



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO PROTECTOR DE LA VITAMINA E SOBRE RATAS  
CON CRIPTORQUIDIA Y ORQUIDOPEXIA

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**ZOILA IDAHUE OJEDA RAMÍREZ**

Tutor:

Rosa María Viguera Villaseñor

Comité Tutorial:

María Elena Trujillo Ortega  
María de Lourdes Juárez Mosqueda

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.

## DEDICATORIAS

### **A mi hijo Ian Yamil**

Gracias a tu amor e inocencia me has dado el aliento necesario para seguir luchando, además, a tu lado he vuelto a aprender lo que realmente importa en la vida.

## AGRADECIMIENTOS

**Rosy Viguera**s, gracias por tu apoyo y dedicación para la realización de esta tesis.

Al **CONACYT** por el financiamiento de este proyecto. Becario: 210517.

Al **Instituto Nacional de Pediatría**.

**Madre**, tu apoyo me ha llevado tan lejos como he querido. Muchas gracias.

**Dra. Ma. Elena Trujillo y Dra. Lourdes Juárez**, agradezco su apoyo y consejos.

**Pedro Medina**, gracias por tu ayuda en el laboratorio, por tu infinita paciencia y por transmitirme tus conocimientos.

**Octavio Ferreyra**, como olvidarte, gracias por tu grandísimo apoyo en todos los aspectos.

A los integrantes del laboratorio de Histomorfología del Instituto Nacional de Pediatría con quienes conviví: **Edgar, Margarita, Marcos, Oscar, Julio**, gracias por su ayuda.

Portada

Índice

Resumen

Introducción

Material y métodos

Resultados

Discusión y conclusiones

Referencias

Anexos ..

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Duración de la espermatogénesis en las diferentes especies.

Tabla 2. Reacciones en la producción de especies reactivas de oxígeno y participación de las enzimas antioxidantes.

Tabla 3. Escala de cuantificación del índice histopatológico.

Tabla 4. Valoración del grado de maduración del epitelio seminífero.

Tabla 5. Peso del testículo en relación al peso corporal de rata.

Tabla 6. Cantidad de especies reactivas de oxígeno encontradas en testículo de rata a los 40 días de edad.

Tabla 7. Índice histopatológico, de maduración (Johnsen) y área epitelial en testículo de rata.

Tabla 8. Apoptosis y proliferación en testículo de rata.

Tabla 9. Número de crías nacidas vivas y sanas obtenidas en la prueba de fertilidad de rata de 120 días de edad.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que muestra la anatomía del testículo y epidídimo.

Figura 2. Corte transversal de un túbulo seminífero en donde se muestran sus componentes celulares.

Figura 3. Esquema de la espermatogénesis. Se observan los diferentes estados celulares.

Figura 4. Diagrama esquemático de la regulación hormonal de la espermatogénesis, eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Figura 5. Duración de las fases del descenso testicular en las diferentes especies.

Figura 6. Fases del descenso testicular en donde se observan los diferentes cambios anatómicos.

Figura 7. Disección parcial de una rata neonata en donde se exponen las estructuras de la región inguinal involucradas en el descenso testicular.

Figura 8. Esquema que representa el mecanismo de acción de la testosterona en la segunda fase del descenso testicular.

Figura 9. Porcentaje de niños recién nacidos con criptorquidia y con un peso al nacimiento  $\geq$  2500 g en estudios consecutivos.

Figura 10. Porcentaje de testículos retenidos que descienden dentro del escroto después del tratamiento con gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), GnRH después de recibir testosterona esteroide (GnRH esteroide) o GnRH después de recibir testosterona esteroide (GnRH esteroide).

Figura 11. Esquema del desarrollo de las células germinales en donde se muestran los puntos susceptibles de transformación en la criptorquidia.

Figura 12. Se muestra la reacción en cadena de la lipoperoxidación, iniciada por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado, dejando atrás un electrón descompuesto sobre el átomo de carbono.

Figura 13. Estructura química del tocol y del tocotrienol.

Figura 14. Estructura química de la  $\alpha$ -tocoferol.

Figura 15. Sitios de acción de la vitamina E en el proceso de la lipoperoxidación.

Figura 16. Reducción del radical de la vitamina E por el ácido ascórbico.

Figura 17. Reducción del radical de la vitamina E por el glutatión peroxidasa.

Figura 18. Metodología. Se muestran los diferentes grupos, los procedimientos y el número de animales utilizados en cada uno de ellos.

Figura 19. Peso del testículo con respecto al peso corporal de rata.

Figura 20. Determinación de especies reactivas de oxígeno en testículo de rata.

Figura 21. Índice de maduración (Johnsen) en testículo de rata.

Figura 22. Índice histopatológico en testículo de rata.

Figura 23. Área del epitelio seminífero en testículo de rata.

Figura 24. Porcentaje de apoptosis en testículo de rata.

Figura 25. Porcentaje de proliferación en testículo de rata.

Figura 26. Número de crías nacidas vivas y sanas obtenidas en la prueba de fertilidad de ratas de 120 días de edad.

Figura 27. Histología de túbulos seminíferos de ratas con 40 días de edad.

Figura 28. Histología de túbulos seminíferos de ratas con 120 días de edad.



Figura 29. Apoptosis en túbulos seminíferos de ratas con 40 días de edad.

Figura 30. Apoptosis en túbulos seminíferos de ratas con 120 días de edad.

Figura 31. Células en proliferación en túbulos seminíferos de ratas con 40 días de edad.

Figura 32. Células en proliferación en túbulo seminíferos de ratas con 120 días de edad.

## RESUMEN

La criptorquidia se define como la alteración en el descenso testicular y es el principal factor de riesgo de cáncer testicular y reducción de la fertilidad en edad adulta tanto en el humano como en algunas especies domésticas. Aún corregida puede interrumpir la espermatogénesis y alterar la fertilidad. Esto puede deberse a la degeneración de las células germinales asociada al estrés oxidativo como consecuencia del estrés calórico. La vitamina E es un potente antioxidante que evita la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas y estabiliza radicales peroxil, por lo se evaluó el papel de la vitamina E en ratas neonatas con criptorquidia experimental y posterior orquidopexia. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar distribuidas en 7 grupos. A los 10 días de edad se les indujo criptorquidia unilateral quirúrgica. A partir del día 25 y hasta el 40 de edad se administró la vitamina E y el vehículo. Al término del tratamiento, se practicó la eutanasia a la mitad de las ratas para determinar las especies reactivas de oxígeno. Al resto, se les realizó la orquidopexia, se les evaluó la fertilidad a los 90 días de edad y se les practicó la eutanasia a los 120 días para determinar la histología testicular, la apoptosis y la proliferación celular. La vitamina E logró disminuir la muerte por apoptosis y los daños histológicos en las células germinales, así como aumentó el grado de maduración del epitelio seminífero y el área epitelial posterior a la orquidopexia. El tratamiento con vitamina E previo a la orquidopexia, permite que se complete la espermatogénesis y favorece la fertilidad a futuro.

**Palabras clave:** *criptorquidia, vitamina E, estrés oxidativo, apoptosis, orquidopexia.*

## ABSTRACT

Cryptorchidism is defined as the alteration in the testicular descent and is the main factor of risk of testicular cancer and reduction of the fertility in adult age in the human as in some domestic species. Still corrected it can interrupt the spermatogenesis and alter the fertility. This can be due to the degeneration of the germinal cells associated to oxidative stress as a result of caloric stress. The vitamin E is a powerful antioxidant that avoids the oxidation of polyunsaturated fatty acids in membranes and stabilizes radicals peroxil, reason why the paper of vitamin E was evaluated in rats newborns with cryptorchidism and orchidopexia. Wistar rats male was distributed in 7 groups. To the 10 days of age was induced with surgical unilateral cryptorchidism. The vitamin E and the vehicle were administered of day 25 and until the 40 of age. At the end of the treatment, the euthanasia was practiced in the middle of the rats to determine the reactive oxygen species. To the rest to them, the orchidopexia was realised, the fertility of them was evaluated to the 90 days of age and the euthanasia was practiced to the 120 days to determine the testicular histology, the apoptosis and the cellular proliferation. The vitamin E reduced the histological damages and the death by apoptosis in the germinal cells, as well as increased the degree of maturation of seminiferous epithelium and the epithelial area after orchidopexia. The treatment with vitamin E previous to orchidopexia, allows that the spermatogenesis is completed and favors the fertility to future.

**Key words:** *cryptorchidism, vitamin E, oxidative stress, apoptosis, orchidopexia.*

## INTRODUCCIÓN

La criptorquidia se define como el descenso incompleto de uno o ambos testículos; afectando entre el 2% y el 8% de los niños al nacimiento (Virtanen *et al.*, 2007a). Este problema no solo atañe al humano, también es frecuente en caninos, equinos, suinos y felinos. Es importante revisar, a nivel anatómico y fisiológico, el aparato reproductor masculino, con la finalidad de entender las causas, las consecuencias, el manejo, así como la búsqueda del mejor tratamiento.

### 1. Anatomía del aparato reproductor masculino

Los órganos masculinos de la reproducción comprenden: un par de gónadas denominadas testículos, que producen los gametos masculinos (espermatozoides); un par de sistemas de conductos gonadales, constituido cada uno por un epidídimo y un conducto deferente que conduce por la uretra los productos exocrinos de los testículos; glándulas accesorias que contribuyen a aumentar el volumen del semen (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales); la uretra masculina, que va desde la vejiga hasta el extremo del pene y sirve para el pasaje de orina y semen; el pene, órgano copulativo masculino que deposita el semen en el tracto reproductor de la hembra; y adaptaciones cutáneas, escroto y prepucio, desarrolladas en relación con los testículos y el pene (Dyce, 1991).

#### 1.1. Testículo

Las gónadas masculinas o testículos están situadas en la mayoría de los mamíferos fuera del abdomen en el escroto, que es una estructura sacular derivada de la piel y la aponeurosis de la pared abdominal (Hafez, 2000). Son elipsoides sólidos cuyo volumen no guarda una proporción fija con el tamaño corporal. Su posición en el escroto y la orientación del eje mayor de los testículos

difieren con la especie (Dyce, 1991; Hafez, 2000). En la rata los testículos son retráctiles, ya que el conducto inguinal es abierto (Hafez, 1970). En el humano, el izquierdo generalmente está a un nivel inferior que el derecho. En general, cada testículo tiene dos extremos (uno superior y uno inferior), dos caras (interna y externa) y dos bordes (anterior y posterior). Ambas caras son algo aplanadas. El borde posterior está cubierto por el epidídimo y la porción inferior del cordón espermático (O'Rahilly, 1986). Cada testículo se encuentra fijo a la pared del proceso vaginal, una extensión separada del peritoneo que pasa a través de la pared abdominal en el conducto inguinal, a lo largo de la línea de su unión con el epidídimo (Dyce, 1991).

La túnica albugínea, la cubierta externa del testículo, es una extensión del peritoneo constituida principalmente por tejido conectivo y se encuentra por debajo de la capa visceral de la túnica vaginal (O'Rahilly, 1986; Dyce, 1991). Ésta emite tabiques fibrosos finos y trabéculas que pasan desde su cara profunda hacia el interior y dividen en forma no completa al testículo en lobulillos, cuya cantidad varía entre 250 y 400 en el humano, cada uno posee de uno a cuatro túbulos seminíferos contorneados. La base de cada lobulillo está en la cara profunda de la túnica albugínea; el vértice converge cerca del borde posterior del testículo, donde los tabiques también convergen y forman el mediastino testicular, el cual es una masa de tejido fibroso que se continúa con la túnica albugínea (McClintic, 1983; O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988; Dyce, 1991; König, 2007).

El parénquima está contenido a presión, por lo que emerge a través de cualquier incisión de la cápsula. Consta de los túbulos seminíferos contorneados (más de 800 en cada testículo) que se hacen menos tortuosos en su trayecto hacia atrás. A medida que se acercan al mediastino se unen y se forman entre 20 y 30 túbulos seminíferos rectos. Estos a su vez pasan a la rete testis o red de Haller, una red elaborada de conductos que atraviesa el mediastino. De esta red se forman de 15 a 20 conductos eferentes, que se contornean formando masas cónicas, los lobulillos de la cabeza del epidídimo (Figura 1) (O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988; Dyce, 1991).

Además de los túbulos seminíferos, el parénquima también está formado de tejido intersticial, el cual consta de células de Leydig y de células mioideas sostenidas por un armazón de tejido conectivo por el cual corren pequeños vasos sanguíneos y linfáticos (Dyce, 1991).

Las células que constituyen las paredes de los túbulos están divididas entre las células sustentaculares (de Sertoli), que cumplen funciones de sostén y de elaboración de hormonas, y las del epitelio germinal (Dyce, 1991).

## 1.2. Epidídimo

El epidídimo es una estructura ubicada en el borde posterior del testículo y recubre la porción adyacente de la cara externa. Está subdividido en tres partes: cabeza, cuerpo y cola (Baker, 1979; O'Rahilly, 1986; König, 2007).

Los lobulillos de la cabeza del epidídimo, formados a partir de los conductos eferentes, se dirigen hacia un solo tubo, el conducto del epidídimo; el cual forma la masa principal del epidídimo y tiene una longitud de 6 m en el humano. La cabeza del epidídimo es la parte superior más grande, la cual se encuentra sobre el extremo superior del testículo. El cuerpo está adherido al borde posterior y está separado de la porción adyacente de la cara externa por el seno del epidídimo, un espacio formado por invaginación de la túnica vaginal en esta región. La cola del epidídimo es la parte más pequeña y más inferior. En ella el conducto del epidídimo aumenta en grosor y diámetro, y se convierte en el conducto deferente (O'Rahilly, 1986; Hafez, 2000).

La pared del conducto del epidídimo tiene una notable capa de fibras musculares lisas circulares y un epitelio pseudoestratificado de células cilíndricas con estereocilios (McClintic, 1983; Hafez, 2000; König, 2007).

Histológicamente pueden distinguirse tres segmentos del conducto del epidídimo, los cuales no coinciden con las regiones anatómicas macroscópicas. Los dos primeros se encargan de la maduración de los espermatozoides, mientras que el terminal se destina a su almacenamiento. Hay una disminución progresiva

de la altura del epitelio y los estereocilios, y ensanchamiento de la luz a través de los tres segmentos (Amann, 1987).

La maduración de los espermatozoides ocurre durante el tránsito por el epidídimo y su motilidad aumenta conforme entran en el cuerpo epididimario. El ambiente de las células espermáticas en la cola del epidídimo proporciona factores que favorecen la capacidad fecundante; cuando se encuentran en esta región tienen mayor fecundidad que los del cuerpo epididimario (Hafez, 2000). La capacidad especial de la cola de almacenar espermatozoides depende de las temperaturas relativamente bajas del escroto y de la acción de los andrógenos (Foldesey y Bedford, 1982).

### 1.3. Conducto deferente, cordón espermático y conducto eyaculatorio

El conducto deferente, con un diámetro de 0.3 mm, continúa al conducto del epidídimo como un tubo tortuoso situado detrás de la cola del epidídimo y conduce los espermatozoides al conducto eyaculatorio; poco a poco se torna recto al ascender por dentro del epidídimo, cerca del borde posterior del testículo. Aquí está rodeado por el plexo pampiniforme de venas, y se incorpora al cordón espermático, que también está formado por la arteria deferencial, la arteria espermática, el plexo venoso pampiniforme, vasos linfáticos, nervios para el testículo y epidídimo y la rama del nervio genitofemoral. El cordón espermático asciende hacia el anillo inguinal externo y sigue el conducto inguinal hasta llegar al anillo inguinal interno, donde el conducto deferente describe una curva brusca apartándose de los demás componentes del cordón. Después vira en dirección caudomedial para pasar debajo del uréter antes de alcanzar la superficie dorsal de la vejiga; hasta ubicarse sobre el lado interno de la vesícula seminal. En este lugar, el canal del conducto está ensanchado y tortuoso, y esta porción del conducto se denomina ampolla. El canal vuelve a estrecharse cerca de la base de la próstata, donde el conducto deferente se une al conducto de la vesícula seminal y forma el conducto eyaculador (McClintic, 1983; O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988; Dyce, 1991; König, 2007).

El conducto eyaculador es un tubo de escaso calibre formado por la unión del conducto deferente y el conducto de la vesícula seminal; atraviesa la próstata hacia abajo y adelante, separando al lóbulo medio de los lóbulos laterales, y se dirige hacia la uretra prostática (O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988).

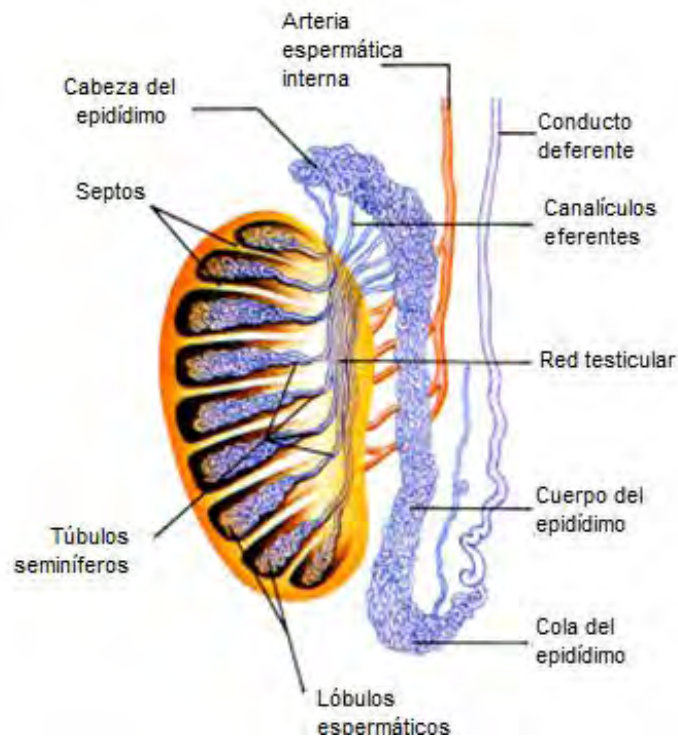


Figura 1. Esquema que muestra la anatomía del testículo y epidídimo. Tomado de [www.infoescola.com](http://www.infoescola.com).

#### 1.4. Vesículas seminales

Las vesículas seminales son dos sacos que producen gran parte del líquido seminal. Caracterizadas por dos extremos, uno ancho y otro estrecho. El extremo ancho se dirige hacia fuera, arriba y atrás, su extremo estrecho casi se acerca al de la vesícula contralateral. Están incluidas en una vaina densa, formada por músculo liso y tejido fibroso, y adherida a la cara posterior de la vejiga. Cada vesícula seminal está formada por un tubo enrollado, el cual da origen a varios divertículos. Su extremo inferior se une al conducto deferente (O'Rahilly, 1986).



### 1.5. Próstata

La próstata es un órgano fibromuscular, pélvico, que rodea la uretra y contiene glándulas que intervienen en la formación de líquido seminal. Está situada por detrás de la sínfisis del pubis y por delante del recto. Su base se fusiona con el cuello de la vejiga pero sobresale hacia los lados (O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988).

La cápsula de la próstata se encuentra dentro de la fascia de éste órgano. Bandas numerosas pasan hacia dentro desde la cápsula y dividen en forma incompleta al órgano en aproximadamente 50 lobulillos poco definidos. El tejido músculo-fibroso está dividido aproximadamente en 50 glándulas tubuloalveolares. Éstas desembocan en 20 o 30 conductillos prostáticos, los cuales se abren en la pared posterior de la uretra (McClintic, 1983; O'Rahilly, 1986).

La secreción de la próstata tiene un olor característico y es viscosa; aporta el 37% del volumen del eyaculado y es rico en fructuosa y ácido cítrico (Hafez, 1970; McClintic, 1983; O'Rahilly, 1986).

Los cambios en las concentraciones de andrógenos afectan al tamaño y a la estructura de la próstata (O'Rahilly, 1986).

### 1.6. Glándulas bulbouretrales o de Cowper

Las glándulas bulbouretrales o de Cowper son dos estructuras redondeadas incluidas en la estructura del esfínter de la uretra. Son de tipo tubuloalveolar y secretan un líquido translúcido. Sus conductos pasan por la membrana perineal, penetran en el bulbo del pene y atraviesan su estructura. Después de su trayecto, terminan abriéndose en la cara inferior de la porción esponjosa de la uretra (McClintic, 1983; O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988; Fox, 2002).

### 1.7. Glándulas coagulantes y prepuciales

Éstas son glándulas anexas al aparato reproductor del macho en la rata. Las glándulas coagulantes se encuentran adosadas a la curva de las vesículas seminales y su función es la formación del tapón copulatorio o vaginal, el cual

evita la salida del semen del aparato reproductor de la hembra. Este tapón es necesario para la fertilización (Chiasson, 1994).

Las glándulas prepuciales o de Tyson son estructuras pequeñas y lobuladas ubicadas entre el prepucio y el glande del pene. Están compuestas de dos tipos de células: escamosas y acinares. Su secreción holócrina es llamada "*esmegma*" (Chiasson, 1994).

### 1.8. Escroto

La piel escrotal es relativamente fina pero bien provista de glándulas sudoríparas y sebáceas (O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988; Dyce, 1991; König, 2007). Se observa un surco en la línea media, el rafe escrotal, que indica la división del escroto en dos compartimentos. Este rafe se continúa hacia delante con el del pene y hacia atrás con el del perineo (O'Rahilly, 1986). El escroto está adherido a una fuerte capa muscular, túnica dartos, que también se extiende como tabique entre los compartimentos que alojan a los testículos por separado y es el que le da el aspecto rugoso. Está constituido en su mayor parte por fibras musculares lisas y no contiene grasa. Por dentro del dartos hay una fascia que puede resolverse en varias capas que concordarían con las capas de la pared abdominal. La capa predominante es la fascia espermática externa o túnica celulosa, a la que se le puede separar del dartos, es una prolongación de la aponeurosis profunda del oblicuo abdominal externo. Sostiene a la túnica vaginal y rodea al cremáster, músculo que entra en el cordón espermático luego de desprenderse del margen caudal del músculo oblicuo interno del abdomen. Le sigue la fascia cremastérica o túnica muscular, posee las asas musculares del cremáster y se continúa con el músculo oblicuo interno y su aponeurosis. La fascia espermática interna o túnica fibrosa, corresponde al tejido extraperitoneal y está situada inmediatamente por fuera de la capa parietal de la túnica vaginal (McClintic, 1983; O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988; Dyce, 1991; König, 2007).

El escroto, los músculos cremáster y la vasculatura espermática constituyen un mecanismo eficaz termorregulador. La túnica dartos y los músculos

cremáster regulan el área de la superficie escrotal y la posición de los testículos con respecto a la pared abdominal, y la arteria espermática y el plexo pampiniforme proveen un mecanismo de intercambio de calor. La sangre arterial se enfría a medida que pasa entre los vasos del plexo pampiniforme y que corre sobre la superficie del testículo antes de pasar dentro del mismo. La sangre venosa se calienta por el intercambio de calor con la arteria (Pineda, 2003). La termorregulación también está dada por glándulas sudoríparas adrenérgicas ubicadas en la piel escrotal (Hafez, 2000).

### 1.9. Pene

El pene es el órgano copulatorio. Consiste en tres columnas de tejido eréctil. Estas columnas son independientes en su parte caudal, donde constituyen la raíz del pene, pero las partes principales están combinadas en el cuerpo del órgano (O'Rahilly, 1986; Dyce, 1991; König, 2007).

La raíz del pene es la porción fija de éste órgano, situada en el espacio perineal superficial. Comprende las raíces de los cuerpos cavernosos y el bulbo del cuerpo esponjoso, que son tres formaciones de tejido eréctil. Este bulbo está cubierto por el músculo bulboesponjoso estriado. La porción posterior ensanchada del bulbo es perforada por arriba por la uretra, que se extiende hacia delante en su espesor. Al dirigirse hacia adelante se va adelgazando y se dobla hacia abajo para continuarse como cuerpo esponjoso del pene (O'Rahilly, 1986; Dyce, 1991).

El cuerpo del pene es la porción libre y colgante y está cubierto de piel. Está formado por dos cuerpos cavernosos que se agrupan alrededor de la uretra peneana y constituyen la mayor parte del volumen del cuerpo del pene. El cuerpo esponjoso es más delgado y rodea a la uretra (O'Rahilly, 1986; Hafez, 2000), en su terminación se expande súbitamente para formar el glande del pene (O'Rahilly, 1986).

Los tres cuerpos se dividen en muchos espacios llenos de sangre, los espacios cavernosos, mediante abundantes trabéculas que se extienden dentro de ellos a partir de la túnica albugínea y del tabique peneano. Estas trabéculas se

extienden en todas direcciones a través del tejido eréctil (O'Rahilly, 1986; Lockhart, 1988; König, 2007).

La rata, a diferencia del humano, tiene un hueso peneano (Farris, 1949; Shively, 1987).

## 2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se forman espermatozoides a partir de células germinales indiferenciadas, que involucra a la mitosis y la meiosis, una diferenciación morfológica y una reorganización celular (Kretser *et al.*, 1998; L'Hernault, 2006; Huleihel *et al.*, 2007). Aproximadamente 10 diferentes tipos celulares son producidos y participan en este proceso, los cuales bajo condiciones normales, son precisos y consistentes en tiempo, produciendo el número de células germinales y somáticas necesarias (Weinbauer y Wessels, 1999).

El epitelio germinal está compuesto de dos tipos de células somáticas: (mioideas y células de Sertoli) y de células germinales (espermatogonia, espermatocono primario y secundario, espermátida y espermatozoide) (Austin y Short, 1982). Las células germinales jóvenes se encuentran sobre la membrana basal y las sucesivas células se dirigen hacia el lumen del túbulo seminífero, colocándose en diferentes capas dependiendo del grado de maduración, con las espermátidas situadas cerca del lumen. Las células de Sertoli nutren y cuidan a las células germinales (Figura 2) (Weinbauer y Wessels, 1999; Hafez, 2000).

La duración de la espermatogénesis varía de acuerdo a la especie. En el caso de la rata, la duración es de 52 días con 14 asociaciones celulares distintas (Clermont *et al.*, 1959; Knobil y Neil, 1994; Hafez, 2000) y en el humano 75 días con 6 asociaciones (Tabla 1) (Knobil y Neil, 1994; De Jonge y Barratt, 2006; Sofikitis *et al.*, 2008).

