

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TESTICULARES POSTNATALES EN EL
CONEJO CHINCHILLA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

PAOLA MONTELONGO SOLIS

Asesora:

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

México, D. F.

2012

~ I ~



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis hijas Dulce Andrea, Camila y Sofía Eloisa, que son mi fuerza de vivir cada día.

Las Adoro princesitas...

A mi esposo Adrián, quien es nuestro pilar de amor incondicional. Te Amo...

A Mamá Lupita y Papá Eloy, que siempre han estado ahí cuando más los he necesitado y han sido unos verdaderos padres; son una gran bendición en nuestras vidas, los amamos mucho.

A mis Padres, la Sra. Matilde Solís y el Sr. José Montelongo; juntos hemos experimentado en la vida la complejidad de cometer errores, pero aún con ellos hemos salido siempre adelante; ustedes han sido mi ejemplo a seguir. Los amo muchísimo...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mis padres por la vida, Mamá Mati y Papá Pepe, los amo.

A la vida por darme un par de padres más, la Sra. Guadalupe Ramos y el Sr. Eloy Solís,
los amo mucho.

También gracias a mi esposo, de ti he recibido grandes bendiciones, pero sobre todo,
gracias por mis tres princesas; ustedes me han dado parte de su tiempo y así yo poder
dedicarlo a este gran proyecto, gracias por su paciencia y apoyo incondicional
los amo muchísimo...

A mis hermanos Fátima y José que siempre están dispuestos a brindarme su ayuda, también
por supuesto, los adoro.

A la Dra. Rosa María Viguera. Sí existen las personas indispensables, usted es una de
ellas, muchísimas gracias; usted ocupa un lugar muy especial en mi corazón.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia, por mi formación y la oportunidad de obtener un título universitario.

Al Instituto Nacional de Pediatría y su laboratorio de Biología de la Reproducción, de quien
forma parte y es líder la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor.

Sr. Pedro Medina, usted esta sumado a la lista de personas indispensables para la
realización de este trabajo, no existe un parámetro establecido para medir su invaluable
apoyo técnico, otra vez gracias...

Dr. Oscar Gutiérrez, especial agradecimiento por su apoyo con el Servicio Social.

A la Dra. Ivette Caldeas Sánchez, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por la
donación de los conejos.

A los integrantes del laboratorio de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de
Pediatría. Todos en igual magnitud de valor por estar ahí apoyando siempre: Dra. Margarita
Chávez, Dr. Julio Rojas, Lucero, Edgar, Juan Carlos, Ismael y Carlos.

A los Miembros del Jurado, que gracias al tiempo que dedicaron en revisar esta tesis la
enriquecieron con sus aportaciones.

A mis queridas amigas del alma, Patricia Esparza, por ser un ejemplo de fortaleza en la vida
e Itzayana Mejía por ser un ejemplo de tenacidad, las quiero mucho.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| 1.0 INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL..... | 2 |
| 1.2 DESARROLLO DE LAS GÓNADAS | 3 |
| 1.3 DESARROLLO POSTNATAL DEL TESTÍCULO | 4 |
| 1.3.1 <i>Diferenciación y Proliferación de Células Testiculares Postnatales.....</i> | <i>6</i> |
| 1.4 TESTÍCULO MADURO | 10 |
| 1.4.1 <i>Espermatogénesis</i> | <i>11</i> |
| 1.5 KI-67 | 14 |
| 1.6 REGULACIÓN HORMONAL: EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TESTÍCULO..... | 14 |
| 1.7 MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN. | 17 |
| 2.0 JUSTIFICACIÓN..... | 21 |
| 3.0 OBJETIVO GENERAL | 21 |
| 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 21 |
| 4.0 MATERIAL Y METODOS | 21 |
| 4.1 ANIMALES..... | 21 |
| 4.2 PROCEDIMIENTO PARA RECOPIACIÓN DE DATOS ESTADÍSTICOS | 22 |
| 4.3 PROCEDIMIENTO PARA OBTENER TEJIDO TESTICULAR. | 22 |
| 4.4 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO TESTICULAR PARA SU ESTUDIO MORFOLÓGICO E HISTOMORFOMÉTRICO | 23 |
| 4.5 PROCESAMIENTO DEL TEJIDO TESTICULAR PARA ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN..... | 24 |
| 5.0 RESULTADOS | 25 |
| 5.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA, ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR E INMUNOREACTIVIDAD..... | 25 |
| 5.2 CICLOS DEL EPITELIO SEMINÍFERO..... | 30 |
| 6.0 FIGURAS | 34 |
| 7.0 TABLAS Y GRÁFICAS..... | 46 |
| 8.0 DISCUSIÓN | 50 |
| 9.0 CONCLUSIÓN | 55 |
| 10.0 REFERENCIAS..... | 56 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: DIFERENCIACIÓN SEXUAL..... | 2 |
| FIGURA 2: ORIGEN DE LAS CÉLULAS GERMINALES | 3 |
| FIGURA 3: TABLA QUE MUESTRA EDADES DE DIFERENCIACIÓN GONADAL EN DIFERENTES ESPECIES | 4 |
| FIGURA 4: FORMACIÓN DE CÁPSULA TESTICULAR Y TUBOS SEMINÍFEROS | 5 |
| FIGURA 5: DESARROLLO DEL SISTEMA GENITAL TUBULAR DEL MACHO | 6 |
| FIGURA 6: DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE LEYDIG | 8 |
| FIGURA 7: PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE SERTOLI..... | 9 |
| FIGURA 8: EPITELIO SEMINÍFERO..... | 13 |
| FIGURA 9: EJE HIPOTÁLAMO – HIPÓFISIS – TESTÍCULO..... | 16 |
| FIGURA 10 - GRÁFICOS COMPARATIVOS 1: COMPARACIÓN DE ETAPAS REPRODUCTIVAS DE . | 19 |
| FIGURA 11 - GRÁFICOS COMPARATIVOS 2: COMPARACIÓN DE GRÁFICAS DE CRECIMIENTO DE RAZA CHINCHILLA VS NUEVA ZELANDA. | 20 |
| FIGURA 12: CORDONES SEMINÍFEROS DE CONEJOS DE DIFERENTES EDADES..... | 34 |
| FIGURA 13: CORDONES SEMINÍFEROS DE CONEJOS DE DIFERENTES EDADES..... | 36 |
| FIGURA 14: CORDONES /TUBOS SEMINÍFEROS DE CONEJOS DE DIFERENTES EDADES..... | 38 |
| FIGURA 15: TUBOS SEMINÍFEROS DE CONEJOS DE 100 DPP..... | 40 |
| FIGURA 16: INMUNOHISTOQUÍMICA DE PROLIFERACIÓN | 41 |
| FIGURA 17: INMUNOHISTOQUÍMICA DE PROLIFERACIÓN | 42 |
| FIGURA 18: ETAPAS I, II, III Y IV DEL CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO | 43 |
| FIGURA 19: ETAPAS V, VI, VII Y VIII DEL CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO | 44 |
| FIGURA 20: INMUNOFLUORESCENCIA DE RICKEN Y VIEBAHN (2002)..... | 45 |

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| TABLA Y GRÁFICA 1: PESO CORPORAL..... | 46 |
| TABLA Y GRÁFICA 2: PESO TESTICULAR..... | 46 |
| TABLA Y GRÁFICA 3: RELACIÓN PESO TESTICULAR – PESO CORPORAL | 47 |
| TABLA Y GRÁFICA 4: ÁREA DE LOS CORDONES / TUBOS SEMINÍFEROS | 47 |
| TABLA Y GRÁFICA 5: ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN | 48 |
| TABLA Y GRÁFICA 6: PORCENTAJE DE CORDONES/TUBOS EN PROLIFERACIÓN..... | 49 |

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría a cargo de la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor.

Financiamientos

Fondo Federal 064/2010

CONACYT SALUD: 162006

Miembros del Jurado:

MVZ. Jorge Hernández Espinosa

MVZ. Juan Alberto Balcázar Sánchez

MVZ. Verónica Graullera Rivera

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

MVZ. Carlos Gerardo Salas Garrido

RESUMEN

MONTELONGO SOLIS PAOLA. Diferenciación de Células Testiculares Postnatales en el Conejo Chinchilla (bajo la dirección de: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor).

