer M, Krause U, Demisch K, Sandow J, Von Rechenberg W, Beyer J.: Treatment of cryptorchidism with pernasal gonadotropin-releasing hormone therapy. Fertility and Sterility Journal 29(5): 552-556, 1978.
- Heyns C., Hutson J.: Historical review of theories of testicular descent. Journal Urology 163: 74-76, 1995.
- Hinman F.: Opening remarks: Cryptorchidism. European Journal Pediatrics 152 (Suppl 2): 53-55, 1993.
- Hipler U., Fischer T., Elsner P.: HaCaT Cell proliferation influenced by melatonin. Skin Pharmacology Applied Skin Physiology 16: 379-385, 2003.
- Houillon Ch.: Sexualidad. Edit Omega, Barcelona. PC 184.
- Hutson JM., Hasthorpe S., Heyns CF.: Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. Endocrine Reviews 18: 259-280, 1997.
- Hutson JM., Hasthorpe S.: Abnormalities of testicular descent. Cell and Tissue Research 322(1): 1-8, 2005.
- Hutson JM., Hasthorpe S.: Testicular descent and cryptorchidism: the state of the art in 2004. Journal of Pediatric Surgery 40: 97-302, 2005.
- Hutson JM., Sasaki Y., Huynh J., *et al*: The gubernaculum in testicular descent and Cryptorchidism. The Turkish Journal of Pediatrics 46(supplement): 3-6, 2004.
- Huff D.S., Hadziselimovic F., Snyder H.M: Histologic maldevelopment of unilaterally cryptorchid testes and their descended partners. European Journal of Pediatrics 152 (Suppl 2): 510-517, 1993.

- Husmann DA., Levy JB.: Current concepts in the pathophysiology of testicular descent. *Urology* 46:267-276, 1995.
- Ikeda M., Kodama H., Fukuda J., *et al*: Role of Radical Oxygen Species in Rat testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Heat Stress. *Biology Reproduction* 61:393-399, 1999.
- Ishii T., Matsuki S., Luchi Y., *et al*: Accelerated impairment of spermatogenic cell in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radical Research* 39:697-705, 2005.
- Johnston H., Baker P., Abel M., *et al*: Regulation of Sertoli Cell Number and Activity by Follicle-Stimulating hormone and Androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* 145(1):318-329, 2004.
- Junqueira LC.: *Histología Básica*. Editorial Salvat, México, PT 506, 1983.
- Kaneko T., Luchi Y., Kobayashi T., *et al*: The expression of Glutathione reductase in the male reproductive system of rat supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *European Journal Biochemical*. 289: 1570-1578, 2002.
- Kim D., Jeon S., Jeong Y., *et al*: Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis. *FEBS Lett* 580:1439-1446, 2006.
- Kim J., Ghosh S., Weil A., *et al*: Caspase 3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142: 3809-3816, 2001.
- Klönisch T., Fowler P., Hombach-Klönisch S.: Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental Biology* 270: 1-18, 2004.
- Kocak I., Dundar M., Hekimgil M., *et al*: Assessment of germ cell apoptosis in cryptorchid rats. *Asian Journal of Andrology* 4(3): 183-186, 2002.
- Kubota Y., Temelcos C., Bathgate R., Smith K., Hutson J.: The role of insulin 3, testosterone, MIS and relaxin in rat gubernacular growth. *Human Molecular Reproduction* 8: 900-905, 2002.

- Kumagai A., Kodama H., Kumagai J. *et al*: Xanthine Oxidase Inhibitors Suppress Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Experimental Cryptorchidism. *Human Molecular Reproduction* 8:118-123, 2002.
- Kumagai J., Sheau Y., Hirota M *et al*: INSL3/Leyding Insulin-like peptide activates the LGR5 receptor important in testis descent. *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 31283-31286, 2002.
- Kurokawa S, Kojima Y, Mizuno K, *et al*: Epidermal Growth factor in the cryptorchid rats spermatogenesis. *Journal Urology*, 174:2415-2419, 2005.
- Lala R., Matarazzo P., Chiabotto P., *et al*: Combined therapy with LHRH and HCG in cryptorchid infants. *European Journal of Pediatrics*. 152(supplement 2): S31-S33, 1993.
- Langman J.: *Embriología medica*. Editorial Interamericana, México 159-172, 1976.
- Lesson, S.: *Histología* Editorial Interamericana. México p.p. 275-277, 1990.
- Mao Y., Song G., Cai Q., *et al*: Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gastric carcinoma MGC803 cells. *Cell Biology International* [Epub ahead of print], 2006.
- Mansfield K, Darrell E: Cryptorchidism in Florida Panthers: prevalence, features, and influence of genetic restoration. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4): 693-698, 2002.
- Meyer P.: *Fisiología Humana* Editorial Salvat, México P.T. 383, 1985.
- Middendorff R., Muller D., Wichers S., Holstein A.: Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 82:4154-4163, 1997.
- Montilla P., Tunes I., Muñoz M., Soria J., López A.: Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by adriamycin. *Revista Española de Fisiología* 53:301-5, 1997.
- Morgentaler A., Stahl B., Yin Y.: Testis and temperature: An historical, clinical, and research perspective. *Journal of Andrology* 20 (2): 189-195, 1999.