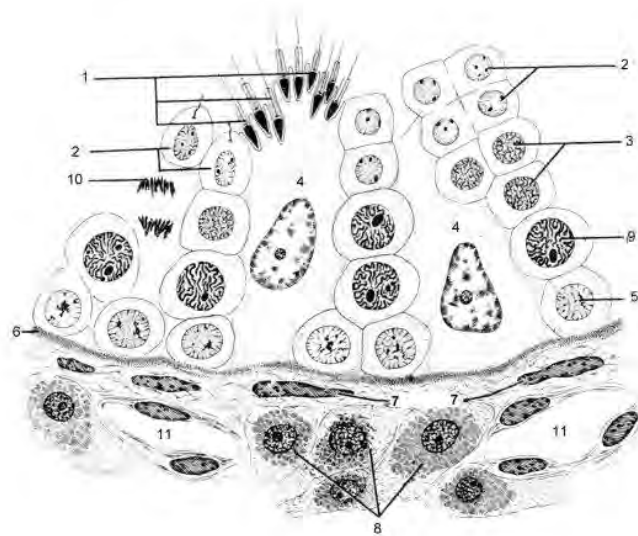


Figura 2. Esquema de un corte transversal de un túbulo seminífero en donde se muestran sus componentes celulares. Espermatozoide (1), espermátida (2), espermatoцитo secundario (3), célula de Sertoli (4), espermátogonia (5), lámina basal (6), fibroblasto (7), célula de Leydig (8), espermatoцитo primario (9), célula en división (10), vaso sanguíneo (11). Tomado de <http://rge.fmrp.usp.br>.

Tabla 1. Duración de la espermatogénesis en las diferentes especies.  
Tomado de Boneta, 2009 y Knobil y Neil, 1994.

Especie	Duración en días
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
Hámster	35-36
Conejo	48
Cuyo	33.8
Humano	74-76

La espermatogénesis consta de las siguientes etapas: espermatocitogénesis, meiosis, espermiogénesis y espermiación (Figura 3) (Hafez, 2000).

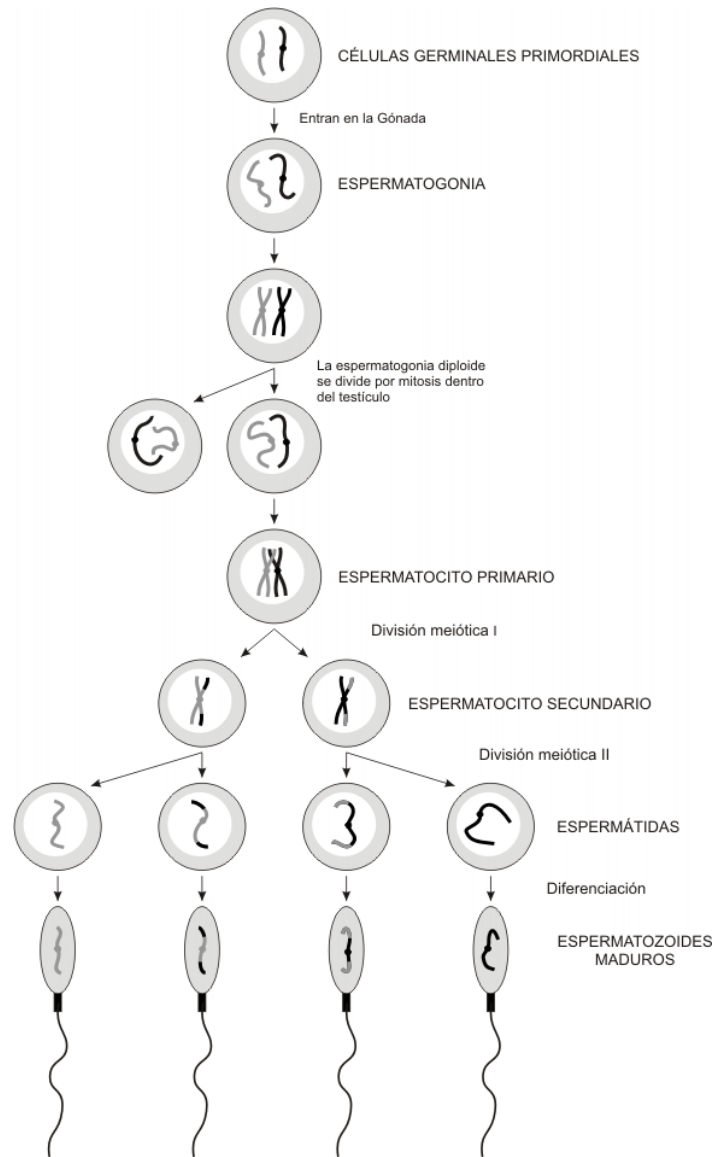


Figura 3. Esquema de la espermatogénesis. Se observan los diferentes estados celulares. Tomado de [www.genomasur.com](http://www.genomasur.com).

## 2.1. Espermatocitogénesis

Esta etapa es importante porque en ella se forman las grandes poblaciones de células germinales (Hafez, 1970). Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales emigran desde la región del saco vitelino del embrión hacia las gónadas no diferenciadas. Después de llegar a la gónada fetal, las células primordiales se dividen varias veces, formando los gonocitos A0 o células *stem* (As) (Austin y Short, 1982). Éste tipo de espermatogonias son la fuente para la continua producción de gametos. Después de la pubertad y durante la vida reproductiva del macho, las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva por mitosis. La mitad de ellas se dividen y forman células iguales (células madre) y aproximadamente la otra mitad forma espermatogonias A1, que nuevamente por divisiones mitóticas forman espermatogonias A2, A3 y A4. El tipo A4 sufre mitosis para formar la espermatogonia intermedia (A In), que a su vez, por mitosis, forma la espermatogonia B. Las espermatogonias B pasan por mitosis para formar los espermatocitos primarios (Hafez, 2000; Galina, 2008; Sofikitis *et al.*, 2008).

En el humano, se distinguen principalmente tres tipos de espermatogonias, A pálida, A oscura y la B. Sin embargo, el proceso de espermatocitogénesis es el mismo (Kretser *et al.*, 1998)

## 2.2. Meiosis

Los espermatocitos primarios inician la primera etapa de la meiosis para dar lugar a los espermatocitos secundarios; en la segunda etapa de la división meiótica, cada espermatocito secundario se divide para formar las espermátidas redondas (Hafez, 1970; Galina, 2008).

Durante la meiosis, el material genético se recombina y es segregado. El espermatocito primario realiza su primera división meiótica o reduccional para dar origen a los espermatocitos secundarios. Ésta es una fase prolongada donde ocurren cambios de material genético entre los pares de cromosomas, en donde la profase a su vez se subdivide en preleptoteno, leptoteno, cigoteno y diploteno. En

este periodo no sólo se realiza la reducción en el número de cromosomas somáticos, sino que también los cromosomas sexuales se separan de manera que un espermatocito secundario recibe el cromosoma X y el otro el Y. En la segunda división meiótica de cada espermatocito secundario se producen dos espermátidas redondas (Kretser *et al.*, 1998; Galina, 2008).

### 2.3. Espermiogénesis

Es un proceso de metamorfosis que consiste en la transformación de las espermátidas en espermatozoides estructuralmente listos para fertilizar al óvulo (Galina, 2008; Sofikitis *et al.*, 2008). Estos cambios ocurren cuando las espermátidas están en contacto con el citoplasma de la célula de Sertoli. Uno de los signos característicos es el alargamiento de las espermátidas y su migración hacia el lumen del túbulo (Huleihel *et al.*, 2007; Galina, 2008).

Las diversas etapas de la transformación de las espermátidas se dividen en cuatro fases: (1) de Golgi, se caracteriza por la formación de gránulos pro-acrosómicos dentro del aparato de Golgi, la coalescencia de los gránulos en uno solo, la adhesión del gránulo acrosómico a la envoltura nuclear, y las etapas tempranas de la formación de la cola en el polo opuesto al de la adhesión del gránulo acrosómico, el centriolo proximal se acerca al núcleo de encasquetamiento; (2) de capuchón, esta fase se caracteriza por la dispersión del gránulo acrosómico adherente en la superficie del núcleo de la espermátida hasta que aproximadamente dos tercios de la porción anterior del núcleo queda cubierto, además, los componentes axonémicos, formados a partir del centriolo distal, se alargan más allá de la periferia del citoplasma celular; (3) acrosómica, se lleva a cabo una rotación de la espermátida, de modo que el acrosoma se dirige hacia la base del túbulo seminífero y la cola hacia el lumen, hay condensación de la cromatina nuclear, así como remodelación del núcleo; el acrosoma también se condensa, a su vez que se alarga. Los cambios en la morfología nuclear se acompañan de desplazamiento del citoplasma hacia la parte caudal del núcleo, donde aquél rodea la parte proximal de la cola en desarrollo. Las mitocondrias



comienzan a concentrarse cerca del axonema, donde forman la vaina; y (4) de maduración, en donde alrededor del axonema se forma una vaina fibrosa y las nueve fibras gruesas subyacentes, por su parte, las mitocondrias se empacan apretadamente en una vaina continua que se extiende desde el cuello hasta el anillo citoplásmico. En esta etapa, se forma el *cuerpo residual o gota citoplasmática*, que consiste en el citoplasma restante, el cual es fagocitado por la célula de Sertoli (Austin y Short, 1982; Kretser *et al.*, 1998; Hafez, 2000).

#### 2.4. Espermiación

La liberación de los espermatozoides al interior de los túbulos seminíferos se denomina espermiación. Después de la liberación de las células germinales maduras, los cuerpos residuales son fagocitados por las células de Sertoli para reciclar los componentes protoplásmicos (Hafez, 2000).

### 3. Control de la espermatogénesis

La espermatogénesis requiere de la acción de un grupo complejo de hormonas peptídicas y esteroideas, cada una con un papel importante en el funcionamiento normal del epitelio seminífero. Tales mensajeros hormonales son críticos no solo para la regulación del desarrollo de las células germinales, sino también para la proliferación y función de las células somáticas necesarias para el adecuado desarrollo del testículo (Holdcraft y Braun, 2004).

#### 3.1. Regulación hormonal

Las hormonas que regulan el proceso de la espermatogénesis se derivan primordialmente en tres sistemas u órganos: varias áreas del hipotálamo, lóbulo anterior de la hipófisis y el testículo (Hafez, 2000; Brehm y Stegerk, 2005) (Figura 4).

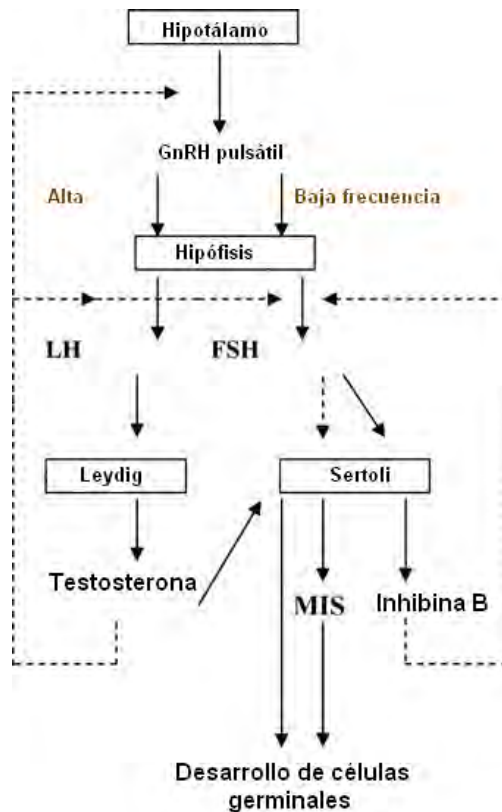


Figura 4. Diagrama esquemático de la regulación hormonal de la espermatogénesis, eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Tomado de Ong *et al.*, 2005.

### 3.1.1. Hipotálamo

La hormona del hipotálamo que regula tal proceso es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH o LHRH). Se trata de un decapeptido que proporciona un enlace humoral entre el sistema neural y el endócrino. Así, en el área preóptica y área ventromedial se localizan las neuronas productoras de GnRH (De Jonge y Barratt, 2006; Galina, 2008). En respuesta a las señales neurales, se liberan impulsos de GnRH por los axones de las neuronas en la eminencia media. En esa región, se origina el sistema portal hipofisiario, que consiste en una red capilar que permite el paso de la hormona de la eminencia media hasta la hipófisis anterior, sin pasar por la circulación general (Hafez, 2000; Perera *et al.*, 2007; Galina,

2008). En el macho o género masculino, la GnRH tiene una producción solamente tónica (Galina, 2008).

### 3.1.2. Lóbulo anterior de la hipófisis

La hipófisis anterior secreta la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), ambas son glucoproteínas secretadas por los gonadotropos. Cada una de ellas consiste en dos subunidades: alfa y beta. La subunidad alfa es común en ambas hormonas, mientras que la beta confiere la especificidad del receptor a cada gonadotropina en una especie determinada (Hafez, 2000; Holdcraft y Braun, 2004; Perera *et al.*, 2007).

Estudios indican que la función principal de la FSH en la espermatogénesis es estimular la proliferación de las células de Sertoli antes de la pubertad (Heckert y Griswold, 2002). La cantidad de células de Sertoli determina el número de células germinales (Sharpe, 1994).

En el macho, la LH estimula la producción de testosterona (T) por las células de Leydig (Pineda, 2003; Galina, 2008).

### 3.1.3. Testículo

Dentro de la gónada, las células de Sertoli, así como las de Leydig, son las encargadas de regular la espermatogénesis.

#### 3.1.3.1. Célula de Sertoli

Además de estimular la proliferación de las células de Sertoli, la FSH también estimula en ellas la secreción de muchos factores necesarios para el desarrollo exitoso de las espermatogonias en espermatozoides. Estos factores pueden estar en forma de mantenimiento físico, de barreras o uniones complejas, o pueden ser estimulación bioquímica en forma de factores de crecimiento o nutrientes (Griswold, 1998). De hecho, los factores secretados por Sertoli son influenciados por el tipo de células germinales presentes en el epitelio seminífero (Jegou, 1993).

Las proteínas secretadas por éstas células se pueden clasificar en cuatro categorías dependiendo de sus propiedades. La primera incluye proteínas de transporte o bioprotectivas que son secretadas en alta abundancia, e incluye la transferrina, proteína unidora de andrógenos (ABP) y la ceruloplasmina. La segunda categoría incluye proteasas e inhibidores de proteasas, importantes en el proceso de espermiación y en el movimiento de espermatozoides en preleptoteno al compartimento adluminal. La tercera categoría incluye glicoproteínas que forman la membrana basal del túbulo seminífero y finalmente, la cuarta categoría incluye glicoproteínas que se secretan muy poco y que aún no se sabe a ciencia cierta la función bioquímica de muchas de ellas (Griswold, 1995).

Entre estas glicoproteínas se encuentran los factores de crecimiento, de diferenciación, proliferación y de supervivencia como el factor celular *stem*, la inhibina, activina, folistatina, el factor neurotrópico derivado de la línea celular glial, la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS), el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento asociado a insulina I, el factor de crecimiento tumoral alfa, entre muchos otros (Weinbauer y Wessels, 1999; Hafez, 2000; Pineda, 2003; Sharpe *et al.*, 2003; Huleihel *et al.*, 2007; Galina, 2008; Sofikitis *et al.*, 2008). Además de la producción de las diferentes glicoproteínas, también se lleva a cabo la conversión de andrógenos a estrógenos, éstos últimos también necesarios para la proliferación, diferenciación y función de las células germinales (Bilińska *et al.*, 2006).

La inhibina, la activina y la folistatina también están involucradas en este sistema de regulación. La inhibina funciona suprimiendo la secreción de FSH y la activina estimula su liberación, mientras que la folistatina antagoniza la acción de la activina (Mather, *et al.*, 1997; Weinbauer y Wessels, 1999).

#### 3.1.3.2. Célula de Leydig

La LH estimula la síntesis de andrógenos, principalmente la T, en las células intersticiales de Leydig, que son adyacentes a los túbulos seminíferos, a través de la estimulación de la síntesis de esteroides por la activación de las

enzimas involucradas en la esteroidogénesis (Domínguez, 1991; Hafez, 2000). Esta hormona esteroide actúa sobre diferentes tipos celulares tanto en el compartimento tubular como en el intersticial (Weinbauer y Wessels, 1999).

En las células de Sertoli, la T es indispensable para que se lleve a cabo la espermatogénesis, se ha sugerido que principalmente las etapas VII y VIII son dependientes de la estimulación por esta hormona esteroide (Domínguez, 1991). Kretser *et al.*, (1998), indicó que la T tiene un impacto importante sobre la mitosis de las espermatogonias así como en la finalización exitosa de la meiosis. También actúa como factor de supervivencia o antiapoptótico, de diferenciación y de adhesión en las espermátidas (Sofikitis *et al.*, 2008); así como provee sinergismo a la FSH para la producción de *caderinas*, proteínas necesarias para la unión de Sertoli a la membrana basal (Huleihel *et al.*, 2007).

Los andrógenos producidos no sólo difunden en las células de Sertoli (regulación autócrina), sino que también se secretan en la sangre y se transportan en ella unidos a la ABP para proporcionar una regulación endócrina de la espermatogénesis, inhibiendo la GnRH y a las gonadotropinas hipofisarias (Griswold, 1998; Weinbauer y Wessels, 1999; Hafez, 2000; Pineda, 2003). La T también tiene un control autócrino, es decir, sobre la misma célula que la produce: Leydig.

Evidentemente la T asume una función tanto en el desarrollo morfológico como en la función reproductiva; sin embargo, sus metabolitos, dihidrotestosterona y el estradiol en especial su receptor  $\alpha$ , también juegan un papel claramente importante en el mantenimiento de la fertilidad, el primero al regular el desarrollo de las células germinales y el segundo, al regular el fluido luminal en el epidídimo (Holdcraft y Braun, 2004).

Por otra parte, el receptor para andrógenos (RA) tiene una función importante en la regulación de los niveles de T a través de una retroalimentación negativa sobre las células de Leydig, vía endócrina sobre la producción de GnRH y la inhibición de la síntesis de LH (Amory y Bremner, 2001). En el testículo, las

células de Leydig, mioideas y de Sertoli expresan RA (Zhou *et al.*, 2002; Holdcraft y Braun, 2004).

### 3.2. Regulación por apoptosis

Hay un balance continuo entre la generación de células germinales y su muerte. Este balance es regulado por la muerte celular programada vía apoptosis. Los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis de las células germinales son regulados vía parácrina, autócrina y endócrina. Esos factores involucran la activación de diferentes vías de señalización intracelular, que incluyen la familia Bcl-2 (expresados en las células germinales del testículo inmaduro y en los espermatoцитos y espermátidas en el testículo maduro), la cual es inducida por la T, como se indicó en el apartado anterior; FAS y su ligando; el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y su ligando TRAIL; el gen p53, y el AMPc sensible al elemento modulador (CREM) expresado en las espermátidas redondas (Billig *et al.*, 1996; Sinha Hikim y Swerdloff, 1999; De Jonge y Barratt, 2006; Huleihel *et al.*, 2007).

## 4. Descenso testicular

En la mayoría de los mamíferos, el testículo desciende del abdomen a una posición extracorpórea para proveer de un ambiente con una temperatura baja con la finalidad de que se desarrolle una espermatogénesis normal. La temperatura intra-testicular, comparada con la temperatura corporal de un adulto, es de 2 a 4 °C menos (Hughes y Acerini, 2008). Evolutivamente hablando, el descenso testicular es un proceso costoso y muchas dificultades, de tipo fisiológicas y del desarrollo, pueden presentarse durante este proceso (Foresta *et al.*, 2008).

El descenso de los testículos al escroto es un proceso endócrino y morfológico complejo que involucra el incremento de la presión intra-abdominal, el desarrollo del epidídimo, el conducto deferente, el gubernáculo, el ligamento suspensor craneal, el propio testículo, el músculo cremáster, el proceso vaginal y el canal inguinal; el estímulo del nervio genitofemoral y varios estímulos de hormonas y péptidos biológicos activos con efecto parácrino y/o sistémico (Heyns

y Hutson, 1995; Viguera y Merchant, 2001; Costa *et al.*, 2002; Hutson y Hasthorpe, 2005; Amann y Veeramachaneni, 2007; Hughes y Acerini, 2008). Sin embargo, muchos aspectos de este proceso, altamente regulado son aún controversiales y pobremente entendidos.

Hutson (1985) propuso que el descenso testicular ocurre en dos fases secuenciales con diferentes mecanismos anatómicos y controles hormonales. Esta teoría describe el descenso del testículo de una posición abdominal a una localización dentro del escroto durante las fases: transabdominal e inguinoescrotal.

La duración de las fases del descenso testicular varía considerablemente en los diferentes mamíferos (Figura 5). En el humano, el testículo desciende generalmente al nacimiento, al igual que en el conejo, el cerdo y el caballo. Por otra parte, en el bovino y ovino los testículos descienden completamente durante la primera parte de la gestación; mientras que en el perro, la rata y el ratón, ocurre después del nacimiento. Independientemente del tiempo, estas especies muestran en común las dos fases del descenso testicular (Hughes y Acerini, 2008).

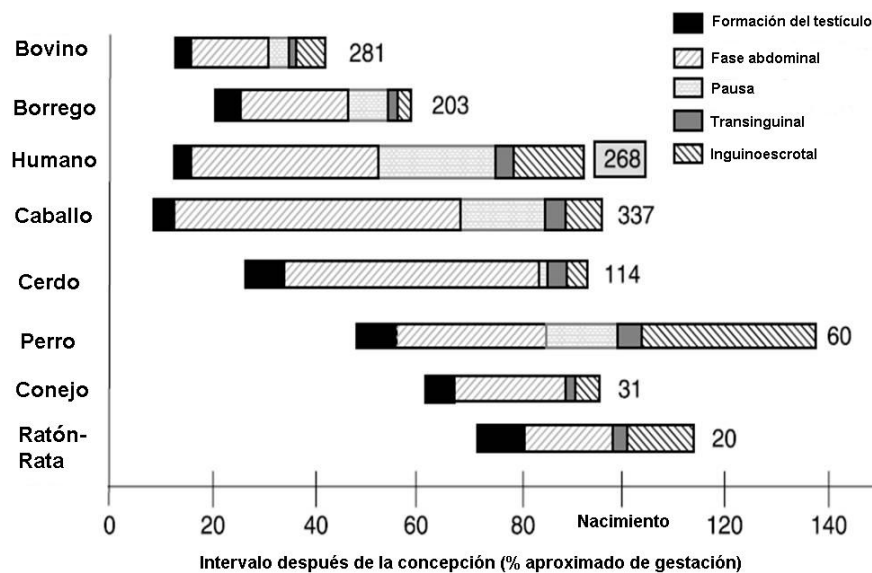


Figura 5. Duración de las fases del descenso testicular en las diferentes especies. Tomado de Hughes y Acerini, 2008.

#### 4.1. Fase transabdominal

En un principio la gónada indiferenciada se ubica en una posición perirrenal, y es sostenida por el ligamento suspensor craneal (LSC) hacia la pared abdominal posterior y por el ligamento genitoinguinal caudal o gubernáculo (G), el cuál conecta al testículo, vía epidídimo, al futuro anillo inguinal interno del canal inguinal. El G está compuesto de una matriz extracelular hidrofílica rica en glicosaminoglicanos (GAGs) y células mesenquimatosas, como fibroblastos y células de músculo liso, así como fibras de colágenos y elásticas. Este ligamento es la principal estructura encargada del descenso testicular. Adyacente a la gónada indiferenciada, de origen mesonefrónico, se encuentran los conductos de Woolf y de Müller (Heyns *et al.*, 1990; Ivell y Hartung, 2003; Hutson y Hasthorpe, 2005; Foresta *et al.*, 2008).

Durante la primera fase, los testículos siguen de cerca la futura región inguinal durante la ampliación de la cavidad abdominal y bajo la presión aumentada por el crecimiento de las vísceras abdominales. Debido al efecto de las hormonas, el LSC involuciona, mientras que el G desarrolla su segmento caudal (bulbo gubernacular) por mitosis, incrementando la síntesis de GAGs y depósitos de ácido hialurónico y agua ("*swelling reaction*"). Este desarrollo permite que el canal inguinal se dilate, el testículo permanezca muy cercano al anillo inguinal interno, y esto cause la migración del testículo hacia la región inguinal (Costa *et al.*, 2002; Hutson y Hasthorpe, 2005; Foresta *et al.*, 2008).

##### 4.1.1. Factor asociado a la insulina 3 (INSL3)

El INSL3 también conocido como factor asociado a la relaxina (RLF), es producido por las células de Leydig y su receptor, el LGR8 (receptor acoplado a la proteína G rico en leucina), muestra alta expresión en el G. De acuerdo a estudios animales, el INSL3 tiene un efecto directo sobre la "reacción de hinchazón" o "*swelling reaction*" del G (Ivell y Hartung, 2003; Hutson y Hasthorpe, 2005; Virtanen y Toppari, 2008; Foresta *et al.*, 2008).



Se ha observado que la expresión de INSL3 comienza en el día 14 del desarrollo embrionario, justo antes de la proliferación y diferenciación de células mesenquimatosas del G y el sobre crecimiento de éste, necesario para el descenso transabdominal que ocurre entre el día 15.5 y 17.5 post coito en el ratón. La concentración de INSL3 disminuye durante la pubertad y alcanza su expresión máxima en la edad adulta. Se sabe que el ratón macho con  $Ins13^{-/-}$  y  $Rfxp2^{-/-}$  muestra criptorquidia bilateral debido al daño en el desarrollo del gubernáculo (Adham y Agoulnik, 2004; Toppari *et al.*, 2007; Foresta *et al.*, 2008).

#### 4.1.2. Participación de los andrógenos y la sustancia inhibidora de Müller (MIS)

Además del desarrollo del gubernáculo, la regresión del LSC también parece contribuir en la posición del testículo (Lee y Hutson, 1999). Esta regresión es dependiente de los andrógenos, sin embargo, no son requeridos necesariamente para que se lleve al cabo la primera fase del descenso testicular. Estudios de desordenes asociados a defectos en la biosíntesis de andrógenos muestran que el testículo invariablemente desciende hacia la región inguinal (Figura 6) (Ivell y Hartung, 2003; Hughes y Acerini, 2008; Foresta *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha encontrado que las células mesenquimatosas del gubernáculo, específicamente los fibroblastos, expresan RA, lo que indica que los andrógenos también actúan aumentando la "*swelling reaction*" del G (Foresta *et al.*, 2008).

Otro factor implicado en la primera fase del descenso testicular es la MIS. Mutaciones en el receptor para MIS causan persistencia de los conductos de Müller en el macho, interrumpiendo, mecánicamente, el descenso de los testículos y provocando feminización del gubernáculo. Sin embargo, existe evidencia de que ratones deficientes en el receptor de MIS no sólo tienen descenso testicular normal, sino que también la MIS tiene un efecto indirecto sobre el crecimiento del G, por lo que su participación en el descenso testicular aún es controversial (Ivell y Hartung, 2003; Hutson y Hasthorpe, 2005; Virtanen y Toppari, 2008; Foresta *et al.*, 2008; Hughes y Acerini, 2008).