El conejo *O. cuniculus* es una especie que ofrece ventajas para estudios reproductivos en machos debido a que los periodos en el desarrollo testicular se asemejan a los del humano. La raza por excelencia empleada ha sido la Nueva Zelanda sin embargo se conoce que esta desarrolla diabetes y es propensa a obesidad a largo plazo, patologías que afectan la función reproductiva. El conejo Chinchilla es una alternativa para investigación, sin embargo el desarrollo testicular postnatal se desconoce. Por tanto el objetivo de este trabajo fue describir el desarrollo morfológico de los cordones/túbulos seminíferos y sus componentes celulares; además de estimar el índice de proliferación celular del epitelio seminífero en etapa postnatal.

La evaluación de cortes semifinos, permitieron identificar las células testiculares postnatales y a través de inmunohistoquímicas se monitoreó la actividad proliferativa de estas células. Encontramos que los gonocitos, se diferencian a espermatogonias entre los 50 y 60 días post parto (dpp), coincidiendo con el descenso testicular. Así mismo las células de Sertoli y germinales tienen un comportamiento proliferativo que decrece entre los 3 y 35 dpp, mostrando ausencia proliferativa total a los 50 dpp. Posterior a esta edad se reactiva la proliferación por mitosis y meiosis de la espermatogénesis, la cual se completará posterior a los 100 dpp. El análisis de resultados mostró que existen variantes en el desarrollo testicular entre las diferentes razas de conejos que deben ser tomadas en cuenta al considerar a esta especie como modelo de investigación en el campo de biología de la reproducción.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Diferenciación Sexual

En los mamíferos placentados, la determinación sexual genética ocurre al fusionarse los pronúcleos del espermatozoide y el ovocito formando el núcleo del cigoto, para las hembras una constitución cromosómica XX, y para los machos XY. La determinación sexual gonadal representa el establecimiento y estabilización de vías dimórficas de expresión génica conducentes a la diferenciación de ovarios o testículos. Este proceso complejo de patrón dimórfico de comportamiento sexual se inicia con la activación del gen Sry que actúa como un “switch” e inicia la determinación del testículo desencadenando la expresión de diversos genes, por ello es considerado como el factor determinante del testículo (Fdt)¹. Por lo que su presencia lleva al desarrollo en sentido masculino y su ausencia establece el desarrollo en sentido femenino (Fig. 1)².

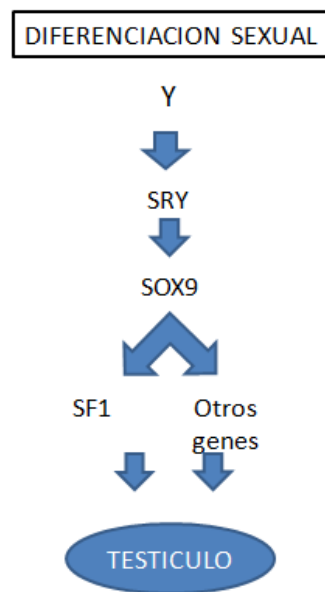


Figura 1: Diferenciación Sexual

Esquema que muestra la participación de los genes SRY, SOX9 y otros genes para la diferenciación sexual³.

1.2 Desarrollo de las gónadas

Las gónadas aparecen inicialmente como un par de eminencias longitudinales, los pliegues o crestas genitales, que se forman por la proliferación del epitelio superficial y la condensación del mesénquima subyacente. Las células germinales primordiales se observan en una etapa temprana del desarrollo entre las células endodérmicas de la pared del saco vitelino cerca del alantoides. Migran por movimientos, tipo “ameboides”, a lo largo del mesenterio dorsal del intestino posterior y llegan a las gónadas primitivas e invaden las crestas genitales (Fig. 2)².

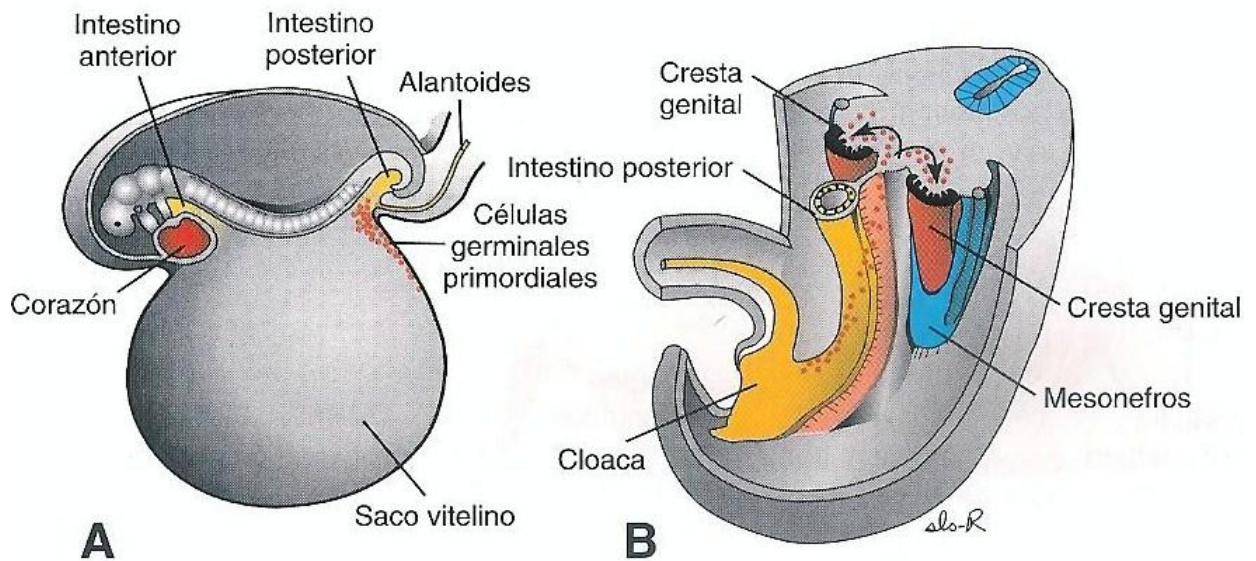


Figura 2: Origen de las células germinales

Esquema en donde se observa el origen de las células germinales primordiales y su migración a las crestas gonadales. A) Se observan células germinales primordiales en la pared del saco vitelino cerca de la inserción del alantoides. B) Patrón de migración de las células germinales primordiales a lo largo de la pared del intestino posterior y llegando a la cresta genital².

Las células epiteliales penetran en el mesénquima subyacente, donde forman cordones de forma irregular, los cordones sexuales primitivos. En embriones masculinos y femeninos, los cordones están unidos al epitelio superficial, y en esta etapa es imposible diferenciar la gónada masculina de la femenina. Por lo que se le denomina gónada indiferenciada².

1.3 Desarrollo postnatal del testículo

Por influencia del gen SRY que codifica el Fdt, los cordones sexuales primitivos siguen proliferando y se introducen profundamente en la medula gonadal para formar los cordones testiculares. Hacia el hilio de la glándula, los cordones se disgregan en una red de filamentos celulares diminutos que ulteriormente darán origen a la *rete testis*. Los cordones testiculares toman una forma de herradura y sus extremos se continúan con los de la *rete testis*. Los cordones testiculares están compuestos en este momento por células germinales primordiales y células sustentaculares de Sertoli que se derivan del epitelio superficial de la glándula².

La diferenciación de la gónada en testículo, la producción de hormonas y factores de crecimiento es completada en diferentes días de gestación dependiendo de la especie⁴ (Figura 3).

| <i>Especies</i> | <i>Días de gestación</i> |
|-----------------|--------------------------|
| Conejo | 22 |
| Ratón | 14 |
| Rata | 16 |
| Humano | 56 |

Figura 3: Tabla que muestra edades de diferenciación gonadal en diferentes especies⁴

Las células intersticiales de Leydig se desarrollan a partir del mesenquima original de la cresta gonadal y se encuentran entre los cordones testiculares. Comienzan a desarrollarse poco después de iniciada la diferenciación de los cordones. Las células de Leydig empiezan a producir testosterona y el testículo puede influir entonces en la diferenciación sexual de los conductos genitales y de los genitales externos³.