- Nelson D., Ye X., Hall C., Santos H., *et al*: Coupling of DNA Synthesis and Histone Synthesis in S Phase Independent of Cyclin/cdk2 Activity. *Molecular and Cellular Biology* 22 (21): 7459-7472, 2002.
- Netter FH, Oppenheimer E, Egozcue Cuixart J: *Reproductive Systems*. Elsevier: 22-24, 2002.
- Nigg EA: Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17(6): 471-480, 1995.
- Nonneman D., Ganjam V., Welshons W., Vom Saal F.: Intrauterine position effects on steroid metabolism and steroid receptors of reproductive organs in male mice. *Biology of Reproduction*, 47: 723-729, 1992.
- Oaknin-Bendahan S., Anis Y., Nir I., Zisapel N.: Effects of long-term administration of melatonin and a putative antagonist on the ageing rat. *Neuroreport* 6:785-8, 1995.
- Onur R., Semerciöz A., Orhan I., Yekeler H.: The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urology Research* 32: 204-208, 2004.
- Ozdzenski W.: Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica* 17: 367-369. 1967.
- Peltola V., Huhtaniemi I., Ahotupa M.: Abdominal Position of the Rat Testis is Associated with High Level of lipid Peroxidation. *Biology Reproduction* 53:1146-1150, 1995.
- Perez SF., Rodríguez P., Pedraza C., *et al*: S-allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry International* 45:1175-1183, 2004.
- Pinart E., Bonet S., Briz M., *et al*: Cytology of the interstitial tissue in scrotal and abdominal testes of post-puberal boars. *Tissue Cell* 33(1): 8-24, 2001.
- Puri P., O'Donnell B.: Semen analysis of patients who had orchidopexy at or after years of age. *Lancet* 2:1051, 1988.

- Pyörälä S., Huttunen N., Uhari M.: A review and meta- analysis of hormonal treatment of cryptorchidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80(9): 2795-2799, 1995.
- Quiroz F: *Tratado de Anatomía Humana*. Editorial Porrúa, México, PC 265-267, 1981.
- Ravindra T., Lakshmi N., Ahuja Y.: Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *Indian Journal Medical Science* 60:523-535, 2006.
- Reiter, R.J.: Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals. *Brazilian Journal of Medical Biology Research* 26: 1141-1155, 1993.
- Reiter, R.J.: A review of the evidence supporting melatonin`s role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research* 18:1-11, 1995.
- Reiter, R.J.: Actions of Melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of Biomedical Science* 7: 444-458, 2000.
- Rogulska T, Ozdeznski W, Komai A.: Behaviour of mouse primordial germ cells in the chick embryo. *Journal of Embryology and Morphology*. 25(2):155-164, 1971.
- Romero A., Molina V., Rubio M.: Melatonina y cancer de mama. *Gaceta Médica de Caracas* 110 (3), 2002.
- Saalu L., Togun V., Oyewopo A., *et al*: Artificial cryptorchidism and the moderating effect of melatonin (N-acetyl methoxy tryptamin) in Sprague-Dawley rats. *Journal of Applied Science* 6 (14): 2889-2894, 2006.
- Sainz R., Mayo J., Rodriguez C., *et al*: Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 1407-1426. 2003.
- Sanoka D., Kurpisz M.: Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:12-18, 2004.
- Schlesinger M.: Heat Shock Proteins: The Search for Functions. *The Journal of Cell Biology*, 103, (8), 321-325, 1986.

- Shikone T., Billing H., Hsueh A.: Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biology of Reproduction* 51: 865-872, 1994.
- Shono T., Zakaria O., Imajima T., *et al*: Extra abdominal fixation of the gubernaculum inhibits testicular descent in newborn rats. *Journal of Pediatric Surgery* 3:503-506, 1996.
- Sofikitis N., Pappas E., Kawatani A., *et al*: Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Human Reproduction Update* 3(11): 229-259, 2005.
- Sousa M., Cremades N., Silva J., *et al*: Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli Cells. *Human Reproduction* 17: 161-172, 2002.
- Sousa M., Cremades N., Silva J., *et al*: A Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Human Reproduction* 17:1800-1810, 2002.
- Sinha A., Swerdloff R.: Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* 4:38-47, 1999.
- Smith R., Kaune H., *et al*: Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptorquidismo. *Revista Médica Chile* 135: 279-286, 2007.
- Smith J., Martin L.: Do cells cycle?. *Proc. Nat. Acad. Science* 70 (4): 1263-1267, 1973.
- Stewart J., Crute S., Loughlin V., *et al*: Prevention of free radical-induced myocardial reperfusion injury with allopurinol. *Journal of Thorac Cardiovasc Surgery* 90: 68-72, 1985.
- Stillman B.: Cell Cycle control of DNA Replication. *Science* 6: 1659-1663, 1996.
- Srinivas M, Agarwala S, Datta Gupta S, *et al*: Fertility and unilateral undescended testis in the rat model II. *Pediatric Surgery International* 13:392-395, 1998.