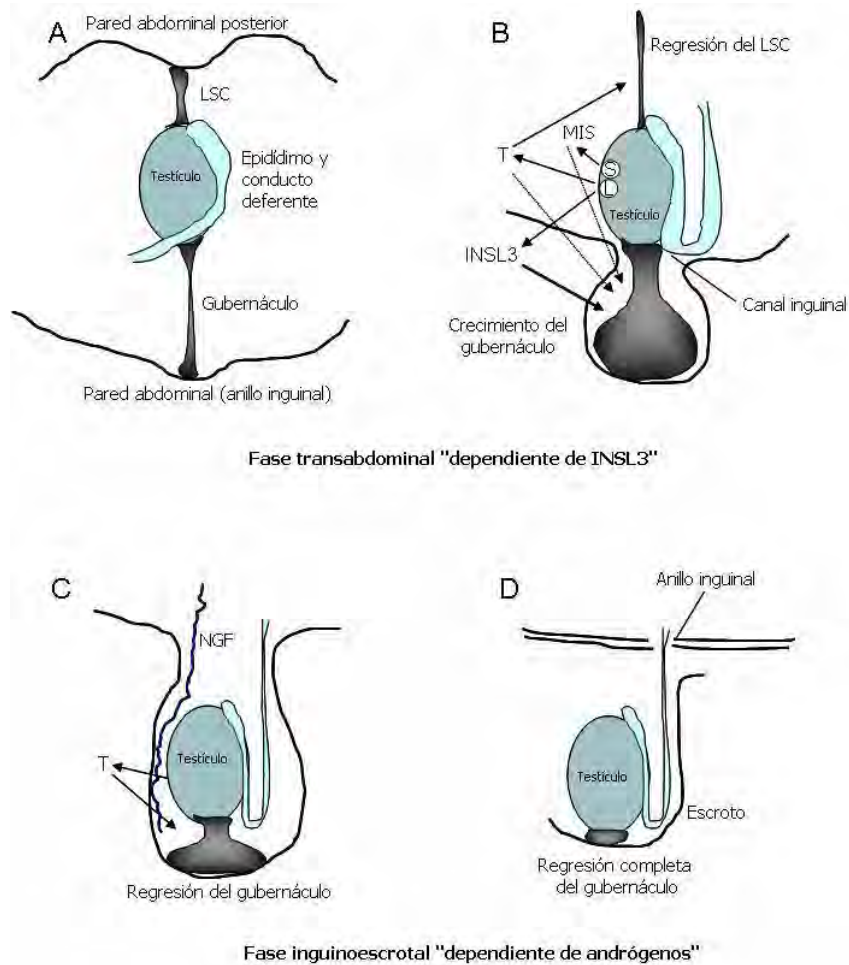


Figura 6. Fases del descenso testicular en donde se observan los diferentes cambios anatómicos. Durante la fase transabdominal el INSL3 induce desarrollo del gubernáculo lo que permite la dilatación del canal inguinal y el desplazamiento del testículo a una posición inguinal; a su vez, la T actúa sobre el LSC induciendo su regresión. En la fase inguinoescrotal, la T actúa directamente o a través del NGF para llevar a cabo la regresión del gubernáculo y así completar el descenso testicular. LSC indica ligamento suspensor craneal; T, testosterona; MIS, sustancia inhibidora de los conductos de Müller; S, células de Sertoli; L, células de Leydig; INSL3, péptido asociado a la insulina 3; NGF, nervio genitofemoral. Tomado de Foresta *et al.*, 2008.

#### 4.2. Fase inguinoescrotal

La migración testicular de la región inguinal hacia el escroto es predominantemente controlada por los andrógenos. En el tercer tercio de la gestación, y después del nacimiento en los roedores y el perro, el gubernáculo migra dentro del escroto. Sin embargo, algunos autores han sugerido que la influencia de los andrógenos sobre la migración del gubernáculo es vía indirecta a

través del nervio genitofemoral (Hutson y Beasley, 1987; Fallat *et al.*, 1991; Ng *et al.*, 2005).

#### 4.2.1. Andrógenos

Como anteriormente se mencionó, los fibroblastos expresan RA lo que permite durante la fase inguinoescrotal, una pérdida de la matriz extracelular y de numerosos fibroblastos a partir del incremento en la secreción de fosfatasa ácida y colagenasas, resultando en la involución del ligamento y bulbo del G, convirtiéndose éste progresivamente en una estructura fibrosa con pocas células, rica en fibras de colágeno y elásticas. Tales cambios disminuyen el tamaño del G, el ligamento tiende a acortarse y se incorpora al bulbo gubernacular, lo que fuerza al testículo a descender (Vigueras y Merchant, 2001; Costa *et al.*, 2002; Hutson *et al.*, 2004; Vigueras *et al.*, 2004).

Simultáneamente, el proceso vaginal y el músculo cremáster se alargan dentro del gubernáculo creando una extensión de la cavidad abdominal para formar el escroto, de esta manera, se permite el paso del testículo desde el anillo inguinal externo hasta su posición final. Posteriormente, el proceso vaginal se cierra con la finalidad de evitar la formación de hernias inguinales (Ng *et al.*, 2009) (Figura 7).

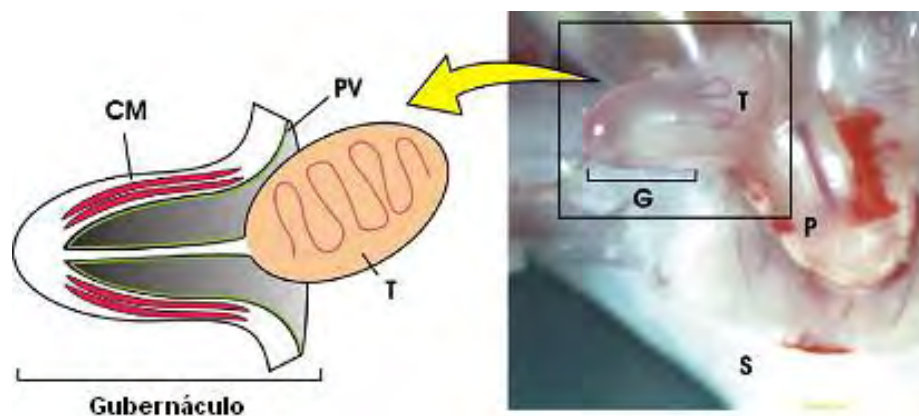


Figura 7. Disección parcial de una rata neonata en donde se exponen las estructuras de la región inguinal involucradas en el descenso testicular. El gubernáculo es móvil en la parte distal y es adherido al testículo en la parte proximal. El diagrama muestra un corte longitudinal de las estructuras dentro del gubernáculo. P indica pene; T, testículo; G, gubernáculo; S, región escrotal; PV, proceso vaginal; CM, músculo cremáster. Tomado de Yong *et al.*, 2008.

#### 4.2.2. Nervio genitofemoral (NGF)

En los roedores, los andrógenos secretados por el testículo actúan masculinizando el núcleo sensitivo del NGF (ganglio L1-L2), con síntesis y liberación de un neurotransmisor específico, el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP). El músculo cremáster contiene receptores para CGRP, causando contracción rítmica del gubernáculo (Momose *et al.*, 1992; Shono *et al.*, 1995; Viguera *et al.*, 2003; Hutson y Hasthorpe, 2005; Ng *et al.*, 2005; Foresta *et al.*, 2008; Hughes y Acerini, 2008).

Por otra parte, se ha demostrado que el CGRP incrementa la mitosis en el bulbo gubernacular de la rata, así como provee de señales quimiotácticas para el control de la migración del G en esta segunda fase (Ng *et al.*, 2005; Yong *et al.*, 2008) (Figura 8).

Se ha observado que los niños que presentan espina bífida tienen una alta frecuencia de criptorquidia, lo que sugiere que el NGF puede tener una función en el control del descenso testicular también en humanos (Ivell y Hartung, 2003; Virtanen y Toppari, 2008).

Por otra parte, algunos autores proponen que el CGRP no tiene que ver en el descenso testicular humano y que sólo actúa en el desarrollo del músculo cremáster en la rata, debido a que el músculo es un componente pequeño en el gubernáculo del hombre. Sin embargo, Harnaen *et al.*, (2007), encontró un parecido cercano entre el desarrollo del gubernáculo de la rata y el humano, permitiendo la extrapolación de la función del cremáster y el CGRP en el descenso testicular.

Recientemente, se ha sugerido que los nervios autónomos simpáticos pueden ser más importantes en el descenso testicular que el NGF (Hutson y Hasthorpe, 2005).

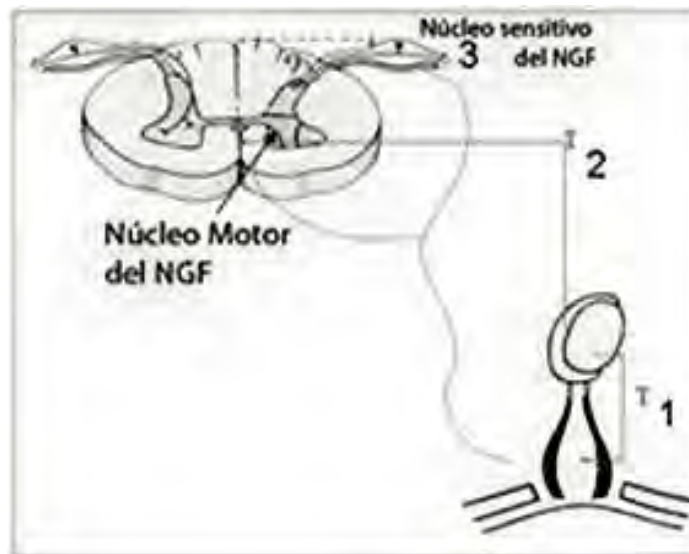


Figura 8. Esquema que representa el mecanismo de acción de la testosterona (T) en la segunda fase del descenso testicular. Acción directa sobre los fibroblastos del gubernáculo (1); acción indirecta sobre las neuronas del núcleo motor del nervio genitofemoral (NGF); éstas a su vez regulan la liberación del péptido asociado al gen de la calcitonina, producido por el núcleo sensitivo del NGF (3). Tomado de Viguera *et al.*, 2003.

## 5. Criptorquidia

La criptorquidia, del griego *orkhís* y *kryptós* (testículo escondido), es la falla en el descenso de uno o ambos testículos dentro del sacro escrotal y es el defecto congénito más frecuente al nacimiento en humanos. Además de ser considerada como una malformación, representa el principal factor de riesgo de cáncer testicular e infertilidad en la edad adulta (Foresta *et al.*, 2008).

### 5.1. Incidencia y clasificación

La incidencia reportada de acuerdo a estudios prospectivos en niños a término con un peso normal varía entre 2% y 8% (Virtanen *et al.*, 2007a). En una comparación entre estudios realizados durante las últimas dos décadas, se han observado diferencias geográficas aún inexplicables, reportándose un índice entre el 1.8% y el 8.4% en niños a término con un peso mínimo de 2.5 kg (Boisen *et al.*, 2004; Virtanen *et al.*, 2007a; Virtanen y Toppari, 2008) (Figura 9). Probablemente, influya en estas cifras el hecho de que en la actualidad no se cuenta con una

definición uniforme de la criptorquidia para la realización de los estudios (Foresta *et al.*, 2008).

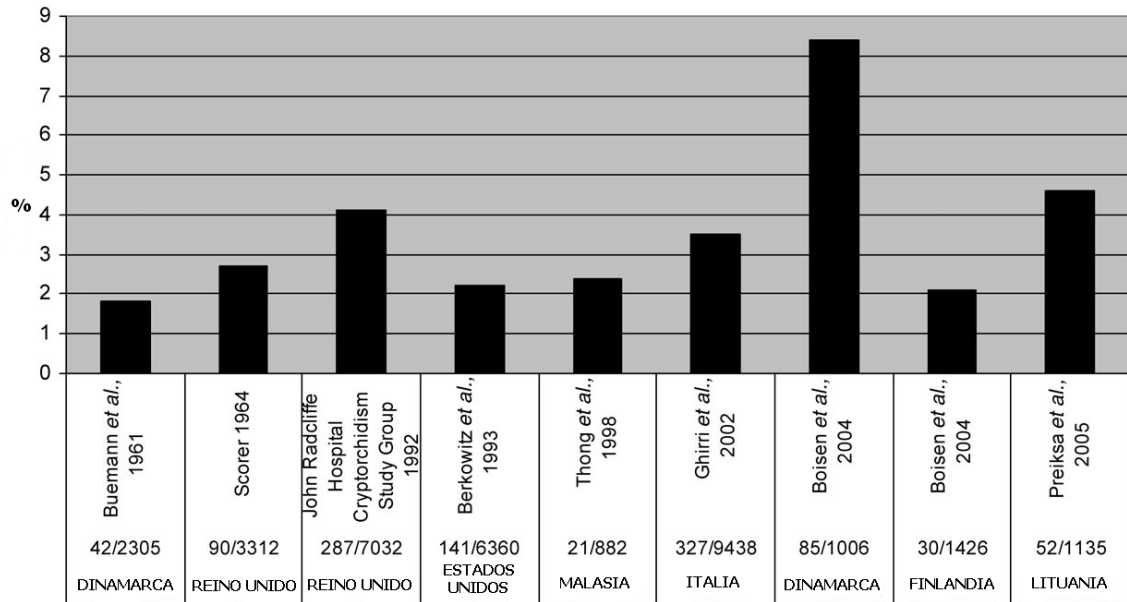


Figura 9. Porcentaje de niños recién nacidos con criptorquidia y con un peso al nacimiento  $\geq 2500$  g en estudios consecutivos. También se muestra el número de casos por número de niños examinados. Tomado de Virtanen y Toppari, 2008.

Alrededor del 50% de los niños que presentan criptorquidia al nacimiento, tienen descenso espontáneo durante los primeros 3 meses de vida, cuando la secreción de testosterona endógena incrementa, disminuyendo así la incidencia entre el 0.9% y el 1.8% al año de edad (Andersson *et al.*, 1998; Ivell y Hartung, 2003; Boisen *et al.*, 2004; Virtanen *et al.*, 2007a; Foresta *et al.*, 2008; Virtanen y Toppari, 2008).

En niños prematuros, con bajo peso al nacimiento ( $\leq 2.5$  kg) y una talla menor a la edad gestacional, se observa un incremento sustancial en la incidencia de la criptorquidia, alcanzando 20-25% (Ivell y Hartung, 2003; Foresta *et al.*, 2008).

La falla en el descenso testicular puede ocurrir de manera bilateral en un tercera parte de la población afectada y de manera unilateral en dos terceras

partes. Los testículos criptorquídicos son clasificados con base a su posición a lo largo de la ruta normal del descenso: abdominal alto, abdominal bajo, inguinal, supraescrotal, escrotal alto o ectópico. En la práctica clínica, una diferenciación entre palpable y no, unilaterial o bilateral parece ser más práctico (Virtanen *et al.*, 2007a; Foresta *et al.*, 2008).

En los animales domésticos, se ha reportado una incidencia de 3.3% en caninos; en felinos se observa entre 1% y 1.3% (Mansfield y Land, 2002; Yates *et al.*, 2003); en equinos la incidencia varía de acuerdo a la raza y se presenta en un 2% (Cox *et al.*, 1979); mientras que en los suinos, la criptorquidia se reporta como una anomalía frecuente y con un 3% de incidencia (Bernal-Mañas *et al.*, 2005).

Desafortunadamente en México no se cuenta con estudios en donde se reporte la incidencia de la criptorquidia en humanos ni en las especies domésticas. En el caso de los primeros, el Instituto Nacional de Pediatría, ubicado en la Ciudad de México, recibe numerosos pacientes con criptorquidia. A pesar de que no es la patología más tratada por el departamento de urología, los médicos señalan a la criptorquidia como una patología frecuente<sup>1</sup>.

## 5.2. Etiología y factores de riesgo

La criptorquidia puede ser causada por alguna anomalía de las estructuras anatómicas o mecanismos hormonales descritos anteriormente. Puede presentarse de manera aislada o puede estar asociada a otras anomalías congénitas como el síndrome de disgenesia testicular. La etiología, en su mayor parte, es aún desconocida; por lo que la criptorquidia puede ser considerada como una patología compleja (Hutson y Hasthorpe, 2005; Foresta *et al.*, 2008).

---

<sup>1</sup> Cuevas Alpuche Juan Osvaldo, Departamento de Urología, Instituto Nacional de Pediatría, México D.F., México. Comunicado personal.

De acuerdo a estudios en roedores, los factores que afectan el descenso testicular durante la fase transabdominal son: (1) mutaciones en el gen para INSL3 (V18M, P49S, R73X y R102C); (2) mutación en el receptor LGR8 (T222P) y (3) exposición a estrógenos (dietilestilbestrol) por parte de la madre, provocando la supresión de INSL3 y probablemente retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Ivell y Hartung, 2003; Bergh y Söder, 2007; Virtanen *et al.*, 2007b; Ferlin *et al.*, 2008; Virtanen y Toppari, 2008).

Por otra parte, los factores que impiden que se lleve al cabo la fase inguinoescrotal son: (1) mutaciones en el gen para AR, causando síndrome de insensibilidad al andrógeno; (2) mutaciones en el receptor para LH; (3) alteraciones en el eje HHG, provocando hipogonadismo hipogonadotrópico, (4) daños al NGF y (5) alteraciones en el gen para CGRP (Ivell y Hartung, 2003; Bergh y Söder, 2007; Foresta *et al.*, 2008; Virtanen y Toppari, 2008).

Sin embargo, existen otros factores de riesgo y alteraciones involucrados en la criptorquidia como daño en el gen para el factor de transcripción Hoxa-10, al cual se le ha relacionado con la “*swelling reaction*” del G; desarrollo del proceso vaginal, canal inguinal y escroto; alteraciones en la producción de MIS así como alteraciones en el gen para su receptor; exposición a xenobióticos como el dietilestilbestrol y el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT); daño en la biosíntesis de colesterol o andrógenos; bajo peso y edad gestacional al nacimiento; mal función placentaria; impedimentos mecánicos como la inexistencia del canal inguinal; complicaciones maternas durante la gestación (preclamsia y diabetes); variaciones estacionales; consumo de alcohol, cafeína y cigarro por parte de la madre y alteraciones cromosómicas (síndrome de Klinefelter, síndrome de Down, entre otros) (Møller y Weidner, 1999; Gray *et al.*, 2001; Ivell y Hartung, 2003; Toppari *et al.*, 2006; Virtanen *et al.*, 2006, 2007a; Bergh y Söder, 2007; Foresta *et al.*, 2008; Hughes y Acerini, 2008; Virtanen y Toppari, 2008).



### 5.3. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la criptorquidia

El diagnóstico es clínico y no siempre es fácil por lo que debe ser realizado por un experto en un ambiente tranquilo con la finalidad de minimizar el reflejo cremastérico (Virtanen *et al.*, 2007a; Gapany *et al.*, 2008).

Después de un consenso, Ritzén (2008) sugiere que si un paciente es diagnosticado con criptorquidia al nacimiento, debe esperarse hasta los 6 meses de edad (en el caso del humano) para permitir un descenso espontáneo por parte del testículo. Si no es así, se le debe dar un tratamiento quirúrgico con la realización de la orquidopexia (colocación quirúrgica del testículo dentro de la bolsa escrotal) antes de los 9 meses de edad y después de haber descartado que se trate de un testículo retráctil. Sin embargo, por sí misma, la orquidopexia no evita que en edad adulta los pacientes presenten problemas de fertilidad (Hadziselimovic, 2008).

Además de la orquidopexia, la criptorquidia también es tratada en algunos países con terapia hormonal. El tratamiento con gonadotropina coriónica humana (hCG) o la GnRH fue propuesto no solo para estimular el descenso testicular sino también para estimular el desarrollo de las células germinales (Friedman *et al.*, 1994; Hutson y Hasthorpe, 2005). Desafortunadamente, la terapia hormonal ha tenido pobres resultados sobre el descenso así como efectos secundarios poco deseables.

El tratamiento con hCG en el ratón provoca una estimulación precoz en los espermatozoides primarios antes de la pubertad, iniciando una espermatogénesis prematura, lo cual podría ser peligroso para la fertilidad futura (Zhou *et al.*, 2002). Además, incrementa la presión intra-testicular, provoca edema intersticial, extravasación de leucocitos y aumenta la apoptosis en las células germinales; observándose una disminución del 50% en el tamaño del testículo en la edad adulta (Bergh y Söder, 2007; Ritzén, 2008) (Figura 10).

Debido a lo anterior, se ha buscado un tratamiento alternativo o que se maneje antes o después de la orquidopexia; sin embargo, hasta el momento no se cuenta

con ningún tratamiento exitoso que evite la presencia de efectos secundarios poco deseables.

En los animales de compañía, perro y gato, el tratamiento se limita a la orquiectomía (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2003).

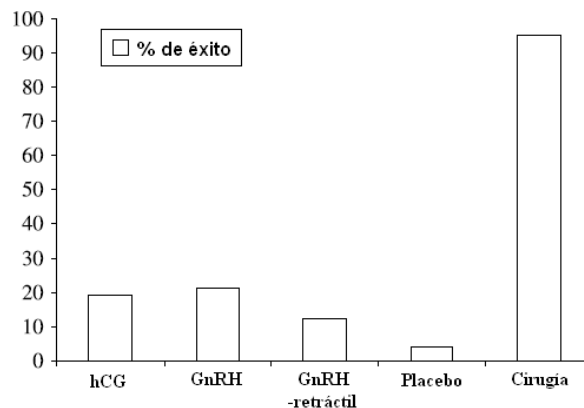


Figura 10. Porcentaje de testículos retenidos que descienden dentro del escroto después del tratamiento con gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), GnRH después de excluir testículos retráctiles (GnRH-retráctil), placebo y cirugía (orquidopexia). Tomado de Ritzén, 2008.

#### 5.4. Efectos a futuro

Hay suficiente información que muestra que los pacientes con criptorquidia tienen un alto riesgo a desarrollar carcinoma *in situ* (CIS) y por lo tanto cáncer testicular (seminomas) en un 2-3%, cuatro veces más que el resto de la población (Dieckmann y Skakkebaek, 1999; Foresta *et al.*, 2008). De igual manera, un alto riesgo de llegar a ser infértiles irreversiblemente (Ivell y Hartung, 2003). Se ha observado que el riesgo de desarrollar cáncer testicular es reducido si se realiza la orquidopexia antes de los 2 años de edad en el humano.

Por otra parte, Hadziselimovic (2008) reportó que a pesar de haberse tratado la criptorquidia quirúrgicamente en una edad temprana, gran cantidad de los pacientes fueron infértiles en edad adulta por daño irreversible a la espermatogonia A oscura. Además, el riesgo de bajo conteo espermático en edad

adulta es dependiente de la edad que se tenga al momento de la cirugía (Hadziselimovic y Herzog, 2001). Se ha observado que el índice de fertilidad de un hombre con criptorquidia bilateral corregida quirúrgicamente es significativamente bajo (50-60%) (Cooper y Little, 1985) al compararlo con pacientes con criptorquidia unilateral corregida (65-80%) (Elder, 1988) y con el índice de fertilidad de un hombre sano (93.2%) (Lee y Coughlin, 2001).

## 5.5. Patogenia de la criptorquidia

### 5.5.1. Estrés calórico: alteración en células de Sertoli, Leydig y germinales

Cuando se presenta la criptorquidia, el testículo se somete a una temperatura mayor a la adecuada generando estrés calórico. En un inicio, este tipo de estrés provoca un daño en la minipubertad (periodo en el cual hay un aumento de los niveles séricos de gonadotropinas y T poco tiempo después del nacimiento) por lo que la población adulta de Leydig no surge y Sertoli no prolifera, ocasionando que los gonocitos no se diferencien en espermatogonias Ad (Ong *et al.*, 2005; Toppari *et al.*, 2007; Virtanen *et al.*, 2007b; Hadziselimovic, 2008). Esta reserva de células madre son esenciales para que se desarrolle una espermatogénesis efectiva en la pubertad (Ivell y Hartung, 2003). Debido a esto, la realización de la orquidopexia más allá del primer o segundo año de vida, puede reducir drásticamente el número de espermatogonias A oscura (Hadziselimovic y Herzog, 2001). La disrupción de este paso de diferenciación celular es también asociada con la degeneración de los gonocitos en CIS (Ivell y Hartung, 2003; Brehm y Stegerk, 2005; Foresta *et al.*, 2008). Subsecuentemente, hay una falla en el segundo paso de transformación de espermatogonia Ad a espermatocito primario a los 3 años de edad (Ong *et al.*, 2005) (Figura 11).

Bergh y Söder (2007), señalan otra posible explicación al daño producido en las células de Sertoli, a través de la expresión de una proteína de choque que regula la temperatura (RMP3) y una éster-colesterol hidrolasa sensible a la temperatura. Así como la muerte por apoptosis de espermatocitos y espermátidas, los cuales también expresan proteínas sensibles al calor, tras la activación de p53

y producción de óxido nítrico (Yin *et al.*, 1998; Zini *et al.*, 1999). La falta de T, debido a que Leydig no surge, también contribuye a un aumento en la apoptosis de las células germinales, ya que se le considera como un factor de supervivencia (Billig *et al.*, 1996; Sinha Hikim y Swerdloff, 1999; Sofikitis *et al.*, 2008)

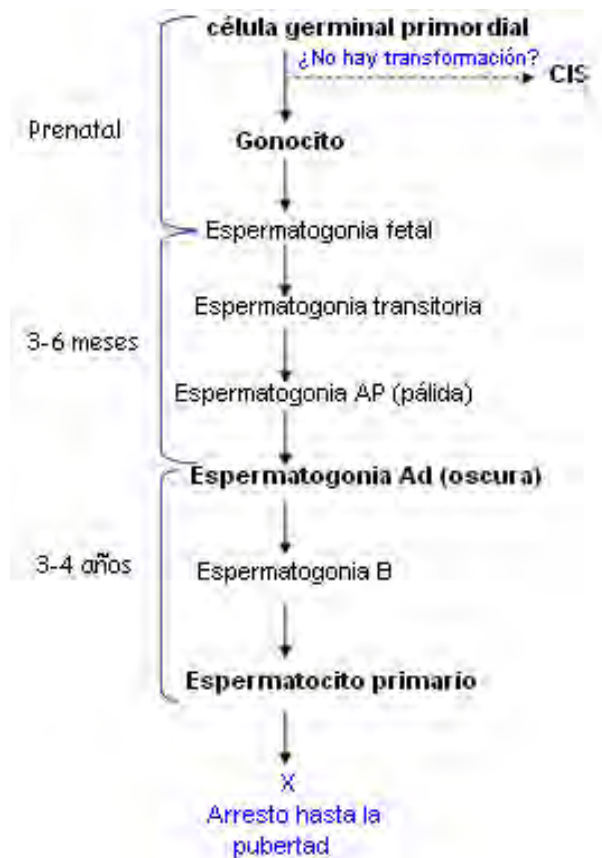


Figura 11. Esquema del desarrollo de las células germinales en donde se muestran los puntos susceptibles de transformación en la criptorquidia. CIS indica carcinoma *in situ*. Tomado de Ong *et al.*, 2005.