Inicialmente todos los embriones, ya sean hembras o machos, tienen dos pares de conductos genitales: los mesonéfricos (Wolf) y los paramesonéfricos (Müller). Como ya sabemos el gen SRY es el encargado del desarrollo testicular. Pero también se sabe que SOX9 se une a la región promotora del gen para la producción de la hormona antimülleriana en las células de Sertoli. SRY y SOX9 inducen a los testículos a secretar FGF9, que actúa como factor quimioatrayente que lleva a los túbulos del conducto de Wolf

a penetrar en la cresta gonadal. Sin esta penetración, no se podría continuar la diferenciación testicular.

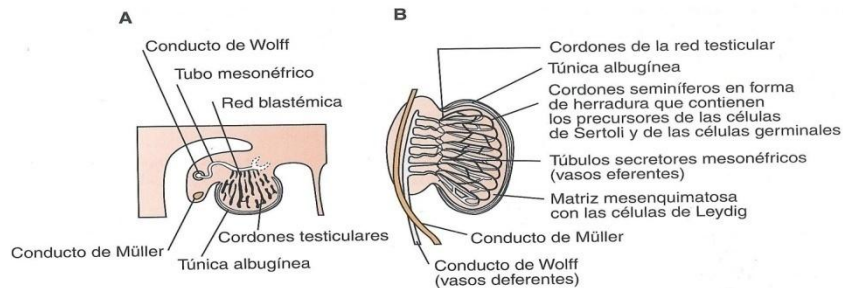


Figura 4: Formación de capsula testicular y tubos seminíferos

A) Los cordones sexuales primitivos proliferan en la médula y establecen contacto con la *rete testis*. La túnica albugínea separa los cordones testiculares del epitelio célomico para finalmente formar la capsula testicular. B) Forma de herradura de los tubos seminíferos y su continuidad con los cordones de la *rete testis*⁵.

El gen SRY a través de SOX9 regula positivamente la producción del factor de esteroidogénesis 1 (SF1), que estimula la diferenciación de las células de Sertoli y Leydig. SF1 junto con SOX9 aumentan la concentración de la hormona antimülleriana y determinan la regresión de los conductos de Müller. En las células de Leydig SF1 regula positivamente a los genes para que las enzimas sinteticen testosterona. La testosterona ingresa en las células de los tejidos efectores, donde permanece intacta o se transforma a dihidrotestosterona por la acción de la 5 α reductasa. Los complejos testosterona con su receptor intervienen en la virilización de los conductos de Wolf que han de formar los conductos deferentes, las vesículas seminales, los conductos eferentes y el epidídimo. (Figura 4). El complejo dihidrotestosterona con su receptor modulan la diferenciación de los genitales externos masculinos. Los conductos de Wolff persisten y forman los conductos genitales principales. Inmediatamente por debajo de la desembocadura de los conductillos eferentes, los conductos mesonéfricos se alargan y se enrollan sobre sí mismos, y dan lugar al conducto del epidídimo (Figura 5). Desde la cola del epidídimo hasta la evaginación de la vesícula seminal, los conductos mesonéfricos adquieren una gruesa túnica muscular y se denominan conductos/vasos deferentes^{2,5}.

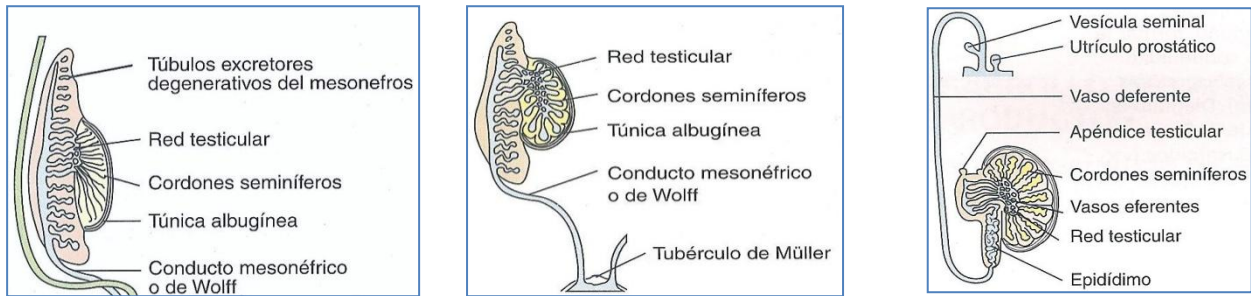


Figura 5: Desarrollo del sistema genital tubular del macho

Las células de Sertoli produce el factor inhibidor de los conductos de Müller. Wolff se mantiene por la influencia de los andrógenos producidos por los testículos (Modificado de Cunningham)⁵.

Las células de Sertoli fetales producen la hormona antimülleriana (MIS) que además de inducir la degeneración de los conductos de Müller, dicha hormona también interfiere con las células de Leydig, que ya se mencionó se desarrollan a partir del mesenquima original de la cresta gonadal. De 2 a 3 días después de su diferenciación, las células Leydig secretaran testosterona y también el péptido similar a la insulina 3 (INSL3)⁶.

Inicialmente la secreción de la testosterona está bajo control de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) de origen materno⁴. En etapas más avanzadas de la gestación la secreción de la testosterona está dada por la hormona luteinizante (LH) fetal; el testículo fetal produce también testosterona que actuará en el hipotálamo determinando con esto el ritmo de liberación de las gonadotropinas hipofisarias, es decir, LH y la hormona folículo estimulante (FSH) que regulan la función testicular de manera tónica y pulsátil⁷.

1.3.1 Diferenciación y Proliferación de Células Testiculares Postnatales.

Células Leydig

Las células Leydig adultas surgen a partir de las células mesenquimatosas del intersticio del testículo. El proceso comienza con la ubicación del retículo endoplásmico liso, en un polo de la célula^{8,9}.

El primer pasó de las células mesenquimatosas para su diferenciación, es la transformación de células madre en células progenitoras. Las células de Leydig progenitoras son

morfológicamente idénticas a las células Leydig madre, pero son claramente reconocibles por que producen enzimas esteroidogénicas y son capaces de producir andrógenos y desarrollan receptores para la LH. Cuando las células Leydig madre se diferencian en células de Leydig progenitoras, simultáneamente adquieren los citocromos 3β -HSD y p450c17, además, de que las células adquieren enzimas esteroidogénicas antes de ganar receptores para LH.

El siguiente paso es la transformación de las células progenitoras en células Leydig adultas. La diferencia más destacada entre estas células es el cambio de forma, de alargadas a poligonales. Esta diferenciación es acompañada por movimientos en dirección al centro del intersticio, además, estas son más pequeñas que las células Leydig adultas inmaduras y maduras. Las nuevas células de Leydig formadas no contienen deshidrogenasa-1 (11β -HSD1), cuando las células de Leydig adultas se acaban de diferenciar tan solo secretan el 40% de testosterona en comparación con las que ya están bien diferenciadas. En comparación con las células maduras e inmaduras cuentan con una gran capacidad de secretar androstenediona en etapa postnatal^{8,9}.

El tamaño de las nuevas células formadas se incrementa, al ir adquiriendo más citoplasma; con la diferenciación a células de Leydig adultas inmaduras. Su diferenciación es clara porque el citoplasma se llena de gotas de lípidos. El número total de gotas de lípidos así como también el tamaño individual de estos lípidos en las células de Leydig adultas inmaduras post-natales parecen ser más pequeñas que en las células de Leydig adultas inmaduras fetales^{8,9}.

Estas células son el tipo dominante del linaje de las células Leydig de la etapa postnatal, las nuevas células de Leydig adultas inmaduras son positivas para la enzima 11β -HSD1. Sin embargo la actividad de la 17β -HSD, permanece baja en etapa postnatal, como resultado la habilidad de las células de Leydig adultas inmaduras de producir testosterona es más baja en comparación con las células de Leydig adultas maduras^{8,9}.