- Tamarkin L., Baird C., Aimeida O.: Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227:714-20, 1985.
- Tan D., Manchester L., Terron M., *et al*: One molecule, many derivatives: A never ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. *Journal of Pineal Research* 42: 28-42, 2007.
- Testut L., Latarjet A.: *Compendio de Anatomía Descriptiva*. Editorial Salvat, México PT 776, 1992.
- The Biology Project Department of Biochemistry and Molecular Biophysics: *Mitosis and Cell Cycle*, University of Arizona, 1997.
- Tijmes M., Pedraza R., Valladares L.: Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 61: 65-68, 1996.
- Tilly J., Tilly K.: Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136: 242-252, 1995.
- Um H., Orenstein J., Wahl S.: Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway. *Journal of Immunology* 156: 3469-3477, 1996.
- Vakkuri O., Rintamaki H., Leppaluoto J.: Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *Journal of Endocrinology* 105: 263-268, 1985.
- Valenti S., Fazzuoli L., Giordano G., *et al*: Changes in binding of iodomelatonin to membranes of Leydig cells and steroidogenesis after prolonged in vitro exposure to melatonin. *International Journal of Andrology* 24(2): 80-86, 2002.
- Vaughan G., Reiter R.: Pineal dependence of the Syrian hamster's nocturnal serum melatonin surge. *Journal of Pineal Research*, 3: 9-14, 1986.

- Viguera VRM, Merchant LH, Reyes TG, Alpuche O: The histological effect of the human chorionic gonadotropin and a luteinizing hormone-releasing hormone on experimental cryptorchidism in rats. *Proc West Pharmacol Soc.* 42: 71, 1999.
- Viguera VRM., Merchant LH.: El descenso testicular. *Conceptos actuales. Acta Pediátrica México*, 22(6): 424-431, 2001.
- Viguera VRM, Moreno MN, Reyes TG, Merchant LH.: Androgen receptor and calcitonin gene related peptide in neurons of the genitofemoral nerve during testicular descent induced with hCG. *Archives of the Medical Research* 34:166-170, 2003.
- Viguera VRM, Moreno MNA, Reyes TG, Merchant LH.: Gubernacular fibroblasts express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with hCG. *Urological Research* 32(6):386-90, 2004.
- Viguera-Villaseñor RM, Moreno-Mendoza NA, Reyes-Torres G, *et al*: The effect of estrogen on testicular gonocyte maturation. *Reproductive Toxicology*, 22:513-520, 2006.
- Viguera-Villaseñor RM, Molina-Ortiz D, Reyes-Torres G, *et al*: Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Aceptado en la revista Acta Histochemica* doi:10.1016/j.acthis.2008.05.004, 2008.
- Wakatsuki A., Okatani Y., Izumiya C., *et al*: Melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative lipid and DNA damage in fetal rat brain. *Journal of Pineal Research* 26(3): 147-152, 1998.
- Wakatsuki A., Okatani Y.: Melatonin protects against the free radical-induced impairment of nitric oxide production in the human umbilical artery. *Journal of Pineal Research* 28(3): 172-178, 1999.
- Weidner W., Colpi G., Hargreave T., *et al*: EAU Guidelines on Male Infertility. *European Urology*, 42 (4): 313-322, 2002.
- Weiss L.: *Histología*. Editorial El Ateneo, México, PT 1100, 1986.

- Wu N., Muroso E.: Temperature and germ cell regulation of Leyding cell proliferation stimulated by Sertoli cell-secreted mitogenic factor a possible role in cryptorchidism. *Andrology* 28:247, 1996.
- Wu R., Bonner M.: Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* 27:321-330, 1981.
- Yamashita YM., Jones DL., Fuller MT.: Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301(1547-1550), 2003.
- Yates D., Hayes G., Heffernan M., *et al*: Incidence of cryptorchidism in dogs and cats. *Veterinary Record*, 152: 502-504, 2003.
- Yin Y., Stahl B., De Wolf W., *et al*: p53 and FAS are secuencial mechanisms of testicular germ cell apoptosis. *Journal of Andrology* 23(1): 64-70, 2002.
- Yu BP.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiology Review* 74: 139-162, 1994.
- Zhao H., Pang S., Poon A.: mt<sub>1</sub> Receptor-mediated antiproliferative effects of melatonin on the rat uterine antimesometrial stromal cells. *Molecular Reproduction and Development* 61(2): 192-199, 2002.
- Zakaria O., Shono T., Imajima T., *et al*: Fertility and histological studies in a unilateral cryptorchid rat model during early and late adulthood. *British Journal of Urology* 82:404-407, 1998.
- Zarco L., Boeta M.: Reproducción Equina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, PT 144-148, 2000.
- Zhou B., Hutson JM., Hasthorpe S.: Histomorphometric study on germ cell differentiation of unilateral cryptorchidism in the immature pig. *Journal of Pediatric Surgery* 31(10): 1364-1366, 1996.