### 5.5.2. Estrés oxidativo

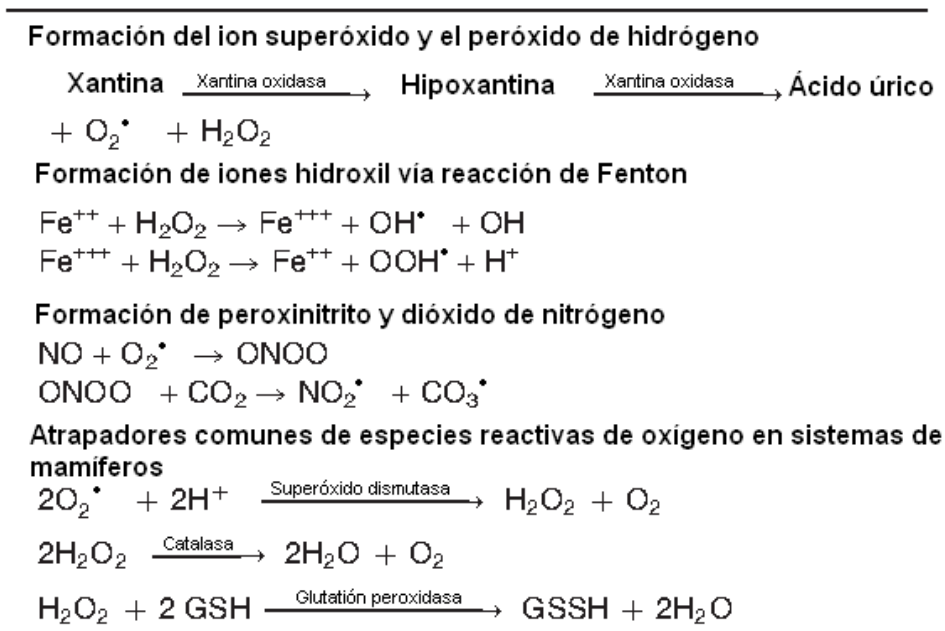
El aumento de temperatura también provoca que el metabolismo celular se incremente, originando estrés oxidativo dentro del testículo (Ahotupa y Huhtaniemi, 1992; Peltola *et al.*, 1995). Este tipo de estrés resulta de un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y su eficiente eliminación al sobrepasar la capacidad del sistema antioxidante, involucrando sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas (Hernández-Alvarado *et al.*, 1995; Frei, 1999; Turner y Lysiak, 2008).

Las ERO son pequeñas moléculas basadas en oxígeno altamente reactivas debido a electrones desapareados (Hicks, 2001). Las más prominentes son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el ion hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este último es la principal ERO y, aunque no es un radical libre, es la molécula que más se ha involucrado en el daño de los espermatozoides (Beckman y Ames, 1998; Baumber *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 2000). La mitocondria, a través de la cadena respiratoria, constituye la principal fuente de generación de las ERO (Vázquez-Memije y El Hafidi, 2006). Sin embargo, también las ERO pueden ser producidas dentro del testículo en condiciones patológicas, como la criptorquidia (Turner y Lysiak, 2008).

El óxido nítrico (ON) puede tener una función en la amplificación del daño testicular, al interaccionar con el  $O_2^{\cdot-}$  y formar el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ), otro potente agente oxidante. El ON también puede reaccionar con  $CO_2$  para formar dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\cdot-}$ ), un radical de menor actividad pero de larga difusión (Szabo *et al.*, 2007; Turner y Lysiak, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que el ON y el  $ONOO^{\cdot-}$  han sido asociados con la apoptosis ya que pueden inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática (Herrero *et al.*, 1996).

La generación de las ERO, así como su conversión a productos no tóxicos por parte del sistema antioxidante se muestran a continuación:

Tabla 2. Reacciones en la producción de especies reactivas de oxígeno y participación de las enzimas antioxidantes. Tomado de Turner y Lysiak, 2008.



En bajas concentraciones, las ERO tienen un efecto biopositivo y actúan selectivamente, sin embargo, en patologías como la criptorquidia en donde se encuentran en altas concentraciones, reaccionan inespecíficamente con efectos biológicos negativos (Ochsendorf, 1999).

Los sustratos moleculares más frecuentes de las ERO incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de las membranas celulares, a los nucleótidos, proteínas y carbohidratos (Machlin y Bendich, 1987; Vilar-Rojas *et al.*, 1996; Beckman y Ames, 1998; Ochsendorf, 1999; Turner y Lysiak, 2008). La interacción del  $\text{OH}^{\bullet}$  con los nucleótidos modifica el ADN espermático induciendo entrecruzamiento de la cromatina, oxidación de nucleótidos y ruptura de las hebras, pudiendo ser asociado a un incremento en el riesgo de defectos al nacimiento, enfermedades genéticas y cáncer en la progenie (Lucesoli y Fraga, 1999; Smith *et al.*, 2007).

Por otra parte, estudios han reportado una correlación entre el incremento de ERO en la criptorquidia con un incremento en la apoptosis de las células

germinales, alteraciones en la expresión de genes asociados con el metabolismo energético y lipídico; reacciones redox y disminución de T (Ikeda *et al.*, 1999; Fujii, 2003; Chaki *et al.*, 2005; Turner y Lysiak, 2008). Se sabe que la esteroidogénesis por sí misma produce ERO, gran parte de la respiración mitocondrial y de las reacciones catalíticas de la enzima citocromo P450. Aunque estas ERO son neutralizadas por los antioxidantes, pueden causar daño a la membrana mitocondrial y contribuir a la inhibición subsecuente de la producción de T en la condición criptorquídica (Turner y Lysiak, 2008).

### 5.5.3. Lipoperoxidación

La reacción de oxidación de AGPI se denomina lipoperoxidación (LP), generada por las ERO que inducen una reacción en cadena (Wang *et al.*, 2001) y es asociada con pérdida de la función e integridad de la membrana (Sanocka y Kurpisz, 2004). Ahotupa y Huhtaniemi (1992) sugieren que la LP también puede ser causada por la inactivación del antioxidante superóxido dismutasa (SOD) como consecuencia del incremento en la temperatura.

El primer paso del proceso de LP (iniciación), consiste en la abstracción de un átomo de hidrógeno al grupo metilo adyacente al doble enlace de un AGPI, formando el radical alquil lípido. El segundo paso (propagación) se debe a la rápida reacción con el oxígeno para formar el radical peroxil. Este radical es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otro AGPI, formando un radical lípido y un hidroperóxido lípido. Puede dañar de manera similar a proteínas y nucleótidos. Los radicales alquil y peroxil son regenerados, el ciclo de propagación puede continuar indefinidamente hasta que uno de los sustratos es consumido o terminado en la reacción radical-radical (Pita, 1997; Chihuail *et al.*, 2002; Sanocka y Kurpisz, 2004) (Figura 12).

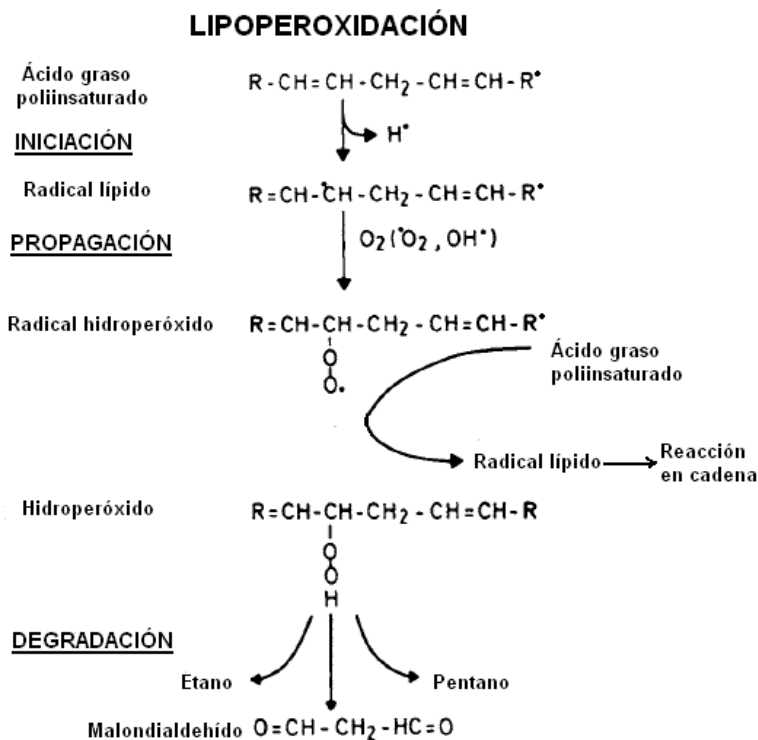


Figura 12. Se muestra la reacción en cadena de la lipoperoxidación, iniciada por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado, dejando atrás un electrón desapareado sobre el átomo de carbono. Éste radical lípido puede reaccionar con oxígeno o especies reactivas de oxígeno para formar un radical hidropéroxido. Este radical puede abstraer átomos de hidrógeno de otras moléculas lipídicas para continuar la reacción en cadena, resultando en una variedad de productos. Tomado y modificado de Bjorneboe *et al.*, 1990.

Todos los componentes lípidos localizados en las membranas espermáticas (aproximadamente 56% son AGPI) están involucrados en la regulación de la maduración espermática, espermatogénesis, capacitación, reacción acrosomal, permeabilidad de membrana, en el potencial de membrana mitocondrial y eventualmente en la fusión de membranas. Obviamente, la LP altera tales funciones y en el caso extremo inhibe la espermatogénesis, lo que puede conducir a la célula a un proceso de muerte programada por apoptosis (Baumber *et al.*, 2000; Batellier *et al.*, 2001, Sanocka y Kurpisz, 2004; Jedlinska-Krakowska *et al.*, 2006; Vázquez-Memije y El Hafidi, 2006). La pérdida en la motilidad espermática y la capacidad de fusión con el ovocito han sido asociadas con la reducción en la permeabilidad de membrana (Sharma y Agarwal, 1996).



## 6. Antioxidantes

Los antioxidantes en general pueden aumentar el sistema de defensa antioxidante endógeno en las células, inhibir vías que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno o funcionar como atrapadores o estabilizadores de radicales libres (Tilly y Tilly, 1995).

### 6.1. Antioxidantes endógenos

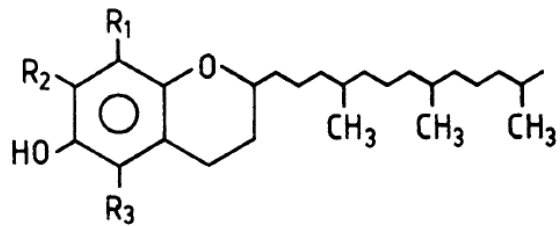
Las principales enzimas antioxidantes son superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx), que más tarde necesitan de otras enzimas como glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa y  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, necesarias para reciclar o eliminar la glutatión. Todas estas enzimas antioxidantes son expresadas en el testículo (Zini y Schlegel, 1997; Fujii *et al.*, 2003; Turner y Lysiak, 2008).

Se ha propuesto que los espermatoцитos y las espermátidas son células vulnerables a las ERO y nitrógeno, ya que la proporción de sus EA son menores a las encontradas en las células de Sertoli y peritubulares (Bauché *et al.*, 1994). Las células germinales cuentan con un eficiente sistema endógeno antioxidante de SOD y reducido sistema para GPx, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa, por lo que son capaces de convertir  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , pero presentan dificultad para metabolizar el  $H_2O_2$ , lo que resulta en la saturación de su sistema protector contra el peróxido y éste convierte a radicales  $OH^{\cdot}$ , que son altamente tóxicos (Bauché *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1999). Por otra parte, las células germinales son más susceptibles a los RL, ya que tienen una cercana proximidad a su generación, las células de Sertoli, así como su alta inclusión de AGPI en sus membranas (Acharya *et al.*, 2007).

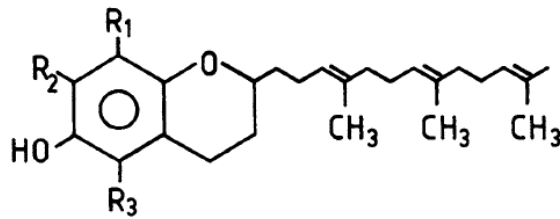
### 6.2. Vitamina E

En 1922, Evans y Bishop demostraron que las ratas alimentadas con una dieta deficiente en ciertas sustancias lipídicas mostraban falla reproductiva al afectarse la espermatogénesis (Bjørneboe *et al.*, 1990). Tales lípidos fueron

denominados como vitamina E (VE). El término incluye cuatro componentes con estructura tocol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\sigma$ -tocoferol) y cuatro componentes con estructura tocotrienol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\sigma$ -tocotrienol) (Figura 13). El término tocoferol es derivado del griego *tokos* y *phero*, que significan nacimiento y traer, respectivamente (Bravo *et al.*, 1976; Bjørneboe *et al.*, 1990; Baracaldo *et al.*, 2004; Mustacich *et al.*, 2007).



**Estructura Tocol**



**Estructura Tocotrienol**

Figura 13. Estructura química del tocol y del tocotrienol. Tomado de Bjørneboe *et al.*, 1990.

El  $\alpha$ -tocoferol es la forma con actividad biológica más potente (100%) y predomina en muchas especies, mostrando a nivel fisiológico, mayor retención en membrana que cualquier otro vitámero (Figura 14) (Baracaldo *et al.*, 2004).

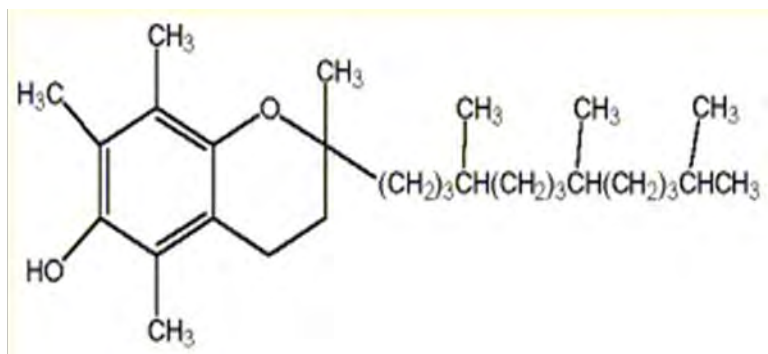


Figura 14. Estructura química de la  $\alpha$ -tocoferol. Tomado de Bjorneboe *et al.*, 1990.

Las fuentes fundamentales de la VE son los aceites de soya, maní, algodón y girasol; los guisantes secos como chícharos, garbanzos y lentejas; el trigo, la avena y el arroz integral; la mantequilla y el huevo (Pita, 1997).

Es el antioxidante exógeno más importante ya que tiene un papel protector de las membranas biológicas, al evitar la LP o la formación de productos tóxicos de oxidación como los peróxidos de AGPI, además de tener también una función como estabilizador del radical peroxil (Bravo *et al.*, 1976; Aybek *et al.*, 2007; Shirpoor *et al.*, 2007). Su estructura consta de dos partes primarias: un anillo complejo y una larga cadena lateral saturada. Cada molécula de VE protege de la oxidación a 1,000 moléculas de ácidos grasos interrumpiendo la reacción en cadena de peroxidación entre los ácidos grasos al ceder un hidrógeno de su grupo hidroxil en la posición 6 del anillo (Figura 15), mientras que la posición 2 de la cadena facilita la incorporación y retención de la VE en las membranas biológicas (Bjørneboe *et al.*, 1990; Pita, 1997; Baracaldo *et al.*, 2004).

El radical VE resultante ( $\alpha$ -tocoferoxil) es estable, ya que el electrón desapareado del átomo de oxígeno en la posición 6 puede ser relocalizado dentro de la estructura del anillo aromático (Burton e Ingold, 1981). El radical VE puede ser regresado a su estado reducido normal por la vitamina C y el GPx (Figuras 16 y 17) (Bjørneboe *et al.*, 1990; Pita, 1997; Baracaldo *et al.*, 2004). Otros destinos

posibles del radical VE son la formación del  $\alpha$ -tocoferil quinona y la reacción con otro radical VE para formar un dímero (Bjørneboe *et al.*, 1990).

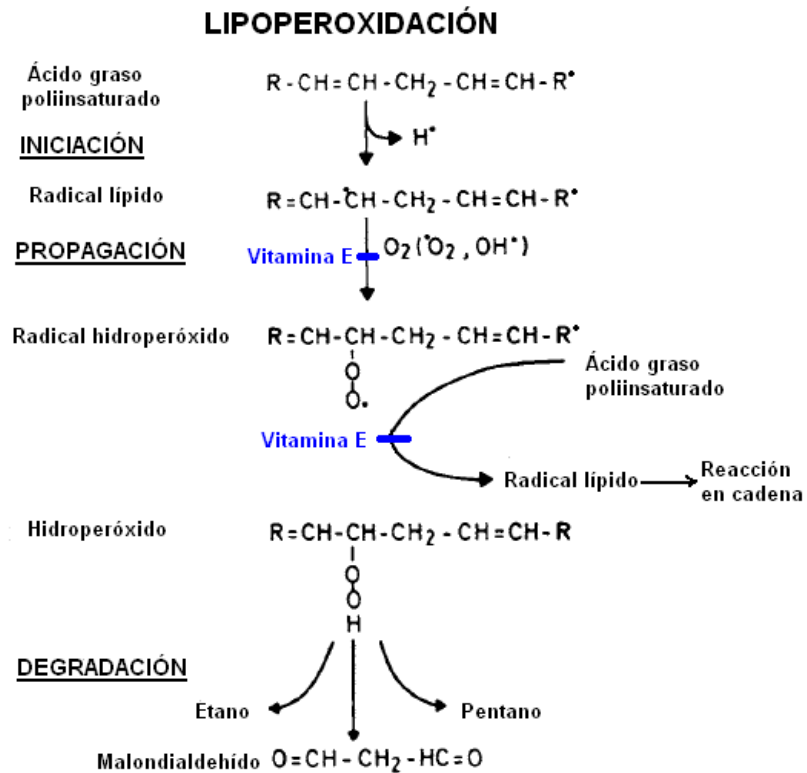


Figura 15. Sitios de acción de la vitamina E en el proceso de lipoperoxidación. La vitamina E interrumpe este proceso en el paso de propagación, evitando la reacción en cadena. Tomado de Bjorneboe *et al.*, 1990.



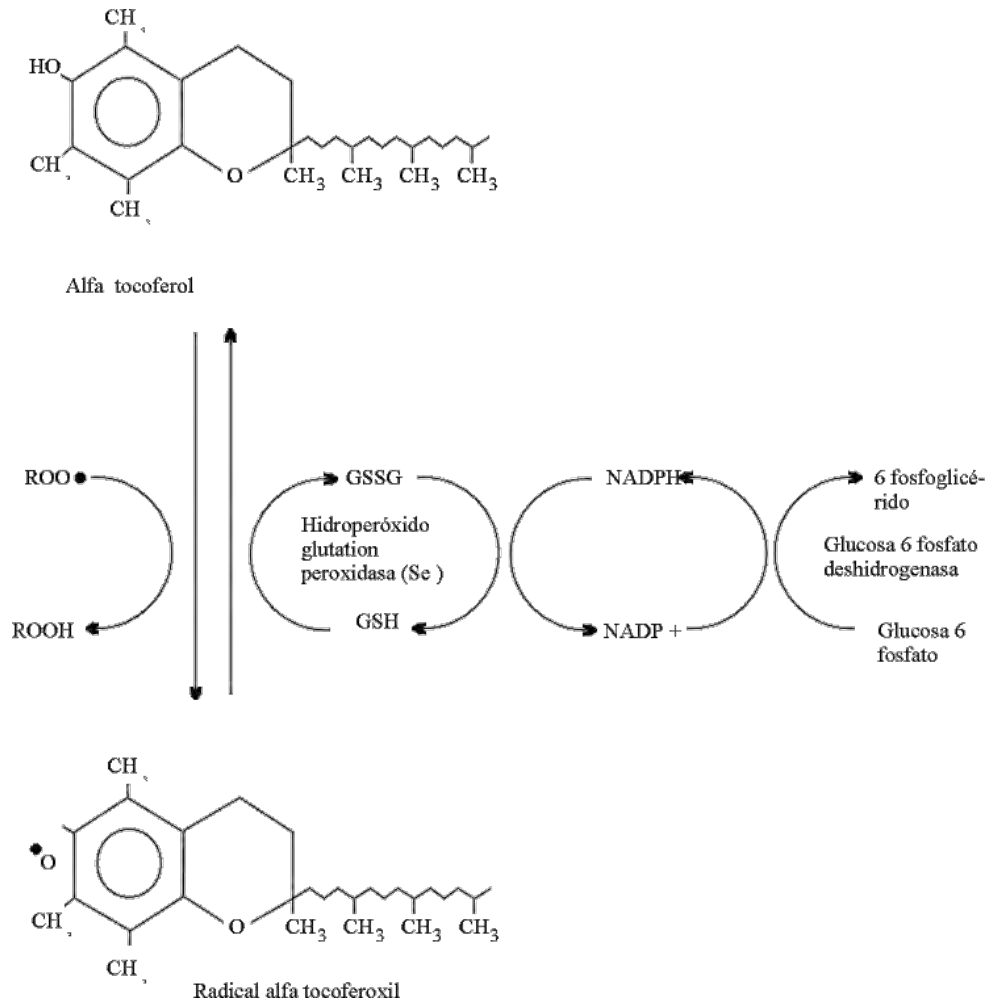


Figura 17. Reducción del radical de la vitamina E por el glutatión peroxidasa. Tomado de Pita, 1997.

### 6.2.1. Metabolismo

La absorción intestinal de la VE es relativamente pobre, se ingiere unida a los lípidos de la dieta y sólo del 20 al 40 % de la dosis es absorbida. Su absorción es dependiente de la función pancreática, secreción biliar, formación de micelas y de su penetración a través de la membrana intestinal por difusión pasiva (Bieri *et al.*, 1983; Bjørneboe *et al.*, 1990; Pita, 1997).

La VE es transportada en la sangre asociada a lipoproteínas (Bjørneboe *et al.*, 1990), por lo que su concentración plasmática depende en gran medida de los niveles de lípidos plasmáticos. Los eritrocitos también parecen ser un transporte importante ya que hay relativamente gran cantidad de la vitamina en sus membranas, la cual se mantiene en equilibrio con la VE plasmática (Pita, 1997). La VE es distribuida entre la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL) en las ratas, mientras que en los humanos es distribuida por la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Bjørneboe *et al.*, 1990).

La VE es acumulada lentamente por los tejidos; en términos de cantidad, el tejido adiposo, el hígado y el músculo estriado contienen mayor VE que el resto (Bjørneboe *et al.*, 1990; Pita, 1997). El testículo contiene menos cantidad de VE por gramo de tejido que la mayoría de los otros órganos, lo cual podría contribuir al principal signo de deficiencia de VE, falla reproductiva (Bjørneboe *et al.*, 1990). Su retención tisular depende de la proteína transportadora (PT) y de su actividad biológica. Se ha identificado una PT de VE en el hígado; se trata de una proteína ubicada en el citosol de las células y que transporta la vitamina hacia el interior de las membranas. En el hígado el 75 % de VE se localiza en las células parenquimatosas, mientras que en el tejido adiposo la VE se encuentra en la masa lipídica del adipocito, donde probablemente se mantiene para proteger de la oxidación a los AGPI almacenados (Traber *et al.*, 1987; Bjørneboe *et al.*, 1990; Pita, 1997; Mustacich *et al.*, 2007).

### 6.2.2. Antecedentes

Muchos estudios han empleado a la VE para contrarrestar o evitar el estrés oxidativo y la LP en diversas patologías obteniendo resultados favorables. Se ha utilizado para disminuir el daño provocado por los RL en la diabetes mellitus, isquemia-reperfusión renal, intoxicación por cadmio, tumores malignos, efectos de la nicotina sobre el hueso, procesos degenerativos en el testículo, modulación de las enzimas antioxidantes en Leydig tras exposición a la carbendazima,

intoxicación crónica por hierro (Lomnitzki *et al.*, 1990; Evangelou *et al.*, 1997; Lucesoli y Fraga, 1998; Oré *et al.*, 2000; Linard *et al.*, 2001; Luís *et al.*, 2001; Rhoden *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 2004; Koyuturk *et al.*, 2006; Aybek *et al.*, 2007; Norazllna *et al.*, 2007; Rajeswary *et al.*, 2007; Shirpoor *et al.*, 2007; Uzunhisarcikli *et al.*, 2007; Acharya *et al.*, 2008; Sena *et al.*, 2008).

Debido a que la criptorquidia es considerada como una alteración urogenital frecuente en los mamíferos, que aumenta el riesgo a desarrollar CIS y seminomas, así como infertilidad en edad adulta debido al daño generado por el estrés oxidativo, aún cuando ha sido realizada la orquidopexia, y con base en las características de la VE como potente antioxidante; el presente estudio se basó en los siguientes objetivos e hipótesis.

#### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la VE en dos dosis diferentes (30 y 100 mg/kg de peso corporal), en ratas neonatas con criptorquidia inguinal unilateral quirúrgica y posterior orquidopexia.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la cantidad de especies reactivas de oxígeno en el testículo de rata al término del tratamiento con VE con la finalidad de evaluar el efecto protector de ésta en la criptorquidia.
- Evaluar la histología testicular, mediante la determinación del área, grado de maduración e histopatología de diferentes túbulos seminíferos al término del tratamiento con VE en el testículo criptorquídico de rata y en el testículo con criptorquidia corregida y VE.
- Evaluar la muerte celular por apoptosis en los diferentes túbulos seminíferos al término del tratamiento con VE en el testículo criptorquídico de rata y en el testículo con criptorquidia corregida y VE.



- Determinar la proliferación celular en los diferentes túbulos seminíferos al término del tratamiento con VE en el testículo criptorquídico de rata y en el testículo con criptorquidia corregida y VE.
- Valorar la fertilidad del testículo con criptorquidia corregida y tratado con VE.