El paso final en el desarrollo de las células de Leydig, es la transformación de las células de Leydig adultas inmaduras a maduras. Esta transición se caracteriza por un incremento en el tamaño de la célula y la desaparición de las gotas lipídicas del citoplasma. La capacidad de secretar testosterona se incrementa significativamente, porque, adquieren más organelos los

cuales son necesarios para la producción de esteroides y aumenta la sensibilidad a la LH en circulación, esto es debido a la adquisición de un gran número de receptores. Con el incremento en el volumen de los organelos tales como retículo endoplásmico liso, las células ganan más actividad de las enzimas esteroidogénicas, particularmente 17β -HSD, que catalizan el último paso de la síntesis de testosterona (figura 6)^{8,9}.

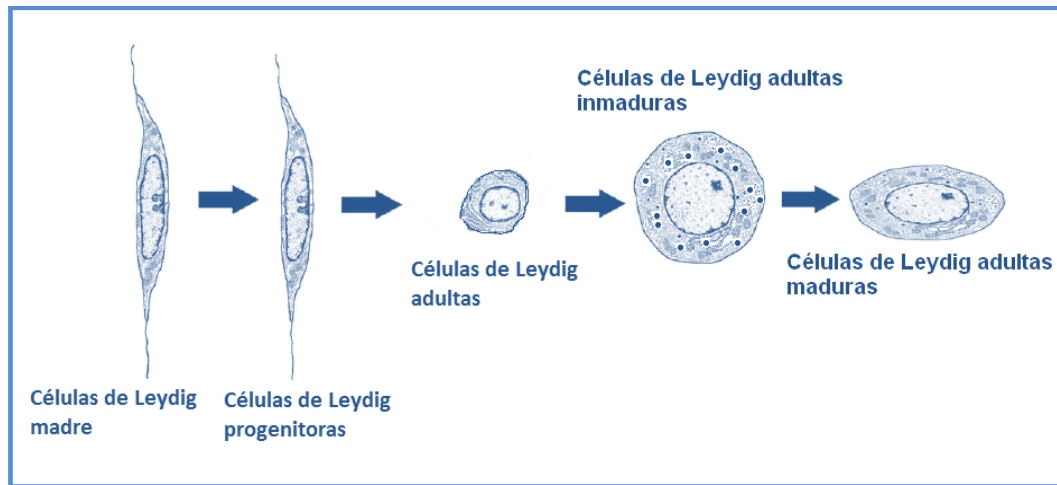


Figura 6: Diferenciación de células de Leydig

Esquema que muestra los tipos celulares durante la diferenciación de las células de Leydig⁸.

Proliferación de las células de Sertoli

La fertilidad masculina y el proceso de espermatogénesis dependen de los factores producidos por las células de Sertoli que son requeridos para el desarrollo de las células germinales^{10,11}. El número de células de Sertoli en el adulto está determinado por el tamaño de ambos testículos y la producción diaria de los espermatozoides, esto se debe a que cada célula de Sertoli tiene la capacidad para albergar determinado número de células germinales, sin embargo esta capacidad varía entre especies. El número de células de Sertoli está determinado antes de la edad adulta^{10,11,12}.

Las células de Sertoli proliferan, en todas las especies, durante tres etapas de la vida, en el periodo fetal, neonatal y en el periodo peripubertal (figura 7). Especies como la rata donde existe más datos sobre estas etapas de proliferación, se contraponen con el humano, ya que en el hombre estos periodos están separados por décadas y en la rata las etapas neonatales y

puberales se traslapan. Esto permite reconsiderar a la rata como modelo de estudio en este campo de investigación^{12,13}.



Figura 7: Proliferación de células de Sertoli

Esquema que muestra los periodos de proliferación de las células de Sertoli en diferentes especies¹².

Gonocitos

Se ha mencionado la migración de las células germinales primordiales desde las capas endodérmicas de la pared del saco vitelino hasta la invasión de las crestas genitales. Una vez ubicadas en la futura gónada dejan de migrar y reducen, aunque no desaparecen, la expresión de producción de la enzima fosfatasa alcalina y se diferencian a gonocitos.

Los gonocitos son células grandes, redondas con bordes definidos, con pocos organelos, aunque sus mitocondrias son evidentes y dispuestas alrededor del núcleo, con uno o dos nucléolos y se tiñen pálidas¹⁴. Este tipo celular sintetiza diversas proteínas que les permite mantenerse en estado pluripotente como OCT3/4¹⁵, fosfatasa alcalina, NANOG y AP2 γ ¹⁶. En etapas postnatales se diferencian a espermatogonias bajo la participación de factores producidos por las células de Sertoli como las moléculas de adhesión celular neuronal (NCAM, por sus siglas en inglés)¹⁷⁻²¹, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés)²²⁻²⁵, factor de células *stem* (SCF, por sus siglas en inglés)²⁶⁻²⁹ y

reducen la producción de las proteínas de pluripotencialidad antes mencionadas. Durante este proceso de diferenciación proliferan, aunque no siempre, y migran hasta la lámina basal. Todos estos procesos han sido descritos principalmente en la rata. Si por alguna razón esta maduración no se lleva a cabo, los gonocitos degeneran, es decir, solo existe esta ventana de tiempo para su diferenciación. Reiterando, sin esta maduración (que incluye la diferenciación a espermatogonias *stem*) se presenta degeneración y ya no se tendrán células que produzcan espermatozoides ³⁰, nunca más en la vida adulta, de estos desafortunados machos.

1.4 Testículo maduro

El testículo es el órgano central del aparato reproductor masculino. Sin embargo debe recordarse que todas las funciones testiculares están influenciadas por el sistema neuroendocrino. El testículo es responsable de la esteroidogénesis, principalmente de la producción de andrógenos, en las células de Leydig; y la generación de gametos haploides mediante la espermatogénesis en los túbulos seminíferos. Dentro de los túbulos seminíferos existen dos poblaciones celulares que son las células germinales que se transformarán a espermatozoides a partir de espermatogonias por el proceso ya mencionado denominado espermatogénesis; y las células de sostén denominadas células de Sertoli que son las células que proporcionan apoyo y nutrientes a las células germinales en desarrollo. Existen estrechos complejos de unión entre las células de Sertoli que son el principal componente de la barrera hematotesticular, que funcionalmente impide el paso de determinados componentes de la sangre y del líquido intersticial a un compartimento interno del túbulo seminífero denominado adluminal (ver descripción adelante) ⁵.

El testículo tiene un compartimento intersticial que contiene a las células de Leydig, que rodean a los túbulos seminíferos y vía parácrina y endócrina envían testosterona y estradiol a los tubos seminíferos ³¹.

El epitelio seminífero se encuentra dividido en dos compartimentos el basal y el adluminal delimitados por las uniones estrechas de las células de sostén (Sertoli), protegiendo así a las células que llevan al cabo la meiosis (espermatoцитos). En el compartimento basal se

ubican las espermatogonias que se dividen por mitosis y se localizan por debajo de las uniones estrechas³² (figura 8).

La función testicular normal y especialmente la espermatogénesis, dependen de la temperatura y requiere un medio con una temperatura inferior a la corporal. Por tanto los testículos normalmente se localizan fuera de la cavidad abdominal, en el escroto³².