## HIPÓTESIS

Si los daños observados en el testículo criptorquídico son provocados por la producción de radicales libres, la administración de VE en el animal criptorquídico permitirá mantener a las células germinales viables posterior a la orquidopexia en las ratas macho empleadas como modelo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Animales

Se emplearon 42 ratas macho clínicamente sanas con un estado microbiológico de tipo convencional de la cepa Wistar de 10 días de edad producidas en el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría, las cuales fueron destetadas a los 21 días de edad y colocadas en cajas individuales. Se alojaron bajo un ciclo normal de 12 horas luz-12 horas oscuridad, con una humedad y temperatura conocida, 50% y 20° C, agua y alimento para roedores en *pellet* a libre demanda. Todos los tratamientos y procedimientos fueron realizados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999 y según el reglamento interno del Instituto Nacional de Pediatría.

Los animales fueron distribuidos en 7 grupos de 6 ratas cada uno. A 3 grupos se les indujo criptorquidia unilateral a los 10 días de edad por un método quirúrgico (Shono *et al.*, 1996). La administración de VE ( $\alpha$ -tocoferol, SIGMA) o de vehículo, propilenglicol (SIGMA), se realizó diariamente durante 15 días a partir del día 25 de edad por vía intraperitoneal (Rhoden *et al.*, 2001; Acharya *et al.*, 2008; Viguera *et al.*, 2009). A la mitad de los animales de cada grupo se les practicó la eutanasia a los 40 días de edad a través de una sobredosis de pentobarbital (120 mg/kg) (Pfizer), a los cuales se les determinó las ERO, la histología testicular, la proliferación y la apoptosis. Al resto se le realizó la orquidopexia y orquiectomía del testículo contralateral a los 41 días de edad, se evaluó la fertilidad a los 90 días y se les practicó la eutanasia a los 120 días de edad para evaluar el testículo a excepción de las ERO. Los grupos y los procedimientos correspondientes fueron dispuestos de la siguiente forma: (1) animales control sano sin procedimiento quirúrgico ni farmacológico; (2) animales con manipulación quirúrgica y administración de 30 mg/kg de peso corporal de VE; (3) animales con manipulación quirúrgica y administración de 100 mg/kg de peso corporal de VE; (4) animales con manipulación quirúrgica y administración de

propilenglicol; (5) animales con criptorquidia experimental y administración de 30 mg/kg de peso corporal de VE; (6) animales con criptorquidia experimental y administración de 100 mg/kg de peso corporal de VE, y; (7) animales con criptorquidia experimental y administración de propilenglicol (Figura 18).

## 2. Procedimiento para inducir criptorquidia

Se realizó la técnica quirúrgica descrita por Shono *et al.* (1996) para inducir criptorquidia unilateral del testículo izquierdo, la cual consiste en la exposición del gubernáculo a través de una incisión inguinal transversa, fijándolo a la fascia de la ingle con sutura de prolene 6-0. Posteriormente, se suturó en un solo plano la incisión realizada.

En este y todos los procedimientos quirúrgicos se empleó cloruro de benzalconio al 40% como antiséptico, hidrocloreuro de xylacina (10mg/kg) (Bayer) y ketamina (80mg/kg) (CPMax), así como dipirona (5mg/kg) (Tornel) vía intramuscular como manejo de anestesia y analgesia.

## 3. Procedimiento de orquidopexia y orquiectomía

Previa antisepsia de la región abdominal e inguinal, se efectuó una incisión inguinal transversa de aproximadamente 3 cm en piel y tejido subcutáneo. Se identificó el testículo criptorquídico, ubicado en la región inguinal, se disecó y se colocó un punto de sutura con prolene 6-0 en la túnica vaginal del polo inferior fijándolo al tejido intertegumentario, subcutáneo y fascia del escroto del lado correspondiente. Una vez corroborada la permanencia del testículo en la bolsa escrotal, se suturó la incisión realizada en un plano con prolene 6-0.

En el caso de la orquiectomía del testículo contralateral, se realizó una incisión de la piel, tejido subcutáneo y fascia del escroto, permitiendo visualizar la túnica vaginal. Se efectuó la técnica abierta, por lo que se incidió la túnica, ligando el paquete vascular y el cordón espermático. Se suturó la túnica y posteriormente la fascia, tejido subcutáneo y piel en un solo plano con prolene 6-0.

#### 4. Fertilidad

La fertilidad se evaluó colocando a cada macho, de los diferentes grupos experimentales, con 3 hembras fértiles durante dos ciclos estrales. Se evaluó el número de hembras preñadas y el número de críos sanos por macho.

#### 5. Procesamiento del material biológico

A los animales se les practicó la eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg) (Pfizer) previa sedación con hidrocloreuro de xylacina (10mg/kg) (Bayer). Los testículos (el izquierdo, en el caso de los animales con orquidopexia y orquiectomía) se disecaron, pesaron y se lavaron con solución salina (0.9% NaCl) a través de la arteria espermática. Se retiró la túnica vaginal y cada testículo se cortó a lo largo en dos partes. Para la determinación de ERO, se colocó la mitad de cada testículo en hielo, mientras que para el resto de la evaluación testicular, una cuarta parte fue fijada en Karnovsky durante 18 horas y procesada para su inclusión en EPON (Pelco, USA); la parte restante de la muestra, fue fijada en paraformaldehído al 4% (SIGMA, México) durante 18 horas y procesada para su inclusión en parafina.

#### 6. Especies reactivas de oxígeno

La formación de ERO fue estimada de acuerdo a reportes previos (Pérez-Severiano *et al.*, 2004) con pequeñas modificaciones para adaptar el método a la homogenización testicular. Las muestras de tejido testicular fueron homogeneizadas en 1.5 ml de solución salina (0.9% NaCl). Alícuotas con 100  $\mu$ l de cada muestra fueron incubadas con 1850  $\mu$ l de tris-HCl-HEPES (18:1) (SIGMA, México) y con 50  $\mu$ l de 5  $\mu$ M diacetato de diclorofluorosceína (DCF-DA) (Investigación Molecular, OR, USA) a 37° C durante 60 minutos. Se montaron 200  $\mu$ l de cada mezcla en dos pozos y se midieron las señales de fluorescencia a los 15 minutos y al término de la incubación a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de 535 nm en un espectrofluorómetro (Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter, programa Wallac 1420 Manager). Se

construyó una curva estándar utilizando concentraciones crecientes de DCF-DA incubado a la par. Las concentraciones de proteína fueron medidas de acuerdo al método descrito por Lowry *et al.* (1951) y los resultados fueron expresados como pM de DCF/mg de proteína/ml.

#### 7. Análisis histológico: índice histopatológico, de maduración y área epitelial

Se obtuvieron cortes semifinos de EPON de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, teñidos con azul de toluidina al 0.5% (SIGMA, México) y montados en un porta objetos. El análisis histológico se realizó utilizando un microscopio óptico. Por cada animal se observaron de 20 a 30 secciones transversales de tubos seminíferos.

El índice histopatológico (IH) se determinó mediante una escala de cuantificación otorgando un valor según el daño (0 a 6) (Tabla 3), en donde el valor va aumentando conforme la alteración histológica es más severa y, mediante la sumatoria de daño por tubo (Vigueras *et al.*, 2009). La determinación del índice de maduración del epitelio seminífero (IM), se basó en el índice de Johnsen (1970), el cuál determina el grado de maduración de la espermatogénesis (Tabla 4), otorgando una valor, en donde 10 corresponde a una espermatogénesis completa y 1 a la ausencia de células en el túbulo seminífero.

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

#### 8. Apoptosis celular

La muerte celular por apoptosis se determinó mediante la técnica de TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit*). Se realizaron cortes de parafina de 4  $\mu\text{m}$  de grosor, colocándose en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Las laminillas fueron desparafinadas e hidratadas en alcoholes graduales. Para lograr la identificación de las células germinales, las laminillas se lavaron con la solución balanceada de Hanks (GIBCO, NY, USA) y se incubaron con DAPI (SIGMA, México) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ ,

posteriormente se les colocó una solución de bloqueo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% en metanol. Se lavaron con una solución de fosfatos 0.1 M (PBS) (J.T. Baker) e incubaron en una solución permeabilizadora de Triton X-100 al 0.1% (SIGMA-Aldrich, St. Louis Mo, USA). Posteriormente se lavaron con PBS e incubaron en la solución de TUNEL (Roche Diagnostic Corporation, USA). A la par se incubó un control positivo utilizando DNAsa. Se lavaron con PBS y se montaron con medio de fluorescencia (DAKO, USA, *Fluorescent Mounting Medium*). El índice de apoptosis (IA) se determinó en cortes transversales considerando el número de células positivas con relación a la población total de las células por tubo seminífero. Se contaron al menos 20 tubos seminíferos por animal.

#### 9. Proliferación celular

Se realizaron cortes de 4 µm de grosor de testículo en parafina, que fueron colocados en laminillas con poly-L-lisina (SIGMA, México). Las laminillas se desparafinaron e hidrataron. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en metanol durante 30 minutos, al término, se realizaron lavados en agua destilada. Las laminillas se incubaron en solución de Triton X-100 al 0.1% durante 10 minutos, se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1% (Amershan Biosciences, Buckingham, UK) en PBS durante 2 horas y se incubaron 18 horas con el anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-histona-H3 sulfatado (Upstate, USA) (1:1000). Posteriormente se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo anti-conejo IgG conjugado con HRP (Santa Cruz, Biotechnology, USA) durante 2 horas. Las laminillas fueron lavadas en PBS y reveladas con diaminobencidina (DAKO, USA) durante 6 minutos haciendo evidente los sitios de unión del anticuerpo. Por último, fueron contrastadas con H-E, deshidratadas, aclaradas y montadas. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Se determinó el índice de proliferación celular (IP) de acuerdo al número de células positivas al anticuerpo anti-histona-H3 con relación al número total de

células en tubos seminíferos cortados transversalmente. Se contaron al menos 20 tubos por animal.

#### 10. Análisis estadístico

Todas las variables con distribución normal fueron analizadas mediante la prueba de ANOVA (SPSS 15.0, 2006 para Windows®) seguida por la prueba de Tukey. Las variables con una distribución diferente a la normal fueron analizadas a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (JMP V7.0 SAS *Institute*) considerando una  $p < 0.05$  como diferencia significativa. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar.

## RESULTADOS

### 1. Resultados de 40 días de edad

#### 1.1. Peso testicular en relación al peso corporal

A los 40 días de edad sólo se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo con criptorquidia y tratamiento de VE a una dosis de 30 mg/kg, en donde el peso del testículo disminuyó a 0.28% al compararlo con el grupo control sano (Tabla 5) (Figura 19).

#### 1.2. Especies reactivas de oxígeno

En el testículo sano se encontró  $3.00 \pm 0.19$  pM de DCF/mg de proteína/ml de ERO, el valor encontrado en el testículo criptorquídico fue mayor pero sin ser significativo y disminuyó con la administración de VE a una dosis de 30 mg/kg. Sin embargo, se encontró un aumento significativamente de 55% en el testículo criptorquídico de los animales tratados con 100 mg/kg de VE con respecto al control sano. Los resultados encontrados en los demás grupos se encuentran en la tabla 6 y figura 20.

#### 1.3. Análisis histológico: índice histopatológico, de maduración y área epitelial

La tabla 7 muestra los resultados encontrados en el análisis histológico en donde se observa que el testículo criptorquídico mostró un inadecuado IH, IM y AES en comparación con el testículo sano ( $p < 0.05$ ). Entre las alteraciones histológicas observadas en los testículos criptorquídicos se encuentran principalmente el plegamiento de la lámina basal, vacuolas, picnosis y la presencia de sincicios. Al administrar VE a una dosis de 100 mg/kg, tanto el IM como el IH se vieron favorecidos ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo criptorquidia pero sin alcanzar los valores encontrados en el testículo sano. En cuanto a los grupos de manipulación, los resultados fueron los esperados y se observó que la VE por sí misma no tienen un efecto negativo sobre la maduración de las células germinales, el AES y las alteraciones a nivel histológico, excepto cuando se



administró a una dosis de 100 mg/kg, observándose una disminución en el IM, pero un favorecido aumento en el AES ( $p < 0.05$ ) (Figuras 21, 22, 23 y 27).

#### 1.4. Apoptosis

La evaluación de la muerte por apoptosis de las células germinales a los 40 días de edad mostró un aumento estadísticamente significativo en el testículo criptorquídico en comparación con el testículo sano. Sin embargo, al administrar VE a una dosis de 30 mg/kg el índice de apoptosis disminuyó ( $p < 0.05$ ) sin alcanzar el valor del testículo sano (Tabla 8) (Figuras 24 y 29).

#### 1.5. Proliferación

En el IP no se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos (Tabla 8) (Figuras 25 y 31).

### 2. Resultados de 120 días de edad

#### 2.1. Peso testicular en relación al peso corporal

A largo plazo, el peso del testículo en proporción al peso corporal fue estadísticamente similar entre los grupos en comparación con el control sano, a excepción del grupo con criptorquidia y orquidopexia, en donde disminuyó. No obstante, el peso del testículo se vio favorecido al administrarse una dosis de 100 mg/kg de VE, al aumentar a 0.36% con una  $p < 0.05$  (Tabla 5) (Figura 19).

#### 2.2. Fertilidad

Se observó que el grupo control sano tuvo una adecuada fertilidad, sin embargo, en el grupo con criptorquidia corregida ésta fue menor, observándose una mejoría al dar un tratamiento con VE una dosis de 100 mg/kg.

Además de lo anterior, se determinó el número de crías nacidas vivas y sanas en cada grupo experimental, por lo que para el grupo control sano fue de  $12.33 \pm 0.71$  crías, disminuyendo en el grupo con criptorquidia corregida sin tratamiento y aumentando en los grupos con criptorquidia corregida y

administración de VE. Se observó que al administrar 30 mg/kg de vitamina E la media en el número de crías aumentó en un 814.28%, mientras que al administrar este antioxidante a una dosis de 100 mg/kg la fertilidad medida por el número de crías aumentó en un 951.78% con respecto al grupo con criptorquidia sin tratamiento ( $p<0.05$ ) (Tabla 9) (Figura 26).

### 3. Análisis histológico: índice histopatológico, de maduración y área epitelial

A largo plazo, el grupo control sano mostró una espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides. Al análisis del testículo con criptorquidia y orquidopexia se observó que el IM y el AES fueron menores ( $p<0.05$ ) al compararse con el sano, mientras que el IH aumentó, observándose la presencia de las mismas alteraciones histológicas que a los 40 días de edad.

Al administrarse VE en ambas dosis el IM fue de 10 y el AES aumentó ( $p<0.05$ ), mientras que el IH tuvo una disminución significativa. Sin embargo, no se alcanzaron los valores obtenidos en el grupo control sano (Tabla 7) (Figuras 21, 22, 23 y 28).

En el grupo con criptorquidia corregida y sin tratamiento con VE se observaron túbulos seminíferos con daño permanente (Figura 28)

### 4. Apoptosis

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en el IA en donde se observó un valor significativamente mayor en el testículo con criptorquidia corregida en comparación con el testículo sano ( $p<0.05$ ), así como el efecto protector de la VE en ambas dosis disminuyendo significativamente el IA en el testículo con criptorquidia corregida alcanzando los niveles del testículo sano (Figuras 24 y 30).

### 5. Proliferación

En el IP no hubo diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los grupos. Aún así, se observó una tendencia a la disminución en la cantidad de células en

proliferación en el testículo con criptorquidia corregida en comparación con el testículo sano y una tendencia al aumento en los testículos con criptorquidia corregida y tratamiento con VE en ambas dosis (Tabla 8) (Figuras 25 y 32).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Existe evidencia suficiente en el humano y modelos animales, como la rata, que indica los efectos adversos del incremento de la temperatura sobre la espermatogénesis (Thonneau *et al.*, 1996; Bujan *et al.*, 2000; Schoor *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2005; Ivell, 2007; Hughes y Acerini, 2008). Esto involucra al estrés oxidativo, la lipoperoxidación y la apoptosis de las células germinales como causantes de los problemas de fertilidad en la edad adulta, como ocurre en la criptorquidia (Shikone *et al.*, 1994; Peltola *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 2002; DeFoor *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007); lo cual fue confirmado por este estudio.

Se han realizado intentos para disminuir el daño producido por los radicales libres en la criptorquidia (Kumagai *et al.*, 2002; DeFoor *et al.*, 2004; Viguera *et al.*, 2009). Sin embargo, ninguno ha empleado a la VE, un potente antioxidante, como tratamiento en la criptorquidia. Debido a esto, en este estudio se analizó el efecto antioxidante de la VE como tratamiento de la criptorquidia previo a la orquidopexia. Los datos obtenidos en este trabajo indican que la VE disminuye los daños en el testículo criptorquídico provocados por la producción de radicales libres, ya que la VE logró disminuir la muerte por apoptosis y los daños histológicos en las células germinales, así como aumentó el grado de maduración del epitelio seminífero y el área epitelial posterior a la orquidopexia. Esto posiblemente se debió a que la VE disminuye el proceso de lipoperoxidación (cede un hidrógeno del grupo hidroxilo en la posición 6 de su anillo), así como a su habilidad para estabilizar a los radicales producidos durante este proceso disminuyendo así las ERO y el daño histológico, conservando la espermatogénesis como se ha reportado en estudios previos, en donde se ha observado que la VE disminuye el proceso de oxidación dentro del testículo cuando éste es dañado por algunos metales y sustancias tóxicas (ver figura 15) (Lomnitski *et al.*, 1991; Lucesoli y Fraga, 1999; Oré *et al.*, 2000; Luís *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 2004; Jedlinska-Krakowska *et al.*, 2006;

Koyuturk *et al.*, 2006; Shirpoor *et al.*, 2007; Acharya *et al.*, 2008; Sena *et al.*, 2008).

En este trabajo, aunque el grupo con criptorquidia no presentó diferencia significativa con el grupo control sano en la producción de ERO, sí se observó una tendencia a la alza con un incremento de 27.66%. En el grupo con criptorquidia y VE a una dosis de 30 mg/kg se presentó una reducción en la cuantificación de ERO, ello aún no habiéndose realizado la orquidopexia, mostrando el efecto antioxidante de la VE como lo indica Pita (1997). Esta idea es reforzada por los datos mostrados en los grupos de manipulación con administración de VE indicando una disminución significativa en la cantidad de ERO en comparación con los testículos sanos. Sin embargo, al administrar una dosis de 100 mg/kg de VE las ERO se elevaron significativamente al compararse con el testículo sano. Tal vez esta situación pudo deberse a una saturación del sistema de regeneración de ésta; la VE al ceder un hidrógeno se oxida dando origen a un nuevo radical libre estable (Burton e Ingold, 1981), sin embargo, la reducción o regeneración de la VE es realizada por el ácido ascórbico y el glutatión peroxidasa (Pita, 1997). Ésta última enzima antioxidante se ve disminuida en la criptorquidia (Bauché *et al.*, 1994), por lo que posiblemente con el empleo de esta dosis de VE hubo una acumulación del radical VE al haber menos enzimas que lo reducen, presentándose el aumento en la cantidad de radicales libres (Setiadi *et al.*, 2003).

El hecho de que la VE protegió a las células germinales del estrés oxidativo, como lo reportan Aybek *et al.*, (2007), se manifiesta por las observaciones a los 40 días de edad donde se presentó disminución en el IA así como en el IH, ello aún en los testículos sometidos a estrés calórico y por lo tanto a estrés oxidativo. Los demás parámetros evaluados no difirieron de los encontrados en el testículo sin tratamiento con VE, esto se debió a que el testículo aún se encontraba criptorquídico. Sin embargo, la protección por parte de la VE se hizo evidente a los 120 días de edad en la morfología testicular y la apoptosis ( $p < 0.05$ ).

La disminución en la muerte celular por apoptosis por la administración de VE, se debió posiblemente a que bajo la producción de ON, el cual ha sido

amplificado en el daño testicular al interactuar con el  $O_2^{\cdot-}$  y formar el  $ONOO^-$ , activa la muerte programada como lo mencionan en su estudio Ikeda *et al.*, (1999) y Zini *et al.*, (1999), quienes localizaron óxido nítrico sintasa tipo endotelial en las células degeneradas por la criptorquidia. Se ha señalado que probablemente el ON active la vía intrínseca de la apoptosis a través de la familia Bcl-2 o el gen p53 al liberar el citocromo c tras un daño en el ADN o la membrana mitocondrial (Brüne *et al.*, 1998; Chae *et al.*, 2004; Oktem *et al.*, 2009).

Posiblemente, la combinación de VE y la orquidopexia permitió que en los testículos de estos animales se observaran espermatozoides, debido a que las espermatogonias Ad fueron protegidas del estrés oxidativo y de la LPO, por lo que continuaron su desarrollo. Por otra parte, los espermatoцитos, los cuales son vulnerables a la apoptosis en la criptorquidia (Vigueras *et al.*, 2009) también pudieron continuar la meiosis y la espermatogénesis.

Aunque el IP no mostró diferencias significativas en las comparaciones realizadas entre los grupos de este estudio, en el grupo con testículo criptorquídico y aún cuando se realizó la orquidopexia, hubo una tendencia a que disminuyera el número de células en proliferación. Datos similares fueron reportados en un estudio previo, en donde se observó una disminución en la proliferación de células germinales en humanos con criptorquidia (Ofordeme *et al.*, 2005). Existe literatura que reporta que la VE posee un efecto inhibitorio sobre la proliferación de ciertas líneas celulares como fibroblastos, células musculares lisas, el epitelio pigmentario de la retina, células neuroepiteliales retinianas, entre otras (Chatelain *et al.*, 1993; Mojon *et al.*, 1994; Haas *et al.*, 1996), esto a través de un efecto antiproliferativo mediado por un mecanismo no antioxidante (Boscoboinik *et al.*, 1991; Azzi *et al.*, 1993). Sin embargo, poco se conoce al respecto. En este estudio, contrariamente, la administración de VE aumentó la proliferación de las células germinales, aunque los datos no fueron significativos, esto fue confirmado por el aumento en el AES.

Histológicamente se ha mostrado que los testículos criptorquídicos presentan una falla en la maduración de los gonocitos y que pocas células germinales permanecen después del primer año de vida en humanos, disminuyendo todavía más el nivel de éstas después de los dos años (Hedinger, 1982; Huff *et al.*, 1989). Con respecto a esto, Steinberger y Dixon (1959) encontraron que el epitelio seminífero expuesto a 45° C presenta pérdida de células germinales, que las células espermátidas coalescen formando células gigantes multinucleadas (sincicio), que mientras llevan a cabo la primera división hay destrucción de la cromatina en los espermátocitos primarios y que hay presencia de células con picnosis, especialmente los espermátocitos primarios recién formados. Además, observaron desorganización celular en los túbulos seminíferos. Los resultados de este estudio apoyan lo anterior, ya que en el análisis morfológico del testículo criptorquídico se encontró picnosis y sincicios, además de plegamiento de la lámina basal, vacuolas, descamación y desorden celular. Además, en otro estudio realizado por Brehm y Stergerk (2005), se mencionó una patología común en la criptorquidia, la aplasia de células germinales, en donde sólo se observaba la presencia de células de Sertoli en los túbulos seminíferos. Esto fue confirmado por este estudio, ya que algunos túbulos del testículo criptorquídico aún con orquidopexia y sin tratamiento con VE presentaban tal alteración. Tal parece que los túbulos seminíferos responden de diferente forma ya que en un mismo testículo se logró observar tubos con diferentes grados de daño.

Estas alteraciones posiblemente puedan deberse a falta de estimulación hormonal lo que resultaría también en la falla de la transformación de los gonocitos en espermatogonias con la subsecuente degeneración de las células germinales vía apoptosis (Hadziselimovic *et al.*, 1987; Bolton *et al.*, 1989; Raivio *et al.*, 2003), o como anteriormente se mencionó, también debido al estrés calórico y oxidativo (Steinberger y Dixon, 1959; Ofordeme *et al.*, 2005).

En este trabajo al administrar VE a las dosis de 30 y 100 mg/kg, como tratamiento pre-quirúrgico, los animales presentaron una espermatogénesis

completa en el testículo que fue criptorquídico, una disminución en las alteraciones morfológicas y un aumento en el AES, sin alcanzar en éstos dos últimos parámetros los resultados arrojados por los testículos sanos. Posiblemente, esto se debe a que los espermatoцитos y espermátidas son las células germinales más vulnerables al daño por los radicales libres ya que aunque son capaces de convertir  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , presentan dificultad para metabolizar el  $H_2O_2$ , por lo que se satura su sistema protector contra el peróxido y éste se convierte a radicales  $OH^{\cdot}$ , que son altamente tóxicos (Bauché *et al*, 1994). Por otra parte, se sugiere una continuación del tratamiento con VE después de la orquidopexia, lo cual podría disminuir aún más los daños en el testículo y probablemente así, alcanzar los valores de uno sano.

En este estudio la tendencia a disminuir las ERO por parte de la VE, provocó una disminución del IH y del IA, lo que aumentó el número de células germinales viables, lo que a su vez se vio reflejado en el aumento del AES y el IM, esto permite proponerla como una posible solución a la principal consecuencia de la criptorquidia, además de ofrecer un nuevo manejo de esta patología y no solo utilizar a la orquidopexia como tratamiento único.

Posiblemente, la evaluación de la fertilidad en este estudio se vio afectada por la movilización obligada de los animales a un bioterio provisional, ya que el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría fue remodelado durante esta parte del estudio. Por tal motivo, el número de hembras gestantes así como el número de crías se encontraron severamente disminuidos en varios grupos experimentales. A pesar de esto, la fertilidad del testículo criptorquídico es afectada en un futuro, aún con el procedimiento de orquidopexia, ya que el número de crías procreadas descendió significativamente en comparación con un testículo sano.

Así, aunque el número de crías en el grupo con criptorquidia corregida y tratamiento con VE no mejoró significativamente al compararse con el grupo sin tratamiento, el incremento en la progenie cuando se administró una dosis de 30 mg/kg fue de 814.28 % y de 951.78 % para una dosis de 100 mg/kg con respecto al grupo no tratado. Además, cabe mencionar que el número de hembras



preñadas por animales con criptorquidia corregida y tratamiento con VE a una dosis de 100 mg/kg fue de 5 en comparación con los animales que no recibieron tratamiento, que fue de 2 hembras.

Por último, se confirmó que la orquidopexia por sí misma no es suficiente para restaurar la espermatogénesis como lo mencionó Hadziselimovic (2008) y conseguir una fertilidad exitosa en la edad adulta del individuo.

#### Conclusiones:

- Este estudio ofrece información que puede ser utilizada para emplear nuevos tratamientos con antioxidantes, especialmente la VE, en conjunto con el tratamiento quirúrgico para disminuir los daños causados por la criptorquidia.
- La orquidopexia, por sí misma, no restablece la fertilidad.
- La administración de VE como tratamiento previo a la orquidopexia, especialmente a una dosis de 30 mg/kg, protege al testículo criptorquídic del daño provocado por los radicales libres, reduciendo las alteraciones histológicas y la apoptosis.
- El tratamiento con VE, previo a la orquidopexia, permite que se complete la espermatogénesis en los diferentes túbulos seminíferos y favorece la fertilidad.