1.4.1 Espermatogénesis

En la espermatogénesis se distinguen cuatro fases: a) proliferación mitótica o espermatocitogénesis, b) proliferación meiótica, c) diferenciación morfológica o espermiogénesis y d) espermiación.

a) Espermatocitogénesis. Esta es la fase inicial de la espermatogénesis, la proliferación de algunas de las espermatogonias A, que son células que ocupan la posición más periférica y basal en el epitelio seminífero. Como resultado de las divisiones mitóticas de estas espermatogonias, muchas se diferencian a un estado de maduración superior, originando las espermatogonias B. Estas células se desplazan de la membrana basal y dejan de dividirse mitoticamente, iniciando la meiosis y ahora son llamadas espermátocitos. Las espermatogonias restantes siguen dividiéndose por lo cual las reservas de estas espermatogonias en los tubos seminíferos no disminuyen.

b) La proliferación meiótica es la fase donde los espermátocitos primarios y secundarios dan origen a las espermátidas. Antes de iniciarse la meiosis durante la fase S de su ciclo celular, su cantidad de DNA se ha duplicado (ha pasado de $2n$ a $4n$, estado tetraploide). Durante la primera división meiótica cada par de cromosomas homólogos duplicados emigra a uno de los polos para que después de la división queden dos células diploides ($2n$). Con la segunda división meiótica se obtienen cuatro células hijas haploides (n), cada una con la mitad de cromosomas que la célula madre o inicial. Este tipo de división reduccional sólo se presenta en las células germinales, y es necesario para evitar que el número de cromosomas se vaya duplicando en cada generación, además de que este tipo de división permite la recombinación genética. Estas divisiones son muy rápidas, se inician con la madurez sexual y se repiten a expensas de nuevas espermatogonias que se van diferenciando en los túbulos seminíferos hasta edad muy avanzada^{33,34}.

c) En la fase de la espermiogénesis, las espermátidas mediante un proceso de diferenciación morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular, forman los espermatozoides. Este es progresivo, inicia con la formación del gránulo acrosómico. Este gránulo se forma a partir de la fusión de uno a cuatro gránulos pequeños que se llaman gránulos proacrosómicos que aparecen en la zona del aparato de Golgi. Al mismo tiempo un filamento fino emerge del centriolo distal para dar origen a las estructuras del flagelo. A continuación el gránulo acrosómico se aplanan cerca del núcleo y su membrana (vesícula acrosómica) se extiende sobre la superficie del núcleo, formando una capucha que sigue creciendo hasta alcanzar su máximo tamaño y se convierte en el acrosoma característico de cada especie. El centriolo proximal que no participa en la organización del flagelo, se adhiere a la zona posterior del núcleo y posteriormente migra hacia la región del cuello donde quedara almacenado para ser utilizado como centro organizador de los microtubulos en los primeros estadios del cigoto inmediatamente después de la fertilización. Por su parte el flagelo sigue creciendo a partir del centriolo distal. A partir de este momento se inicia el proceso en el que las espermátidas redondas empiezan a alargarse presentando un aplanamiento y la condensación del núcleo y el citoplasma. Las mitocondrias también migran a la región del cuello donde posteriormente se organizaran alrededor de la pieza principal del flagelo.

Algunos autores dividen para su estudio la espermiogénesis ya descrita en cuatro etapas: la etapa de Golgi, cuando se forma el granulo acrosómico; la etapa del capuchón cuando el granulo se extiende sobre el núcleo; la etapa del acrosoma cuando el granulo se transforma en esta estructura, migran los centriolos y las mitocondrias, y por último la etapa de maduración, cuando la espermátida elongada se convierte en espermatozoide³⁵⁻³⁷.

d) Fase de la espermiación o expulsión de los espermatozoides hacia la luz del epitelio seminífero, que están listos para abandonar la protección de las células sustentaculares. Este consiste en la expulsión de las espermátidas maduras hacia el lumen de los tubos seminíferos. Se ha propuesto que este proceso depende de la LH, probablemente como una homología a la ovulación³⁸.

Durante la espermatogénesis algunas espermatogonias y espermatoцитos entran en apoptosis o muerte celular programada como un proceso de selección natural³⁹.

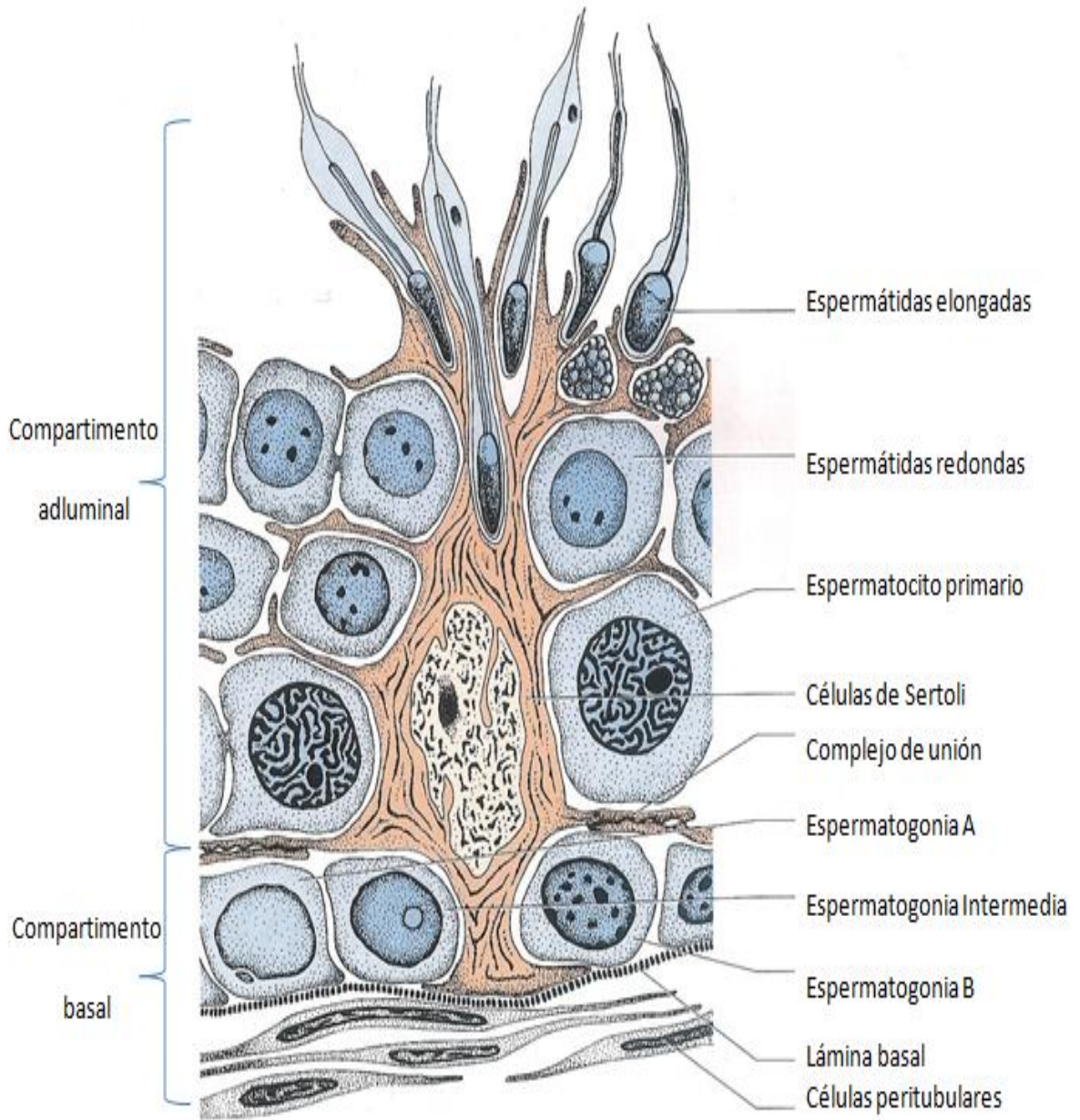


Figura 8: Epitelio Seminífero

Epitelio seminífero en donde se muestra a las células germinales en diferentes fases de desarrollo y las células de Sertoli que dan soporte³.

1.5 Ki-67

En el contenido de esta introducción se ha descrito a cerca de la importancia que tienen la proliferación y maduración de células básicas para el establecimiento de la fertilidad en machos. Como parte de monitoreo a esta actividad se usó en la parte practica, en las inmunohistoquímicas el anticuerpo Ki-67⁴⁰.

Ki-67 (MKI67) es un proteína nuclear grande que se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M fases), pero está ausente en las células en reposo (G0). Se usa como marcador celular para la proliferación. Se asocia estrechamente a la proliferación celular. Durante la interfase, el antígeno Ki-67 puede ser detectado exclusivamente en el núcleo de la célula, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. Ki-67 es un excelente marcador para determinar la fracción de crecimiento de una población celular determinada. La fracción de Ki-67 positiva a las células tumorales (índice de marcaje) se correlaciona con la evolución clínica del cáncer. Los ejemplos estudiados en este contexto son los carcinomas de próstata, de cerebro y de glándula mamaria. Para estos tipos de tumores, el valor pronóstico para la supervivencia y la recurrencia del tumor han sido repetidamente demostrado en análisis uni y multivariados⁴⁰.

1.6 Regulación hormonal: Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

El aparato reproductor del macho está regulado por sistemas de retroalimentación donde participan el hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y los testículos.

El hipotálamo sintetiza y secreta de forma pulsátil la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que actúa sobre las células gonadotrópicas de la adenohipófisis. Estas células estimuladas por la GnRH, sintetizan y secretan dos gonadotropinas: la hormona folículo estimulante (FSH) y la LH. Ambas son glicoproteínas heterodímeras formadas por dos péptidos unidos mediante enlaces no covalentes. Cada célula gonadotropa tiene la capacidad para sintetizar FSH, LH o ambas. Su liberación depende de los patrones pulsátiles de secreción de GnRH. Pulsos irregulares y pequeña amplitud resultan en la liberación de FSH, mientras que pulsos de alta frecuencia inducen la liberación de LH⁵.

Dentro del testículo la LH se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y estimula en ellos la conversión del colesterol en testosterona. Una vez sintetizados, los andrógenos se difunden a sangre, donde se unen a las proteínas transportadoras de andrógenos (ABP), que se producen en las células de Sertoli. Altas concentraciones locales de andrógenos dentro del testículo se consideran esenciales para que la espermiogénesis pueda darse con normalidad. Las ABP potencian la acumulación de altas concentraciones de testosterona y de dihidrotestosterona dentro de los túbulos seminíferos y en el intersticio de los testículos. Dentro de estos, las células diana de la testosterona son las células mioideas peritubulares y las células de Sertoli, que envuelven y soportan a las células espermáticas en desarrollo. Se sabe que la FSH tiene receptores específicos en las células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos. La FSH y la testosterona estimulan ciertas funciones de las células de Sertoli, algunos ejemplos son la síntesis y liberación de las ABP, la inhibina, activina, estrógenos, ceruloplasmina, transferrina, factores de crecimiento, entre otros, que están implicados en la transferencia de los factores necesarios a las células germinales para llevar a cabo la meiosis, la maduración de los espermatozoides y la espermiación^{5,32,41}. La producción de esteroides por las células de Leydig puede inhibirse por un producto sintetizado y liberado por las células de Sertoli. Esta sustancia es la inhibina; la cual en trabajo conjunto con la testosterona están implicadas en el sistema de retroalimentación de la función hipofisiaria.

Los esteroides gonadales suprimen la liberación de LH; sin embargo la inhibina es el inhibidor más potente de la secreción de FSH. La testosterona, la dihidrotestosterona y los estrógenos regulan la síntesis y liberación de LH a través de una retroalimentación negativa ejercida a nivel del hipotálamo o del lóbulo anterior de la hipófisis^{5,32} (Figura 9).

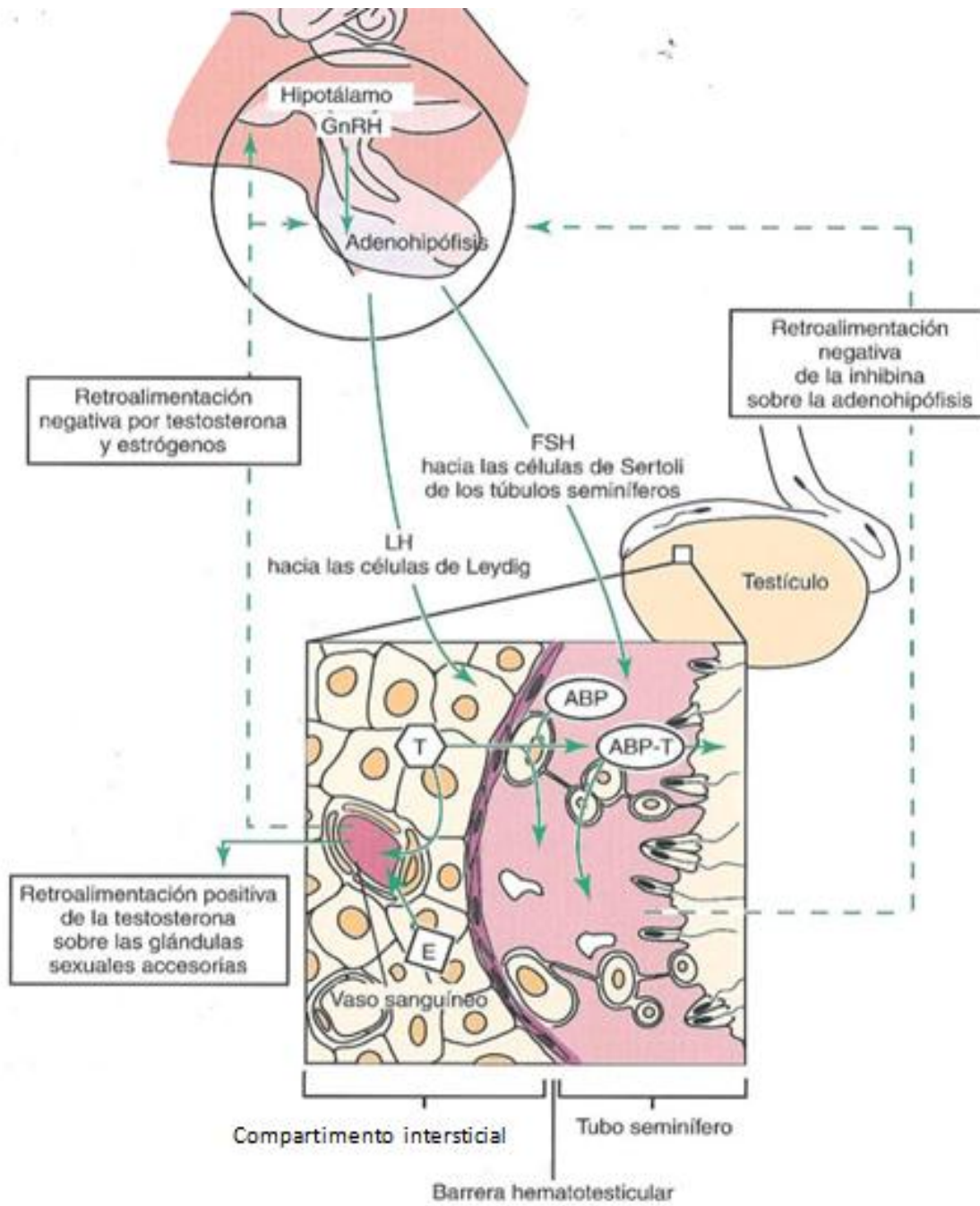


Figura 9: Eje hipotálamo – hipófisis – testículo⁵.

1.7 Modelos Animales en la Investigación.

Prácticamente todos los avances médicos importantes relacionados con la salud de los seres humanos y de los animales, se han logrado a través de la investigación biomédica con modelos animales. Además, la investigación basada en animales ha sido un componente esencial de todos los campos de la investigación médica e indispensable en el proceso de generación de conocimientos básicos en la biología. Las aportaciones de estos descubrimientos realizados en los últimos años han impactado positivamente la calidad de vida de los seres humanos y de los mismos animales que también han recibido el beneficio de los resultados de la investigación biomédica, por ejemplo, incrementando en años la expectativa de vida o bien dando tratamientos eficientes contra enfermedades degenerativas ya sea para los seres humanos o incluso a los propios animales.

Para iniciar el estudio de cualquier patología siempre se debe partir de un modelo animal experimental, sistema que debe ser apropiadamente examinado por métodos científicos que nos proporcione información sobre mecanismos fisiológicos normales, además tener la morfología descrita con el fin de que se puedan hacer analogías con el ser humano. Este periodo de la investigación se le conoce como investigación básica, que es la etapa durante la cual se analizan características básicas morfológicas⁴¹.