## REFERENCIAS

Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reproductive Toxicology* 2007;25:84-88.

Adham IM, Agoulnik AI. Insulin-like 3 signalling in testicular descent. *Internacional Journal of Andrology* 2004;27:257-265.

Ahotupa M, Huhtaniemi I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biology of Reproduction* 1992;46:1114-1118.

Amann RP. Function of the epididymis in bulls and rams. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1987;34:115.

Amann RP, Veeramachaneni D. Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction* 2007;13:541-561.

Amory JK, Bremner W. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001;182:175-179.

Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998;83:675-681.

Austin CR, Short RV. *Reproduction in mammals. Germ cells and fertilization*. 2a ed. Great Britain: Cambridge University Press, 1982, p.p. 13, 77, 83, 88.

Aybek H, Aybek Z, Rota S, Şen N, Akbulut M. The effects of diabetes mellitus, age, and vitamin E on testicular oxidative stress. *Fertility and Sterility* 2007;3:755-760.

Azzi A, Boscoboinik D, Chatelaip E, Ozer NK, Stauble B. D-alpha tocopherol control of cell proliferation. *Molecular Aspects of Medicine* 1993;14:265-271.

Baker HJ. *The laboratory rat. Volume I. Biology and diseases.* San Diego: Academic Press, 1979, p.p. 91.

Baracaldo BC, Poveda E, Ordóñez E, Rodríguez M, Ayala P, Delgado W, Guerra M. Concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en ratas, como respuesta a la suplementación con aceites vegetales de diferentes fuentes. *Lecturas sobre Nutrición* 2004;11:36-43.

Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction* 2001;68:181-190.

Bauché F, Fouchard MH, Jégou B. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Letters* 1994;349:392-396.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology* 2000;21:895-902.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiology Reviews* 1998;78:547-581.

Bergh A, Söder O. Studies of cryptorchidism in experimental animal models. *Acta Paediatrica* 2007;96:617-621.

Bernal-Mañas CM, Morales E, Pastor LM, Pinart E, Bonet S, De la Rosa P, Briz MD, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochemica* 2005;107:365-372.

Bieri JB, Corash L, van S Hubbard. Medical use of vitamin E. The New England Journal of Medicine 1983;18:1063-1071.

Bilińska B, Wiszniewska B, Kosiniak-Kamysz K, Kotula-Balak M, Gancarczyk M, Hejmej A, Sadowska J, Marchlewicz M, Kolasa A, Wenda-Różewicka. Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. *In vivo* and *in vitro* approaches. Reproductive Biology 2006;6:43-58.

Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJW. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. Human Reproduction Update 1996; 2:103-117.

Bjørneboe A, Bjørneboe GE, Drevon CA. Absorption, transport and distribution of vitamin E. The Journal of Nutrition 1990;120:233-242.

Boisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen HE, Haavisto AM, Schmidt IM, Chellakooty M, Damgaard IN, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek NE, Toppari J. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. Lancet 2004;363:1264-1269.

Bolton NJ, Tapanainen J, Koivisto M, Vihko R. Circulating sex hormone-binding globulin and testosterone in newborns and infants. Clinical Endocrinology 1989;31:201-207.

Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha tocopherol. Role of protein kinase C. The Journal of Biological Chemistry 1991;266:304-309.

Bravo M, Puratic O, Stephan R. Vitamina E. Revista Chilena Pediatría 1976;47: 402-408.

Brehm R and Stegerk BR. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology 2005;181:1-93.

Brüne B, Von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 1998;351:261-272.

Bujan L, Daudin M, Charlet JP, Thonneau P, Mieusset R. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Human Reproduction* 2000;15:1355-1357.

Burton GW, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society* 1981;103:6472-6477.

Chae IH, Park KW, Kim HS, Oh BH. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clinica Chimica Acta* 2004;341:83-91.

Chaki SP, Misro MM, Ghosh D, Gautam DK, Srinivas M. Apoptosis and cell removal in the cryptorchid rat testis. *Apoptosis* 2005;10:395-405.

Chiasson RB. *Laboratory anatomy of the white rat*. 5th ed. USA: WCB/McGraw-Hill, 1994, p.p. 85-88.

Chatelain E, Boscoboinik DO, Bartoli G, Kagan VE, Gey FK, Packer L. Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993;1176:83-89.

Chihuail RH, Contreras P, Wittwer F. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Revista Veterinaria México* 2002;33:265-283.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 1972;52:198-204.

Cooper BJ, Little TM. Orchidopexy theory and practice. *British Medical Journal* 1985;291:706-707.

Costa WS, Sampaio F, Favorito L, Cardoso L. Testicular migration: remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis. *The Journal of Urology* 2002;167:2171-2176.

Cox JE, Edwards GB, Neal PA. An analysis of 500 cases of equine cryptorchidism. *Equine Veterinary Journal* 1979;11:113-116.

DeFoor WR, Kuan CY, Pinkerton M, Sheldon CA, Lewis AG. Modulation of germ cell apoptosis with a nitric oxide synthase inhibitor in a murine model of congenital cryptorchidism. *Journal of Urology* 2004;172:1731-1735.

De Jonge C, Barratt C. The sperm cell. Production, maturation, fertilization, regeneration. USA: Cambridge University Press, 2006, p.p. 9, 15, 17.

Dieckmann KP, Skakkebaek NE. Carcinoma *in situ* of the testis: a review of biological and clinical features. *International Journal of Cancer* 1999;83:815-822.

Domínguez CR. Tópicos selectos de biología de la reproducción. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1991, p.p. 206, 240, 241.

Dyce KM. Anatomía veterinaria. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1991, p.p. 458-463.

Elder JS. The undescended testis: hormonal and surgical management. *The Surgical Clinics of North America* 1988;68:983-1005.

Evangelou A, Kalpouzos G, Karkabounas S, Liasko R, Nonni A, Stefanou D, Kallistratos G. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants-anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Letters* 1997;115:105-111.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Diplomado a distancia en medicina, cirugía y zootecnia en perros y gatos. Urología y Ginecología. México (DF): UNAM, 2003, p.p. 233-236.

Fallat ME, Williams MPE, Farmer PJ. Histological evaluation of inguinoscrotal migration of the gubernaculum in rodents during testicular descent and its relationship to the genitofemoral nerve. *Pediatric Surgery International* 1992;7:417-423.

Farris EJ. *The rat in laboratory investigation*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Hafner Press, 1949, p.p. 33.

Ferlin A, Zuccarello D, Zuccarello B, Chirico M, Zanon G, Foresta C. Genetic alterations associated with cryptorchidism. *JAMA* 2008;19:2271-2276.

Foldesey RG, Bedford JM. Biology of the scrotum: temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat cauda epididymis. *Biology of Reproduction* 1982;26:673.

Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocrine Reviews* 2008;29:560-580.

Fox JG. *Laboratory animal medicine*. American College of Laboratory. Animal Medicine Series. 2<sup>nd</sup> ed. USA: Academic Press, Elsevier Science, 2002, p.p. 126.

Frei B. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *The FASEB Journal* 1999;13: 963-964.

Friedman RM, López FJ, Tucker JA, King LR, Negro-Vilar A. Fertility after cryptorchidism: a comparative analysis of early orchidopexy with and without concomitant hormonal therapy in the young male rat. *The Journal of Urology* 1994;151:227-233.

Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal of Andrology* 2003;5:231-242.

Galina C, Valencia J. Reproducción de animales domésticos. 3ª ed. México: Limusa, 2008, p.p. 50-53, 71, 72, 75.

Gapany C, Frey P, Cachat F, Gudinchet F, Jichlinski P, Meyrat B-J, Ramseyer P, Theintz G, Burnand B. Management of cryptorchidism in children: guidelines. *Swiss Medical Weekly* 2008;138:492-498.

Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Human Reproduction Update* 2001;7:248-264.

Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction* 1995;52:211-216.

Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell and Developmental Biology* 1998;9:411-416.

Haas AL, Boscoboinik DO, Mojon DS, Bohnke M, Azzi A. Vitamin E inhibits proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in vitro. *Ophthalmic Research* 1996;28:171-175.

Hadziselimovic F, Herzog B, Buser M. Development of cryptorchid testes. *European Journal of Pediatrics* 1987;146:S8-S12.

Hadziselimovic F, Herzog B. Importance of early postnatal germ cell maturation for fertility of cryptorchid males. *Hormone Research* 2001;55:6-10.

Hadziselimovic F. Successful treatment of unilateral cryptorchid boys risking infertility with LH-RH analogue. *International Brazilian Journal of Urology* 2008;34:319-328.



Hafez ESE. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. USA: Lea & Febiger, 1970, p.p. 58, 69.

Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: Mc Graw-Hill, 2000, p.p. 3, 5-7, 10, 33, 38, 48-51, 101-104, 107.

Harnaen E, Na A, Shenker N, Sourial M, Farmer P, Southwell B, Hutson JM. The anatomy of the cremaster muscle during inguinoescrotal testicular descent in the rat. *Journal of Pediatric Surgery* 2007;42:1982-1987.

Heckert L, Griswold M. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research* 2002; 57:129-148.

Hernández-Alvarado S, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Especies reactivas de oxígeno en el espermatozoide. *Revista de Ginecología y Obstetricia México* 1995;63:50-54.

Herrero MB, Pérez MS, Viggiano JM, Polak JM, De Gimeno MF. Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development* 1996;8:931-934.

Heyns CF, Hutson JM. Historical review of theories of testicular descent. *Journal of Urology* 1995;163:74-76.

Heyns CF, Humann HJ, Werely CJ, De Klerk DP. The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus. *Journal of Urology* 1990;143:612-617.

Hicks JJ. *Bioquímica*. México: McGraw-Hill, 2001.

Holdcraft R, Braun R. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology* 2004;27:335-342.

Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder III HM, Duckett JW, Keating MA. Postnatal testicular maldevelopment in unilateral cryptorchidism. *Journal of Urology* 1989;142:546-548.

Hughes IA, Acerini CL. Factors controlling testis descent. *European Journal of Endocrinology* 2008;159:S75-S82.

Huleihel M, Abuelhija M, Lunenfeld E. *In vitro* culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. *Growth Factors* 2007;25:236-252.

Hutson JM. A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet* 1985;11:419-421.

Hutson JM, Beasley SW. The mechanism of testicular descent. *Australian Pediatric Journal* 1987;232-215.

Hutson JM, Sasaki Y, Huynh J, Yong E, Ting A. The gubernaculum in testicular descent and cryptorchidism. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2004;46:3-6.

Hutson JM, Hasthorpe S. Testicular descent and cryptorchidism: the state of the art in 2004. *Journal of Pediatric Surgery* 2005;40:297-302.

Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of Reproduction* 1999;61:393-399.

Ivell R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007;5:15-22.

Ivell R, Hartung S. The molecular basis of cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction* 2003;9:175-181.

Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski A. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *Journal of Reproduction and Development* 2006;52:203-209.

Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *International Review Cytology* 1993;147:25-96.

Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1:2-25.

Jung A, Leonhardt E, Schill WB, Schuppe HC. Influence of the type of undertrousers and physical activity on scrotal temperature. *Human Reproduction* 2005;20:1022-1027.

Knobil E, Neil JD. *The physiology of reproduction*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Raven Press, 1994, p.p. 1369, 1370.

König HE, Liebich HG. *Anatomía de los animales domésticos. Texto y atlas en color*. 2<sup>a</sup> ed. España: Editorial Médica Panamericana, 2005, p.p. 119-133.

Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunali S. Influence of combined antioxidants cadmium induced testicular damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006;21:235-240.

Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt AM, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human Reproduction. European Society for Human Reproduction and Embriology* 1998;13:1-8.

Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J, Kawamura K, Tanikawa H, Sato N, Tanaka T. Xanthine Oxidase Inhibitors Suppress Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Experimental Cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction* 2002;8:118-123.

Lee PA, Coughlin MT. Fertility after bilateral cryptorchidism. Evaluation by paternity, hormone, and semen data. *Hormone Research* 2001;55:28-32.

Lee SM, Hutson JM. Effect of androgens on the cranial suspensory ligament and ovarian position. *The Anatomical Record* 1999;255:306-315.

L'Hernault, SW. Spermatogenesis (February 20, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans*. Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.85.1, <http://www.wormbook.org>.

Linard A, Macaire JP, Christon R. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity and vitamin E level in the liver microsomal membrane: effects of age and dietary  $\alpha$ -linolenic acid deficiency. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2001;12:481-491.

Lockhart RD. *Anatomía humana*. México: Interamericana, 1988.

Lomnitski L, Bergman M, Schön I, Grossman S. The effect of dietary vitamin E and  $\beta$ -carotene on oxidation processes in the rat testis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991;1082:101-107.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-275.

Lucesoli F, Fraga CG. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and  $\alpha$ -tocopherol supplementation. *Toxicology* 1999;132:179-186.

Luís RE, Pereira-Lima L, Telöken C, Luís LM, Belló-Klein A, Ramos RC. Beneficial effect of  $\alpha$ -tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology* 2001;87:164-166.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal* 1987;1:441-445.

Mansfield KG, Land ED. Cryptorchidism in Florida panthers: prevalence, features and influence of genetic restoration. *Journal of Wildlife Diseases* 2002;38: 693-698.

Mather JP, Moore A, Li RH. Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1997;215:209-222.

McClintic JR. *Human anatomy*. USA: Mosby Company, 1983, p.p. 480-489.

Mojon D, Boscoboinik D, Haas A, Bohnke M, Azzi A. Vitamin E inhibits retinal pigment epithelium proliferation in vitro. *Ophthalmic Research* 1994;26:304-309.

Møller H, Weidner IS. Epidemiology of cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 1999;10:352-354.

Momose Y, Griffiths AL, Hutson JM. Testicular descent. III. The neonatal mouse gubernaculum shows rhythmic contraction in organ culture in response to calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* 1992;131:2881-2884.

Mustacich DJ, Vo AT, Elias VD, Payne K, Sullivan L, Leonard SW, Traber MG. Regulatory mechanisms to control tissue  $\alpha$ -tocopherol. *Free Radical Biology and Medicine* 2007;43:610-618.

Ng SL, Bidarkar SS, Sourial M, Farmer PJ, Donath S, Hutson JM. Gubernacular cell division in different rodent models of cryptorchidism supports indirect androgenic action via the genitofemoral nerve. *Journal of Pediatric Surgery* 2005;40:434-441.

Ng YH, Farmer P, Sourial M, Southwell B, Hutson JM. Growth of the rat gubernaculum in vitro and localization of its growth centre. *Journal of Pediatric Surgery* 2009;44:422-426.

Norazlina M, Lee PL, Lukman HI, Nazrun AS, Ima-Nirwana S. Effects of vitamin E supplementation on bone metabolism in nicotine-treated rats. *Singapore Medicine Journal* 2007;48:195-199.

Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproductive Update* 1999;5:399-420.

Ofordeme KG, Aslan AR, Nazir TM, Hayner-Buchan A, Kogan BA. Apoptosis and proliferation in human undescended testes. *BJU International* 2005;96:634-638.

Oktem G, Altay B, Turna B, Aktug H, Yavasoglu A, Yilmaz O, Semerci B. Determination of nitric oxide synthase activity and apoptosis of germ cells in different obstruction models. *Acta Histochemica* 2009;111:119-126.

Ong C, Hasthorpe S, Hutson JM. Germ cell development in the descended and cryptorchid testis and the effects of hormonal manipulation. *Pediatric Surgery International* 2005;21:240-254.

O'Rahilly R. *Anatomía de Gardner*. 5ª ed. México: Interamericana McGraw-Hill, 1986, p.p. 544-552.

Oré R, Valdivieso R, Huerta D. Capacidad antioxidante en ratas diabéticas: rol de la vitamina E. *Revista Peruana de Biología* 2000; 7.

Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Abdominal position of the rat testis is associated with high level of lipid peroxidation. *Biology of Reproduction* 1995;53:1146-1150.

Perera-Marín G, Murcia C, González-Padilla E. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: Characterization and physiological relevance. *Animal Reproduction Science* 2007;101:187-207.

Pérez-Severiano F, Rodríguez PM, Pedraza ChJ. S-allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry International* 2004;45:1175-1183.

Pineda MH. McDonald's veterinary endocrinology and reproduction. 5<sup>nd</sup> ed. USA: Iowa State Press, 2003, p.p. 254, 256.

Pita RG. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición* 1997;11:46-57.

Raivio T, Toppari J, Kaleva M, Virtanen H, Haavisto AM, Dunkel L, Jänne OA. Serum androgen bioactivity in cryptorchid and noncryptorchid boys during the postnatal reproductive hormone surge. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003;88:2597-2599.

Rajeswary S, Kumaran B, Ilangovan R, Yuvaraj S, Sridhar M, Venkataraman P, Srinivasan N, Aruldas M. Modulation antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. *Reproductive Toxicology* 2007;24:371-380.

Rhoden EL, Pereira-Lima L, Telöken C, Lucas ML, Bélló-Klein A, Rhoden CR. Beneficial effect of  $\alpha$ -tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *Japanese Journal Pharmacology* 2001;87:164-166.

Ritzén E. Undescended testes: a consensus on management. *European Journal of Endocrinology* 2008;159:S87-S90.

Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004;2:12.

Sen GR, Sen GE, Kumar DB, Ranjan TA, Ahnn J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecules and Cells* 2004;17:132-139.

Sena CM, Nunes E, Gomes A, Santos MS, Proença T, Martins MI, Seiça RM. Supplementation of coenzyme Q<sub>10</sub> and  $\alpha$ -tocopherol lowers glycated hemoglobin level and lipid peroxidation in pancreas of diabetic rats. *Nutrition Research* 2008; 28:113-121.

Setiadi DH, Chass GA, Torday LL, Varro A, Papp JG. Vitamin E models. Can the anti-oxidant and pro-oxidant dichotomy of  $\alpha$ -tocopherol be related to ionic ring closing and radical ring opening redox reactions? *Journal of Molecular Structure* 2003;620:93-106.

Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996;48:835-850.

Sharpe RM. *The Physiology of Reproduction. Regulation of spermatogenesis.* New York: Raven Press, 1994.

Sharpe RM, McKinnel C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769-784.

Shikone T, Billing H, Hsueh AJ. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biology of Reproduction* 1994;51:865-872.

Shirpoor A, Khadem MH, Salami S, Ghaderi PF, Rasmi Y. Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *World Journal of Gastroenterology* 2007;13:4340-4344.

Shively MJ. *Anatomía veterinaria. Básica, comparative y clínica.* México: El Manual Moderno, 1987, p.p. 347, 348.

Shono T, Goh DW, Momose Y, Hutson JM. Physiological effects in vitro of calcitonin gene-related peptide on gubernacular contractility with or without denervation. *Journal of Pediatric Surgery* 1995;4:591-595.



Shono T, Zakari O, Imajima T, Suita S. Extraabdominal fixation of the gubernaculum inhibits testicular descent in newborn rats. *Journal of Pediatric Surgery* 1996;4:503-506.

Shoor RA, Elhanbly SM, Mederberger C. The pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *Current Urology Reports* 2001;2:432-436.

Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* 1999;4:38-47.

Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Morales I, Ríos R, Castro A. Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptorquidismo. *Revista Médica Chile* 2007;135:279-286.

Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2008;109:323-330.

Sommer D, Fakata KL, Swanson SA, Stemmer PM. Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants in vitro. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267:2312-2322.

Steinberger E, Dixon WJ. Some observations on the effect of heat on the testicular germinal epithelium. *Fertility and Sterility* 1959;10:578-595.

Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews* 2007;6:662-679.

Thonneau P, Ducot B, Bujan L, Mieusset R, Spira A. Heat exposure as a hazard to male fertility. *Lancet* 1996;347:204-205.

Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995;136:242-252.

Toppari J, Virtanen H, Skakkebaek NE, Main KM. Environmental effects on hormonal regulation of testicular descent. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006;102:184-186.

Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE, Main K, Skakkebaek NE. Luteinizing hormone in testicular descent. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007;269:34-37.

Traber MG, Kayden HJ. Tocopherol distribution and intracellular localization in human adipose tissue. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1987;46:488-495.

Turner T, Lysiak J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology* 2008;29:488-498.

Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007;87:115-122.

Vázquez-Memije ME, El Hafidi M. Producción de radicales libres de oxígeno por las mitocondrias de testículo de rata durante la espermatogénesis y envejecimiento del epitelio germinal. Cartel del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica; 2006 noviembre 12-17; Guanajuato (Gto.) México. México DF: Sociedad Mexicana de Bioquímica, AC.

Vigueras VRM, Merchant-Larios H. El descenso testicular. Conceptos actuales. *Acta Pediátrica México* 2001;22(6):424-431.

Vigueras 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 2003;34:166-170.

Vigueras VRM, Moreno MNA, Reyes TG, Merchant LH. Gubernacular fibroblasts express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with hCG. Urological Research 2004;32:386-390.

Vigueras-Villaseñor RM, Molina-Ortiz D, Reyes-Torres G, Santamaría del Ángel D, Moreno-Mendoza NA, García Cruz E, Cuevas-Alpuche O, Rojas-Castañeda JC. Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. Acta Histochemica 2009;2:127-137.

Vilar-Rojas C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. Archives of Medical Research 1996;27: 1-6.

Virtanen HE, Tapanainen AE, Kaleva MM, Suomi AM, Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J. Mild gestational diabetes as a risk factor for congenital cryptorchidism. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2006;91:4862-4865.

Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson A, Main K. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. Acta Paediatrica 2007a;96:611-616.

Virtanen HE, Cortes D, Rajpert-De Meyts, Ritzén E, Nordenskjöld A, Skakkebaek NE, Toppari J. Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. Acta Paediatrica 2007b;96:622-627.

Virtanen HE, Toppari J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. Human Reproduction 2008;14:49-58.

Wang XL, Rainwater DL, Vandenberg JF, Mitchell BD, Mahaney MC. Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2001;21:1190-1195.

Weinbauer GF, Wessels J. Paracrine control of spermatogenesis. *Andrologia* 1999;31:249-262.

Yates D, Hayes G, Heffernan M, Beynon R. Incidence of cryptorchidism in dogs and cats. *Veterinary Record* 2003;152:502-504.

Yin Y, DeWolf W, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biology of Reproduction* 1998;58:492-496.

Yong E, Huynh J, Farmer P, Ong S, Sourial M, Donath S, Ting A, Chow Y, Hutson JM. Calcitonin gene-related peptide stimulates mitosis in the tip of the rat gubernaculum *in vitro* and provides the chemotactic signals to control gubernacular migration during testicular descent. *Journal of Pediatric Surgery* 2008;43:1533-1539.

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology* 2002;23:870-881.

Zhou B, Hutson JM, Watts LM, Hasthorpe S, Naim-UI-Islam. Human chorionic gonadotropin (hCG) stimulates spermatogenesis in immature mice *in vivo*. *Journal of Pediatric Surgery* 2002;37:1751-1753.

Zini A, Schlegel PN. Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *Journal of Urology* 1997;158:659-663.

Zini A, Abitbol J, Schulsinger D, Goldstein M, Schlegel P. Restoration of spermatogenesis after scrotal replacement of experimentally cryptorchid rat testis: assessment of germ cell apoptosis and eNOS expression. *Urology* 1999;53:223-227.

## ANEXO I

Tabla 3. Escala de cuantificación del índice histopatológico.  
Tomado de Viguera *et al.*, 2009.

<i>Alteraciones histológicas</i>	<i>Puntaje</i>
a) Plegamiento de lámina basal	1
b) Descamación celular	1
c) Vacuolización epitelial	2
d) Sincicio celular	2
e) Picnosis	2
f) Tubos sin espermátidas	3
g) Tubos sin espermatoцитos	4
h) Tubos sin espermatogonias	5
i) Ausencia de todo tipo celular	6

Tabla 4. Valoración del grado de maduración del epitelio seminífero. Basado en Johnsen, 1970.

<i>Puntaje</i>	<i>Maduración</i>
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides.
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por tubo).
8	No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátidas maduras en diferenciación.
7	Gran cantidad de espermátidas sin algún signo de diferenciación.
6	Presencia de pocas espermátidas (5 por tubo).
5	Gran cantidad de espermatoцитos presentes.
4	Pocos espermatoцитos presentes (5 por tubo).
3	Presencia únicamente de espermatogonias.
2	No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli.
1	No hay células en el tubo seminífero.

Tabla 5. Peso del testículo en relación al peso corporal de rata.

Grupo	40 días de edad			120 días de edad		
	Peso corporal (g.)	Peso de testículo (g.)	Relación peso testículo-peso corporal (%)	Peso corporal (g.)	Peso de testículo (g.)	Relación peso testículo-peso corporal (%)
Control sano	208.33 ± 4.91	0.94 ± 0.03	0.45 ± 0.01	526.96 ± 31.06	1.92 ± 0.06	0.37 ± 0.01
Criptorquidia y vehículo	197.00 ± 2.52	0.64 ± 0.04	0.32 ± 0.02	556.00 ± 11.59	1.44 ± 0.12	0.26 ± 0.02 <sup>b</sup>
Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg)	199.00 ± 2.65	0.56 ± 0.02	0.28 ± 0.01 <sup>d</sup>	483.50 ± 45.50	1.60 ± 0.07	0.33 ± 0.02
Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg)	175.33 ± 10.41	0.56 ± 0.07	0.32 ± 0.02	497.67 ± 8.95	1.79 ± 0.10	0.36 ± 0.02 <sup>c</sup>
Manipulación y vehículo	176.67 ± 5.78	0.79 ± 0.07	0.45 ± 0.05	440.67 ± 28.66	1.72 ± 0.11	0.39 ± 0.01
Manipulación y vitamina E (30 mg/kg)	169.67 ± 5.90	0.77 ± 0.01	0.45 ± 0.01	491.33 ± 14.31	1.80 ± 0.03	0.37 ± 0.01
Manipulación y vitamina E (100 mg/kg)	159.00 ± 11.50	0.85 ± 0.09	0.54 ± 0.05	597.33 ± 13.10	1.96 ± 0.05	0.33 ± 0.01

Se realizaron comparaciones entre los diferentes grupos como se indica a continuación: a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia y vehículo, c. Criptorquidia y vehículo vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa que a los 120 días de edad el grupo con criptorquidia presenta una disminución en el peso testicular con respecto al grupo control sano, el peso testicular aumentó significativamente al administrar vitamina E a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media ± error estándar,  $p < 0.05$ .

Tabla 6. Cantidad de especies reactivas de oxígeno encontradas en testículo de rata a los 40 días de edad.