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) es un modelo animal útil para una gran variedad de áreas en la investigación biomédica como la fecundación in vitro⁴³, la embriología^{44,45}, neurofisiología⁴⁶, oftalmología⁴⁷, inmunología^{48,49} e investigación cardiovascular⁵⁰. El conejo también se utiliza como modelo para estudios de toxicologías reproductivas, para el análisis de los efectos de fármacos/sustancias sobre el embrión^{51,52} y el desarrollo fetal⁵³. Además son valiosos modelos animales, específicamente para el estudio de toxicologías y patologías reproductivas masculina^{54,55}.

Varios autores enlistan múltiples ventajas para considerar usar al conejo en lugar de los roedores, que son estos últimos en los cuales se ha prestado considerable atención en estudios de toxicidad reproductiva y poco se sabe en especies como los conejos⁵⁵. El presente trabajo está enfocado en la descripción morfológica y cronológica de las células testiculares postnatales presentes en el testículo del conejo con la finalidad de que se considere como base para estudios de patologías específicas, por ejemplo, el cáncer

testicular, rastreo de disruptores endocrinos y otros síndromes que afectan al aparato reproductor masculino.

También es importante tener en cuenta que los conejos tienen una infancia relativamente larga (etapa de reposo) en su periodo de desarrollo reproductivo, similar a la del ser humano (ver figura 10 - gráficos comparativos 1).

Si hacemos comparaciones con las etapas reproductivas del conejo, el humano y de los roedores, observaremos que estas etapas, en los roedores, son muy cortas en tiempo y teóricamente se dice que las etapas neonatal y puberal están traslapadas; es precisamente la especie más utilizada y en la cual se han hecho mayor número de estudios de toxicidad reproductiva.

En otras especies como el conejo, el campo de investigación básica de la función reproductiva ha sido poco explorado; consideramos importante reiterar que en los conejos existen pocos estudios de toxicidad reproductiva.

La raza de conejos Chinchilla estándar ofrece algunas ventajas sobre la raza Nueva Zelanda. Su menor tamaño (Chinchilla: 2.4 kg a 2.6 kg; Nueva Zelanda: 3.2 kg a 3.8 kg, gr) (ver figura 11- gráfico comparativo 2) que facilita el manejo, tienen menor consumo de alimento y nos proporciona más espacio de jaula para manejar poblaciones más numerosas; lo que nos reduce costos de mantenimiento.

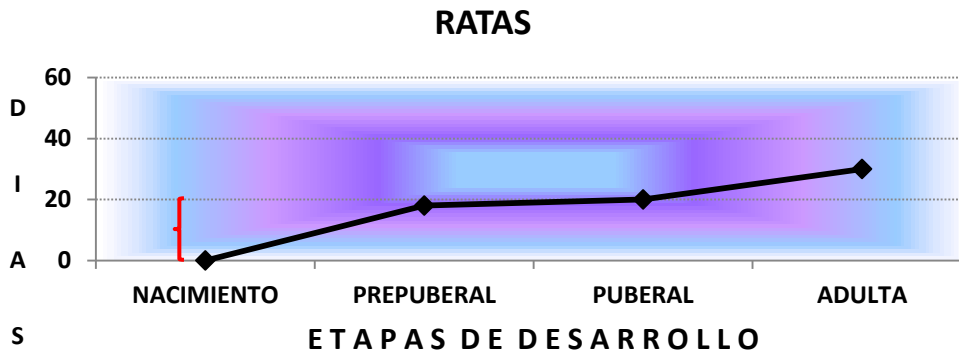
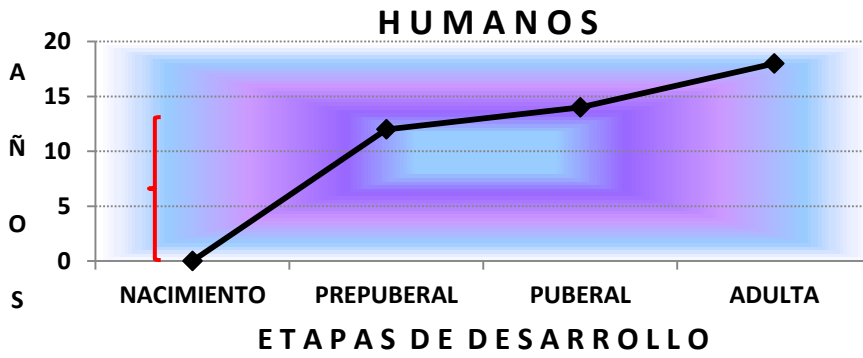
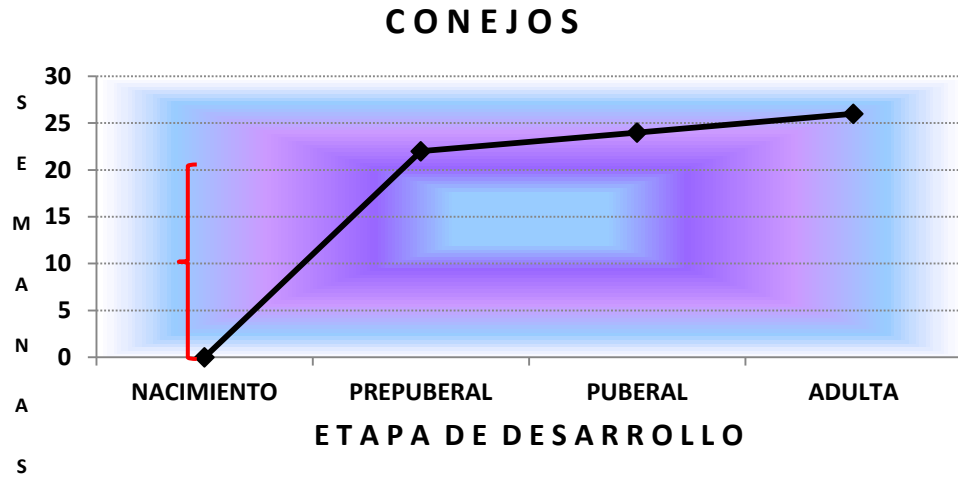


Figura 10 - Gráficos Comparativos 1: Comparación de etapas reproductivas de humanos, conejos y ratas.

Comparación de gráficos donde se muestran etapas de crecimiento y reproductivas (desde el nacimiento, prepuberal, puberal y adulta como sinónimo de madurez sexual), siendo claro que en el conejo y el humano la etapa de quiescencia entre el nacimiento y la prepuberal es amplia y no se empalma en tiempo como en el caso de las ratas.

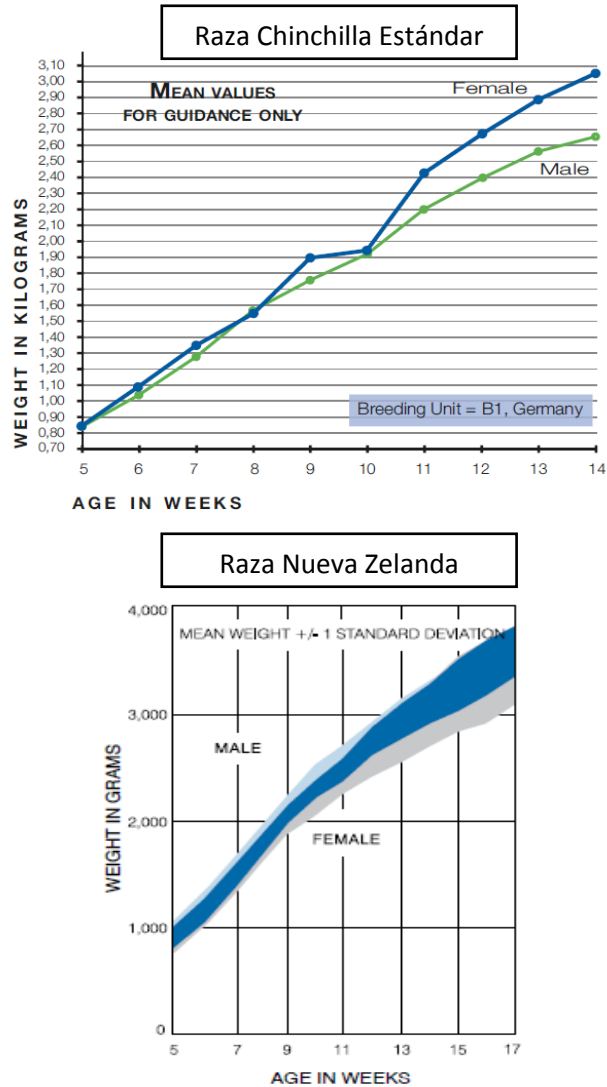


Figura 11 - Gráficos Comparativos 2: Comparación de gráficas de crecimiento de raza Chinchilla vs Nueva Zelanda.