<i>Grupo</i>	<i>pM de DCF /mg de proteína / ml</i>
Control sano	3.00 ± 0.19
Criptorquidia y vehículo	3.83 ± 0.38
Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg)	3.63 ± 0.24
Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg)	4.65 ± 0.57 <sup>e</sup>
Manipulación y vehículo	2.83 ± 0.20
Manipulación y vitamina E (30 mg/kg)	1.01 ± 0.13 <sup>a</sup>
Manipulación y vitamina E (100 mg/kg)	1.25 ± 0.21 <sup>a</sup>

Se realizaron comparaciones entre los grupos como se indica a continuación: a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia y vehículo, c. Criptorquidia y vehículo vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa que en los grupos con manipulación y administración de vitamina E hay una disminución significativa en la cantidad de especies reactivas de oxígeno en comparación con el grupo control sano, sin embargo al administrarse una dosis de 100 mg/kg de vitamina E en el grupo con criptorquidia aumentó la cantidad de estos radicales libres, Los valores se presentan como media ± error estándar,  $p < 0.05$ .

Tabla 7. Índice histopatológico, de maduración (Johnsen) y área epitelial en testículo de rata.

Grupo	40 días de edad			120 días de edad		
	Índice de maduración	Índice histopatológico	Área epitelial ( $\mu\text{m}^2$ )	Índice de maduración	Índice histopatológico	Área epitelial ( $\mu\text{m}^2$ )
Control sano	9.83 ± 0.05	3.78 ± 0.14	42.08 x 10 <sup>3</sup> ± 868.27	10	2.47 ± 0.10	83.36 x 10 <sup>3</sup> ± 1507.72
Criptorquidia y vehículo	5.32 ± 0.06 <sup>b</sup>	7.58 ± 0.21 <sup>b</sup>	34.59 x 10 <sup>3</sup> ± 892.56 <sup>b</sup>	8.43 ± 0.38 <sup>b</sup>	4.90 ± 0.24 <sup>b</sup>	48.05 x 10 <sup>3</sup> ± 2785.53 <sup>b</sup>
Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg)	5.10 ± 0.05 <sup>d</sup>	7.77 ± 0.23 <sup>d</sup>	31.13 x 10 <sup>3</sup> ± 894.79 <sup>d</sup>	10 <sup>c</sup>	3.36 ± 0.15 <sup>c,d</sup>	74.13 x 10 <sup>3</sup> ± 1587.26 <sup>c,d</sup>
Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg)	5.63 ± 0.12 <sup>e</sup>	6.76 ± 0.18 <sup>c,e</sup>	29.41 x 10 <sup>3</sup> ± 763.86 <sup>c,e</sup>	10 <sup>c</sup>	3.41 ± 0.13 <sup>c,e</sup>	62.29 x 10 <sup>3</sup> ± 1669.11 <sup>c,e</sup>
Manipulación y vehículo	9.49 ± 0.12	3.35 ± 0.15	38.80 x 10 <sup>3</sup> ± 523.43	9.94 ± 0.03	3.86 ± 0.14 <sup>a</sup>	66.04 x 10 <sup>3</sup> ± 1441.76 <sup>a</sup>
Manipulación y vitamina E (30 mg/kg)	9.36 ± 0.14	3.44 ± 0.17	41.24 x 10 <sup>3</sup> ± 2044.77	9.97 ± 0.03	3.81 ± 0.12 <sup>a</sup>	70.06 x 10 <sup>3</sup> ± 1510.99 <sup>a</sup>
Manipulación y vitamina E (100 mg/kg)	9.22 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.71 ± 0.16	47.04 x 10 <sup>3</sup> ± 1081.73 <sup>a</sup>	10.00	3.02 ± 0.11 <sup>a</sup>	73.43 x 10 <sup>3</sup> ± 1651.73 <sup>a</sup>

Se realizaron comparaciones entre los grupos como se indica a continuación: a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia y vehículo, c. Criptorquidia y vehículo vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa una disminución del índice de maduración y el área epitelial, así como un aumento en las alteraciones histológicas en el grupo con criptorquidia y vehículo tanto a los 40 días como a los 120. En los grupos con criptorquidia tratados con vitamina E se alcanzan los valores del grupos control sano a los 120 días. Los valores se presentan como media ± error estándar, p<0.05.



Tabla 8. Apoptosis y proliferación en testículo de rata.

Grupo	40 días de edad		120 días de edad	
	Apoptosis (%)	Proliferación (%)	Apoptosis (%)	Proliferación (%)
Control sano	1.55 ± 0.13	8.74 ± 1.48	0.98 ± 0.13	11.55 ± 1.54
Criptorquidia y vehículo	10.12 ± 1.04 <sup>b</sup>	5.44 ± 0.51	2.99 ± 0.26 <sup>b</sup>	7.57 ± 0.94
Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg)	5.88 ± 0.70 <sup>c,d</sup>	8.09 ± 0.84	1.18 ± 0.16 <sup>c</sup>	8.97 ± 1.15
Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg)	9.03 ± 0.99 <sup>e</sup>	9.26 ± 0.85	1.66 ± 0.20 <sup>c</sup>	11.70 ± 1.34
Manipulación y vehículo	1.11 ± 0.07	12.58 ± 1.80	1.19 ± 0.12	10.70 ± 1.68
Manipulación y vitamina E (30 mg/kg)	1.33 ± 0.11	8.91 ± 1.50	1.08 ± 0.11	12.47 ± 1.21
Manipulación y vitamina E (100 mg/kg)	0.99 ± 0.14	12.66 ± 1.69	0.54 ± 0.04	13.87 ± 1.23

Se realizaron comparaciones entre los grupos como se indica a continuación: a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia y vehículo, c. Criptorquidia y vehículo vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa un aumento significativo en la apoptosis del grupo con criptorquidia al compararse con el grupo control sano tanto a los 40 días de edad como a los 120. Al administrarse vitamina E se disminuye la apoptosis alcanzando los valores del grupo control sano a los 120 días de edad. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en la proliferación celular. Los valores se presentan como media ± error estándar,  $p < 0.05$ .

Tabla 9. Número de crías nacidas vivas y sanas obtenidas en la prueba de fertilidad de rata de 120 días de edad.

Grupo	Número de crías	Número de hembras preñadas 9/9
Control sano	12.33 ± 0.71	9/9
Criptorquidia y vehículo	0.56 ± 0.38 <sup>b</sup>	2/9
Criptorquidia y vitamina E (30)	4.56 ± 2.13 <sup>d</sup>	4/9
Criptorquidia y vitamina E (100)	5.33 ± 6.08 <sup>e</sup>	5/9
Manipulación y vehículo	1.56 ± 1.56 <sup>a</sup>	1/9
Manipulación y vitamina E (30)	6.33 ± 1.85	6/9
Manipulación y vitamina E (100)	5.00 ± 1.42 <sup>a</sup>	6/9

Se realizaron comparaciones entre los grupos como se indica a continuación: a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia y vehículo, c. Criptorquidia y vehículo vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa una disminución en el número de hembras preñadas así como en el número de crías nacidas en el grupo con criptorquidia en comparación con el grupo control sano, las cuales aumentaron al administrar vitamina E sin ser significativo. Los valores se presentan como media ± error estándar,  $p < 0.05$ .

## ANEXO II

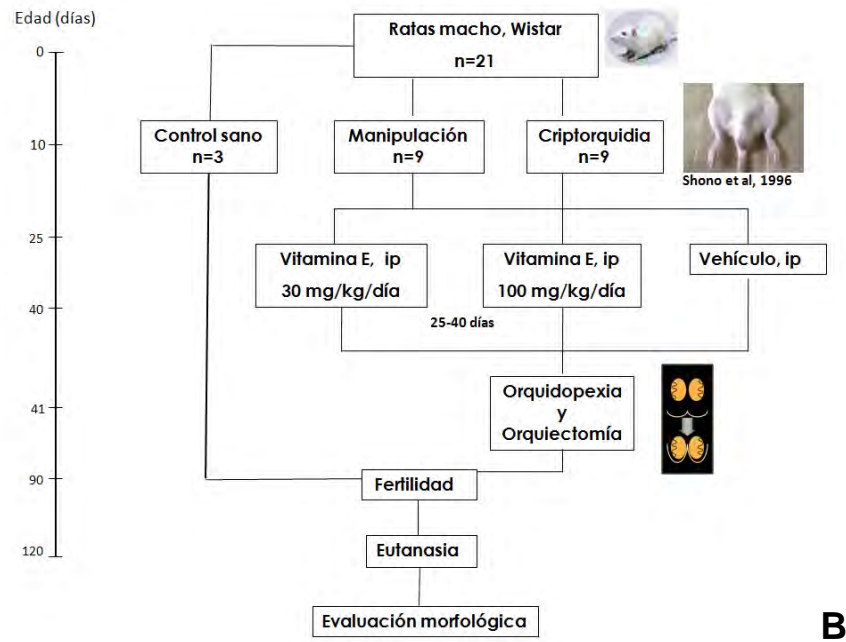
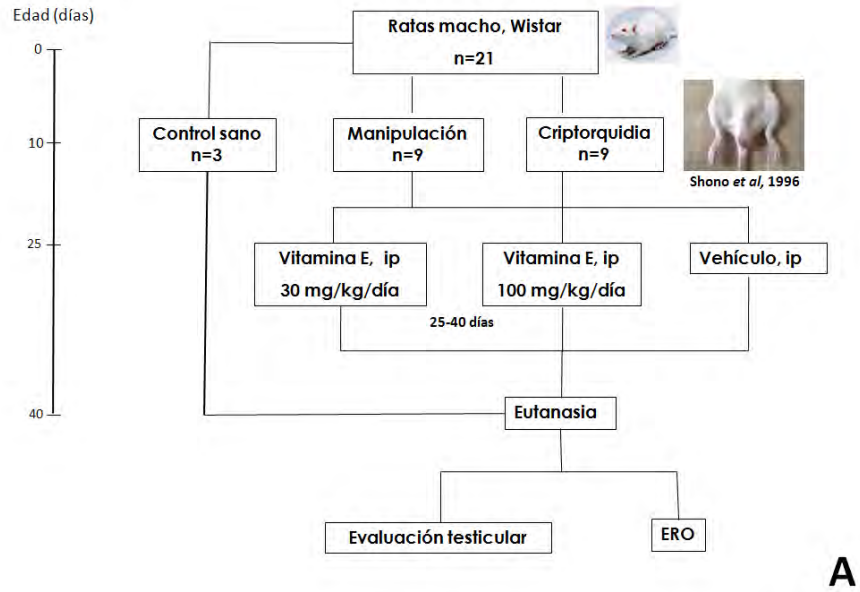


Figura 18. Metodología. Se muestran los diferentes grupos, los procedimientos y el número de animales utilizados en cada uno de ellos. A. Diagrama de la evaluación a los 40 días de edad, B. Diagrama de la evaluación a los 120 días de edad. Evaluación morfológica: apoptosis, histología testicular y proliferación celular.

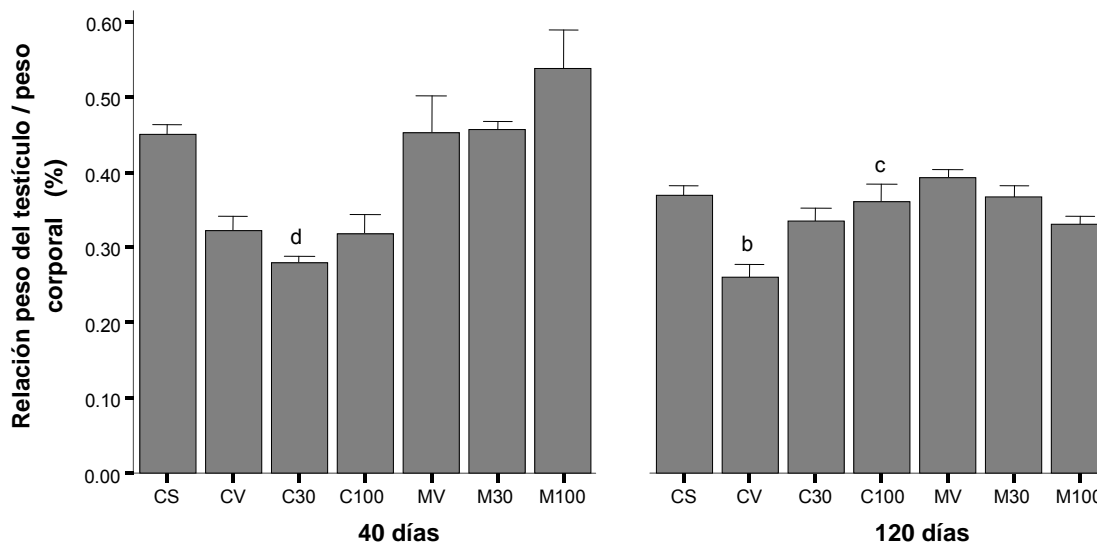


Figura 19. Peso del testículo con respecto al peso corporal de rata. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30), manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia y vehículo, c. Criptorquidia y vehículo vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa que a los 120 días de edad el grupo con criptorquidia presenta una disminución en el peso testicular con respecto al control sano, el cual aumentó significativamente al administrar vitamina E a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

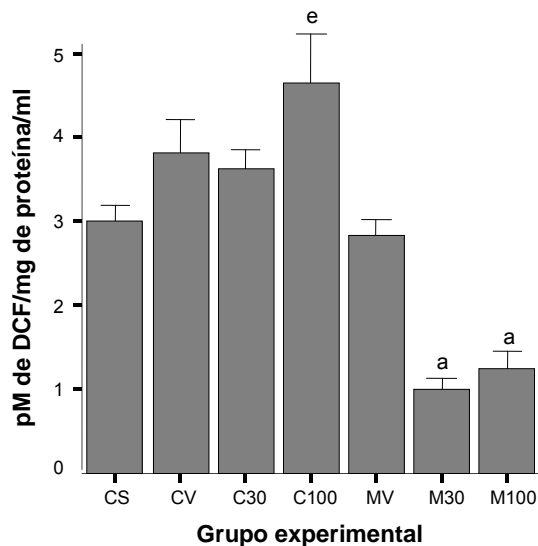


Figura 20. Determinación de especies reactivas de oxígeno en testículo de rata. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30) y manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia, c. Criptorquidia vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa que en los grupos con manipulación y administración de vitamina E hay una disminución significativa en la cantidad de especies reactivas de oxígeno en comparación con el grupo control sano, sin embargo al administrar una dosis de 100 mg/kg de vitamina E aumentó la cantidad de estos radicales libres en el grupo con criptorquidia. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

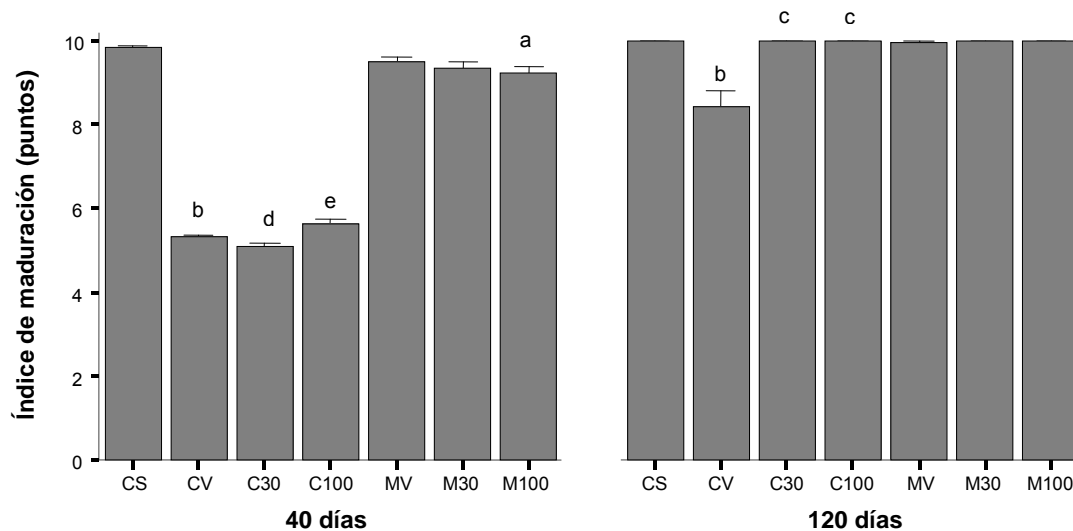


Figura 21. Índice de maduración (Johnsen) en testículo de rata. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30), manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia, c. Criptorquidia vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa una disminución en el grupo con criptorquidia y vehículo tanto a los 40 días como a los 120. En los grupos con criptorquidia tratados con vitamina E se alcanzan los valores del grupos control sano a los 120 días. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

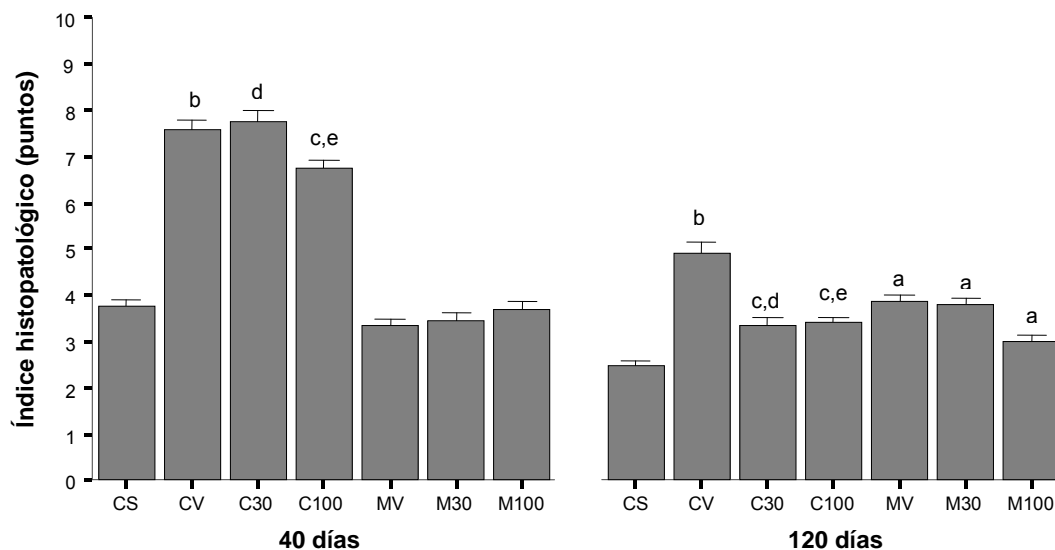


Figura 22. Índice histopatológico en testículo de rata. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30), manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia, c. Criptorquidia vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa un aumento de las alteraciones histológicas en el grupo con criptorquidia y vehículo, las cuales disminuyen al administrar vitamina E a los 120 días de edad. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

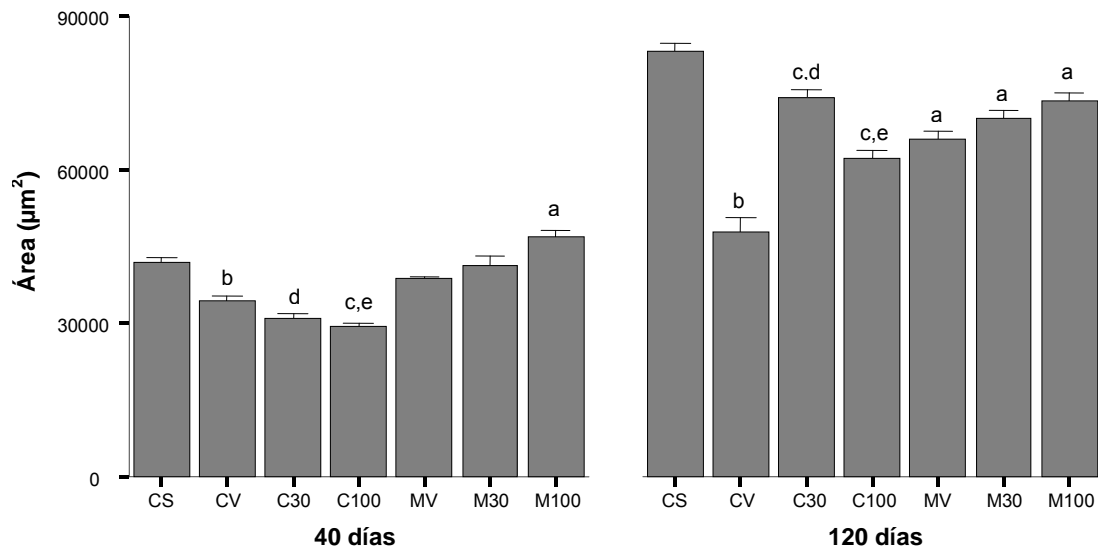


Figura 23. Área del epitelio seminífero en testículo de rata. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30), manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia, c. Criptorquidia vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa una disminución en el grupo con criptorquidia y vehículo tanto a los 40 días de edad como a los 120 al compararse con el grupo control sano, sin embargo hay un aumento significativo al administrar vitamina E a los 120 días de edad en los grupos con criptorquidia. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

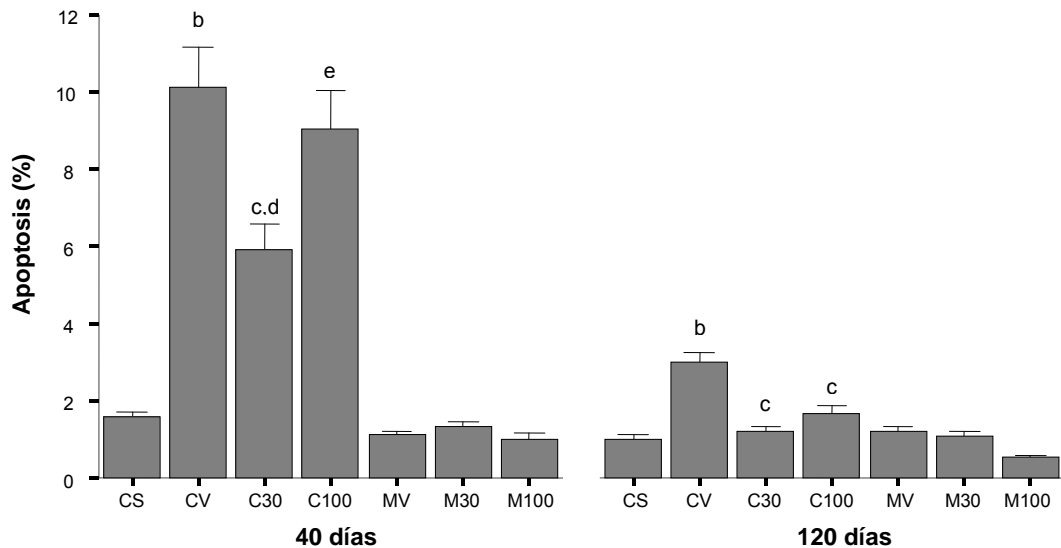


Figura 24. Porcentaje de apoptosis en testículo de rata. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30), manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia, c. Criptorquidia vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa un aumento significativo en la apoptosis del grupo con criptorquidia y vehículo al compararse con el grupo control sano tanto a los 40 días de edad como a los 120. Al administrarse vitamina E se disminuye la apoptosis alcanzando los valores del grupo control sano a los 120 días de edad. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

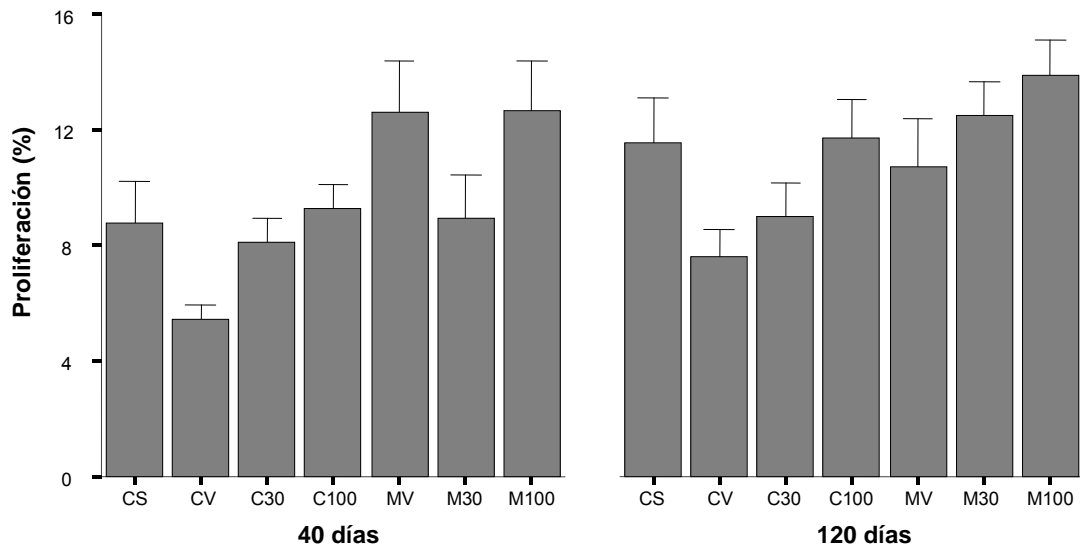


Figura 25. Porcentaje de proliferación en testículo de rata. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30), manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

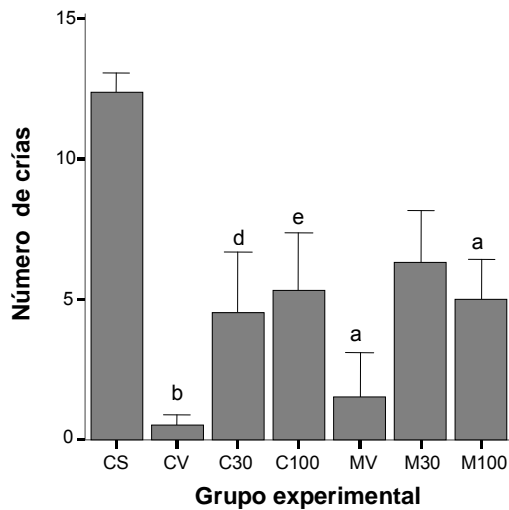


Figura 26. Número de crías nacidas vivas y sanas obtenidas en la prueba de fertilidad de rata de 120 días de edad. Control sano (CS), criptorquidia-vehículo (CV), criptorquidia-vitamina E 30 mg/kg (C30), criptorquidia-vitamina E 100 mg/kg (C100), manipulación-vehículo (MV), manipulación-vitamina E 30 mg/kg (M30), manipulación-vitamina E 100 mg/kg (M100). a. Control sano vs Manipulación, b. Control sano vs Criptorquidia, c. Criptorquidia vs Criptorquidia y vitamina E (30 y 100 mg/kg), d. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), e. Control sano vs Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa una disminución en el número de hembras preñadas así como en el número de crías nacidas en el grupo con criptorquidia y vehículo en comparación con el grupo control sano, las cuales aumentaron al administrar vitamina E sin ser significativo. Los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ .

### ANEXO III

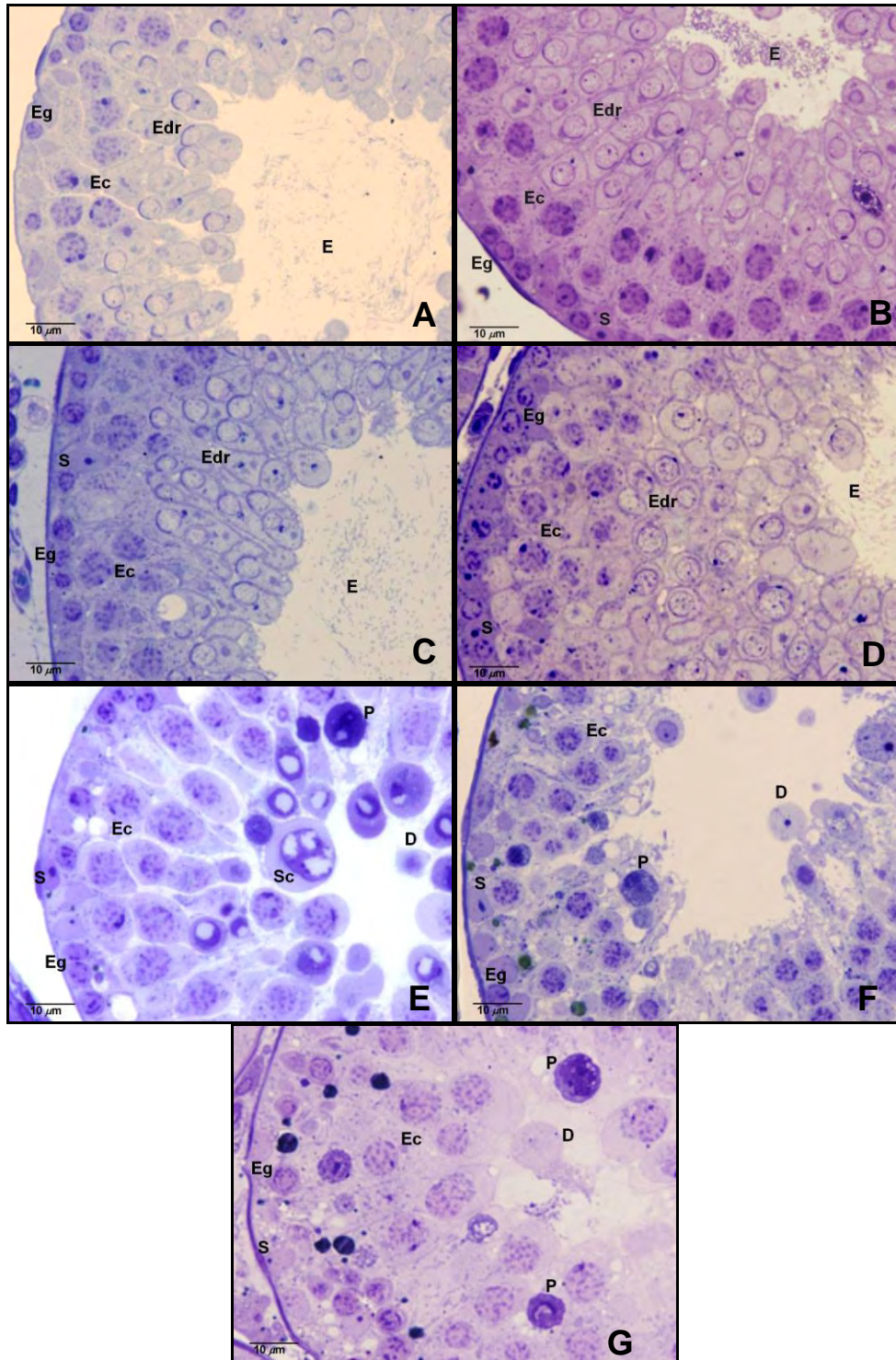


Figura 27. Histología de túbulos seminíferos de ratas con 40 días de edad. A. Control sano, B. Manipulación y vehículo, C. Manipulación y vitamina E (30 mg/kg), D. Manipulación y vitamina E (100 mg/kg), E. Criptorquidia y vehículo, F. Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), G. Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observa que el grupo con criptorquidia y vehículo presenta mayor cantidad de alteraciones así como una espermatogénesis detenida, las alteraciones disminuyen al administrar vitamina E sin alcanzar a los grupos de manipulación y control sano, sin embargo, la espermatogénesis fue completa. Espermatogonias (Eg), espermatocitos (Ec), espermatidas redondas (Edr), espermatidas elongadas (Ede), espermatozoides (E), células de Sertoli (S), picnosis (P), descamación (D), sincicio (Sc). Azul de toluidina, 60x.



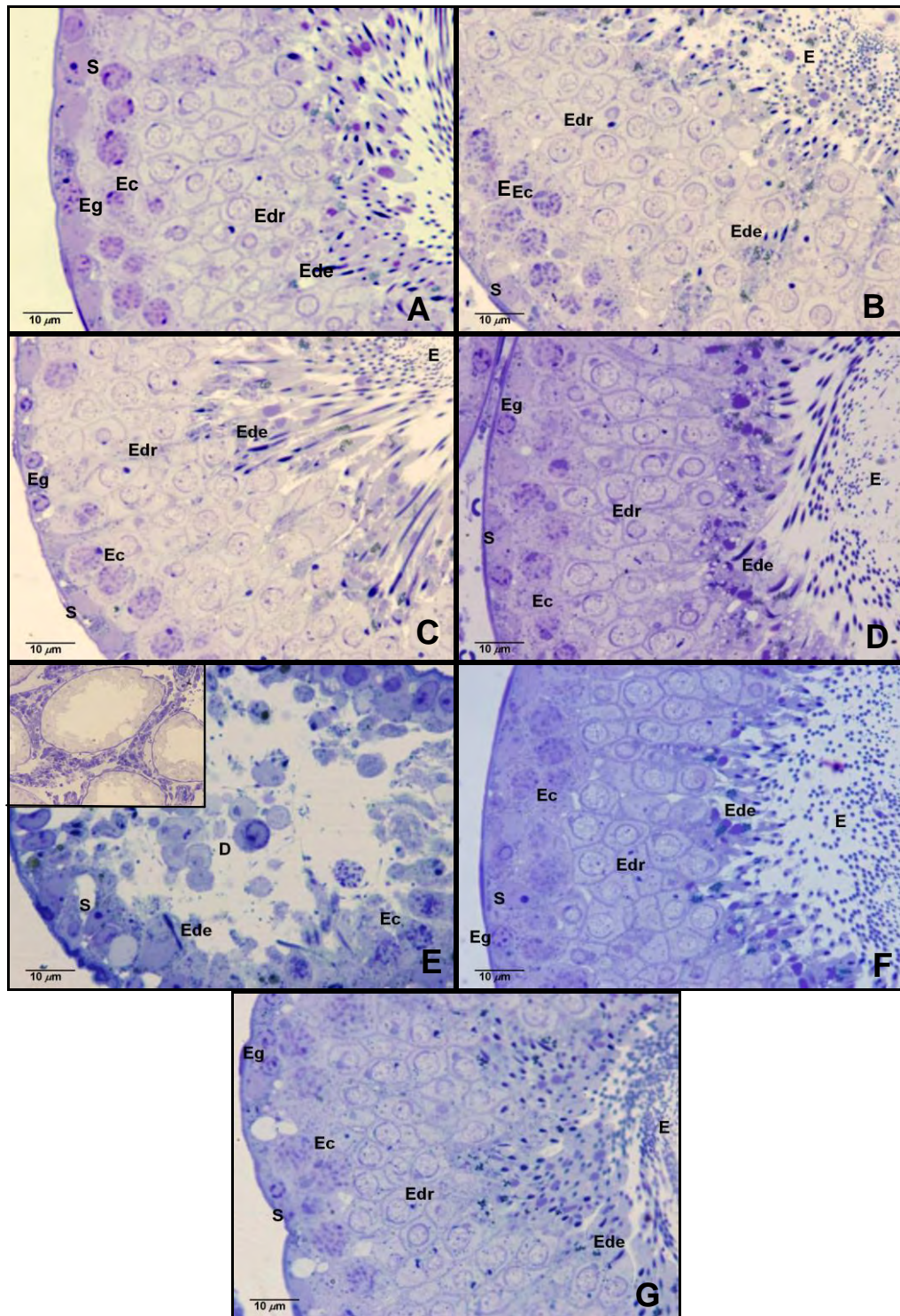


Figura 28. Histología de túbulos seminíferos de ratas con 120 días de edad. En el grupo con criptorquidia corregida aún se observan túbulos con daño permanente. A. Control sano, B. Manipulación y vehículo, C. Manipulación y vitamina E (30 mg/kg), D. Manipulación y vitamina E (100 mg/kg), E. Criptorquidia corregida y vehículo, el recuadro muestra túbulos con aplasia de células germinales, F. Criptorquidia corregida y vitamina E (30 mg/kg), G. Criptorquidia corregida y vitamina E (100 mg/kg). Se observa que el grupo con criptorquidia corregida presenta túbulos con aplasia de células germinales. Sin embargo, al administrarse vitamina E, las alteraciones disminuyeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ), además de presentarse una espermatogénesis completa en todos los túbulos. Espermatogonias (Eg), espermatocitos (Ec), espermátidas redondas (Edr), espermátidas elongadas (Ede), espermatozoides (E), células de Sertoli. Azul de toluidina, 60x.



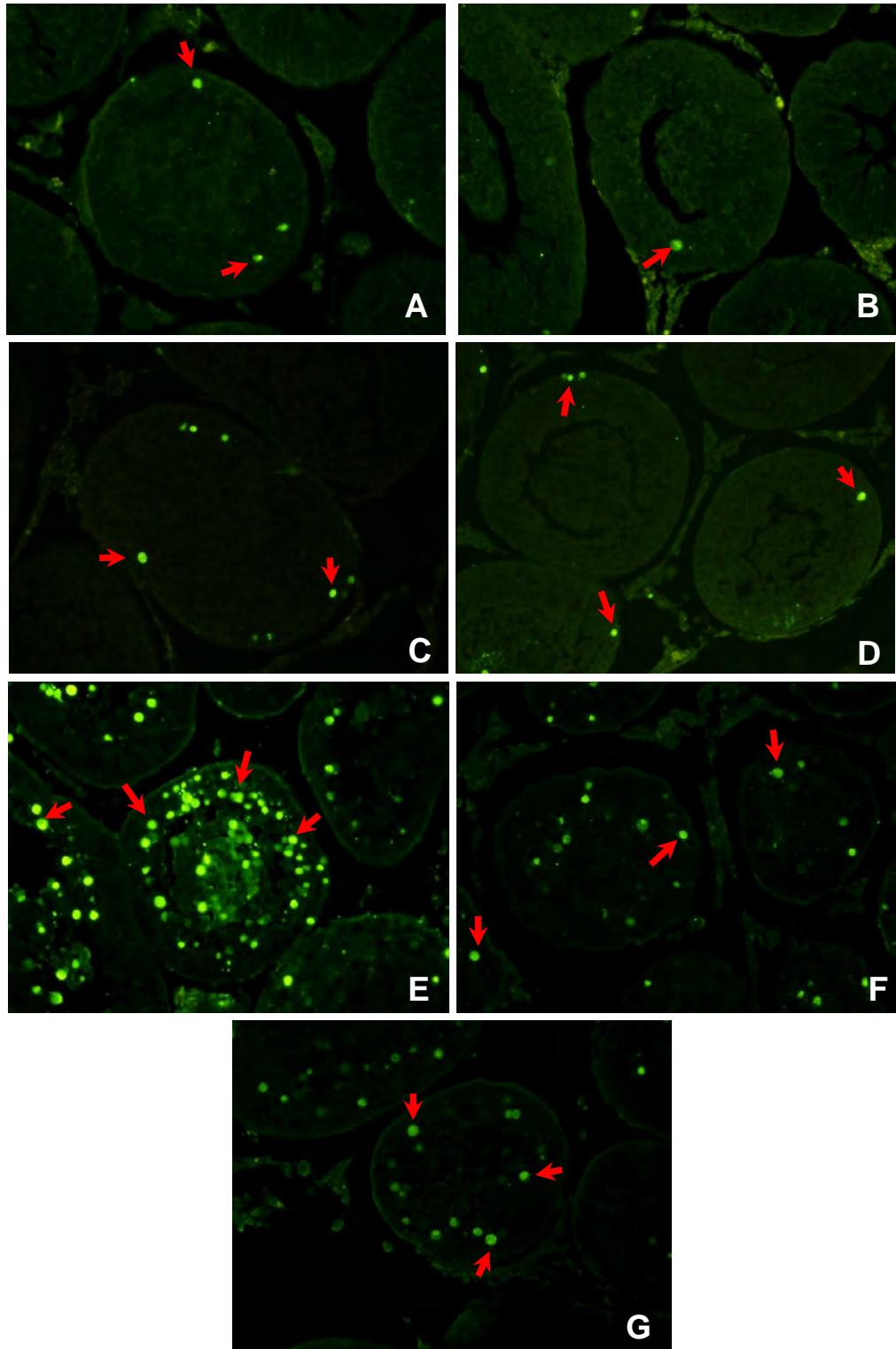


Figura 29. Apoptosis en túbulos seminíferos de ratas con 40 días de edad. A. Control sano, B. Manipulación y vehículo, C. Manipulación y vitamina E (30 mg/kg), D. Manipulación y vitamina E (100 mg/kg), E. Criptorquidia, F. Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), G. Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Se observan ciertas células en apoptosis en los grupos de manipulación y control sano debido a la regulación normal en el tejido. Sin embargo, en el grupo con criptorquidia y vehículo se observa una gran cantidad de células en apoptosis, las cuales disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) al administrarse vitamina E. Técnica de TUNEL, 20x.

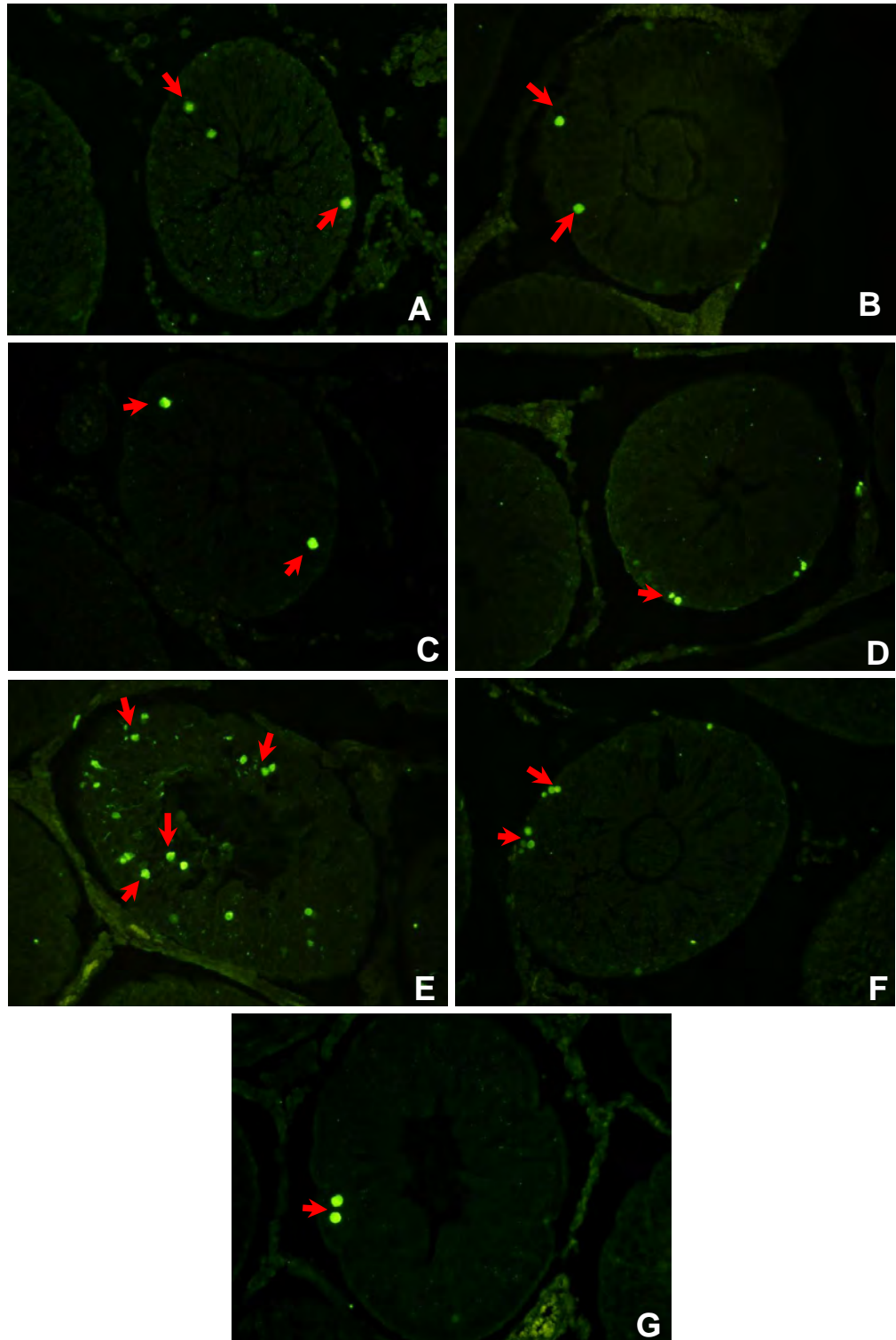


Figura 30. Apoptosis en túbulos seminíferos de ratas con 120 días de edad. A. Control sano, B. Manipulación y vehículo, C. Manipulación y vitamina E (30 mg/kg), D. Manipulación y vitamina E (100 mg/kg), E. Criptorquidia, F. Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), G. Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). En los grupos de manipulación y control sano se observan ciertas células en apoptosis debido a la regulación normal en el tejido. Sin embargo, en el grupo con criptorquidia corregida y vehículo hay una mayor cantidad de células en apoptosis, las cuales disminuyeron al administrar vitamina E ( $p < 0.05$ ). Técnica de TUNEL, 20x.

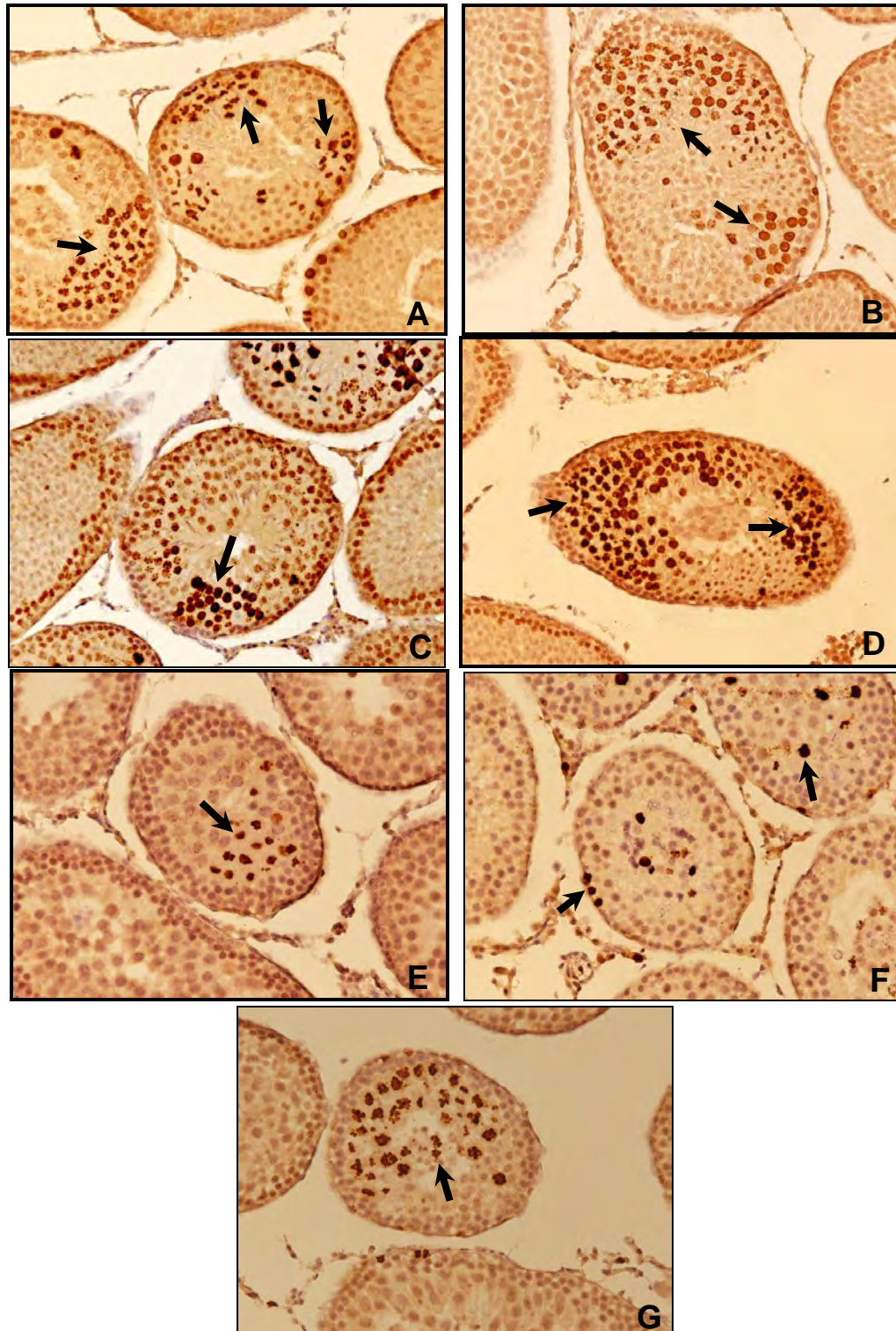


Figura 31. Células en proliferación en túbulos seminíferos de ratas con 40 días de edad. A. Control sano, B. Manipulación y vehículo, C. Manipulación y vitamina E (30 mg/kg), D. Manipulación y vitamina E (100 mg/kg), E. Criptorquidia, F. Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), G. Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Las flechas indican grupos de células en proliferación. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ). La cantidad de células en proliferación son relativas al número total de células en el túbulo seminífero. Técnica de inmunohistoquímica, 20x.



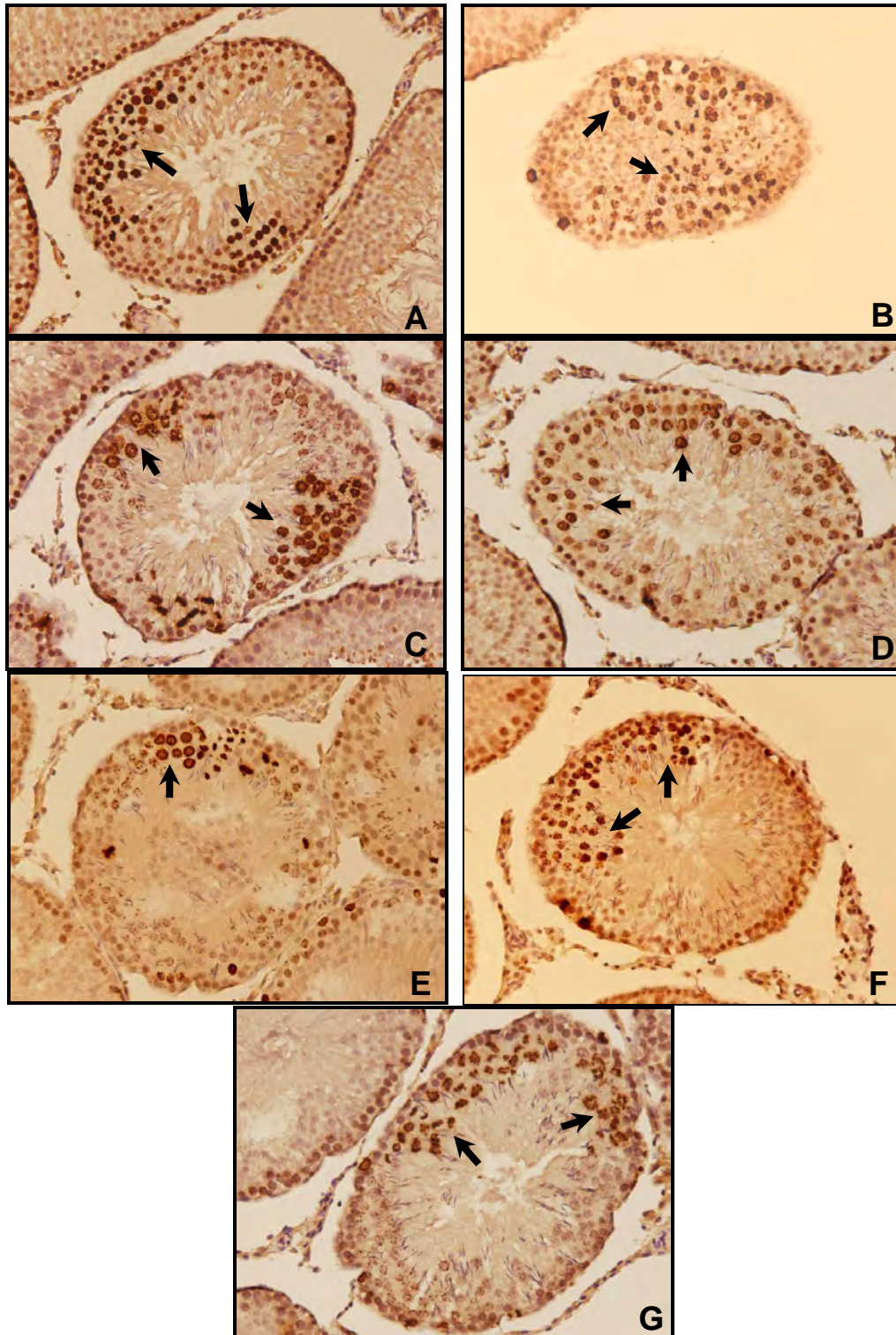


Figura 32. Células en proliferación en túbulos seminíferos de ratas con 120 días de edad. A. Control sano, B. Manipulación y vehículo, C. Manipulación y vitamina E (30 mg/kg), D. Manipulación y vitamina E (100 mg/kg), E. Criptorquidia, F. Criptorquidia y vitamina E (30 mg/kg), G. Criptorquidia y vitamina E (100 mg/kg). Las flechas indican grupos de células en proliferación. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ). La cantidad de células en proliferación son relativas al número total de células en el túbulo seminífero. Técnica de inmunohistoquímica, 20x.