Comparación de las curvas de crecimiento de la raza Chinchilla contra la raza Nueva Zelanda. Importante resaltar las diferencias de peso y tiempo, en que alcanzan sus máximos parámetros de crecimiento⁵⁶.

2.0 JUSTIFICACIÓN

No existen reportes que describan el desarrollo de células testiculares postnatales en el conejo Chinchilla que puede ser empleado para estudios en el campo de la biología reproductiva, además este trabajo contribuye al conocimiento de la biología reproductiva de esta raza. Considerando que nos ofrece ventajas sobre la raza Nueva Zelanda, que como sabemos es la raza más usada en los modelos animales de experimentación; existen reportes de que los machos de esta raza, la Nueva Zelanda, tienen gran predisposición a padecer *diabetes mellitus* espontánea y obesidad. Estas patologías se contraponen en varios aspectos de la fisiología reproductiva normal y por lo tanto, la presencia y/o aparición de una u otra de estas enfermedades, nos dificultarían la realización de pruebas de fertilidad, perfiles endocrinos (testosterona), habilidad de apareamiento y calidad seminal.

3.0 OBJETIVO GENERAL

Describir el desarrollo del epitelio seminífero en el testículo postnatal del conejo Chinchilla.

3.1 Objetivos Particulares

- Describir el desarrollo morfológico e histomorfométrico de los túbulos seminíferos y sus componentes celulares en el testículo del conejo Chinchilla.
- Estimar el índice de proliferación celular del epitelio seminífero del conejo Chinchilla en desarrollo.
- Determinar el momento en que los gonocitos migran hacia la lámina basal, y adquieren características morfológicas de espermatogonias.

4.0 MATERIAL Y METODOS

4.1 Animales

Se emplearon 30 conejos macho (*Oryctolagus cuniculus*) raza Chinchilla estándar, sin manipulación experimental clínicamente sanos con un estado microbiológico convencional; donados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El manejo y traslado de los animales se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-

1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Además siguiendo al pie de la letra los reglamentos internos de principios de ética y trato a los animales del Instituto Nacional de Pediatría.

Se estudiaron 3 conejos para cada edad: 3, 6, 10, 20, 35, 50, 60, 70, 80 y 100 días post parto (dpp). En el caso de las hembras gestantes para obtener las crías antes del destete (hasta 35 dpp), estas se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable individuales (90 cm x 60 cm x 40 cm de altura), en ciclos de 12 horas luz – 12 horas oscuridad. Temperatura ambiente entre 17 a 24 °C. Agua y alimento en pellets (conejina, Purina, México) a libre acceso. Para construir nidos, se proporcionaron cajas de madera (40 cm x 35 cm x 15 cm de altura), abiertas por la parte superior y rellenas de viruta de madera, 3 días antes del término de la gestación.

Una vez destetados, a partir del 40 dpp se colocaron dos hermanos de camada en cajas de acero inoxidable (50cm x 60 cm x 40 cm de altura), donde las condiciones medio ambientales se mantuvieron, como las ya mencionadas.

4.2 Procedimiento para recopilación de datos estadísticos

Cada uno de los conejos que forma parte de este estudio fue pesado individualmente; de la misma forma una vez que se obtuvieron quirúrgicamente los testículos fueron pesados cada uno por separado. Esto con la finalidad de obtener tablas y gráficas de peso corporal, testicular y relación de peso testicular, respecto al corporal.

4.3 Procedimiento para obtener tejido testicular.

El procedimiento utilizado para las edades de: 3, 6, 10 y 20 dpp, consistió en iniciar con el sacrificio humanitario por una sobre dosis de pentobarbital sódico (IP 60 mg/kg; Pfizer) y extraer quirúrgicamente los testículos.

El procedimiento utilizado en los conejos de edades: 35, 50, 60, 70, 80 y 100 dpp fue obtener los testículos a través de la técnica quirúrgica de castración. Iniciando con inducción de la anestesia (IP ketamina 45 mg/kg), previa sedación (IP xilacina 10 mg/kg).

Continuamos con antisepsia de la región abdominal e inguinal para realizar cortes en la piel escrotal (ambos lados) paralelos al pene, teniendo cuidado de no afectar túnica vaginal. Se desprendió el testículo del escroto conservando integra la túnica vaginal, que está

firmemente adherida al tejido subcutáneo. Se hizo una disección cuidadosa y delicada. Al final del escroto la túnica vaginal está fuertemente unida por el ligamento de la cola del epidídimo, el cual se debió desgarrar para poder exteriorizar el testículo.

Una vez que el testículo se extrajo del escroto se fraccionó caudalmente, para exponer las fascias que lo recubren, de tal manera que quedó perfectamente visible la parte más estrecha del cordón, con la finalidad de retirar el testículo (importante no exteriorizar excesivamente ya que se puede dañar el uréter). Colocamos en el cordón dos o tres ligaduras y pinza de hemostasis. Finalmente suturamos la piel con intradérmicas de nudos ocultos⁵⁷.

Estos conejos se donaron para abasto, previa recuperación con administración de analgésico (dipirona, IM 25 mg/kg) y antibióticos (amikacina, IM 10 mg/kg) durante 5 días.

4.4 Procesamiento del tejido testicular para su estudio morfológico e histomorfométrico

Una vez obtenidos los testículos se lavaron y se pesaron. El testículo derecho de cada animal se fijo en Karnovsky modificado por 24 horas. Posteriormente hicimos lavados con buffer de Cacodilatos de sodio al 0.1 M, durante 2 horas. Para la postfijación del tejido se colocaron en Tetróxido de Osmio al 1% (Zelterquist), durante 1 hora. La deshidratación de la muestra se procesó con pases sucesivos de alcoholes a partir de 60%, 70%, 80%, 90%, 96% hasta llegar a alcohol absoluto, durante 10 a 15 minutos en cada uno. Para iniciar el proceso de inclusión de la resina, a las muestras se le realizaron dos lavados con óxido de propileno, de 20 minutos cada lavado; y se continuó con diluciones de la resina epon, en el óxido de propileno, hasta llegar a la inclusión de las muestras en la resina pura e incubarlas en estufa a 60 °C.

Posteriormente se obtuvieron cortes semifinos de epon de 1 µm de grosor, cortados con un ultramicrotomo Leica modelo Ultracut-UCT y teñidos con azul de toluidina al 5% (SIGMA, México), montados en un portaobjetos. El análisis histomorfométrico se realizó utilizando un microscopio óptico OLIMPUS BX 51. Por cada animal se observaron de 15 a 20 secciones transversales de tubos seminíferos.

Las áreas de los cordones y/o tubos seminíferos se obtuvieron con un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 5.1, USA) evaluando únicamente cortes transversales.

4.5 Procesamiento del tejido testicular para estudio de proliferación

Para este proceso utilizamos el testículo izquierdo, el cual también se lavó y pesó. Posteriormente este testículo fue fijado en paraformaldehído al 4% (SIGMA, México), durante 18 horas. Se hicieron lavados de PBS y se colocaron las muestras en el histoquinet, con la finalidad de incluirlas en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 μm que se montaron en laminillas cubiertas con adhesivo.

Una vez montadas se desparafinaron en estufa a 60 °C durante 30 minutos. Continuamos con dos lavados de xilol, de 5 minutos cada uno, después pasos sucesivos en OH/Xilol, OH100%, OH96%, OH70% y agua destilada por 5 minutos en cada lavado.

Se realizó el desenmascaramiento de los epítopes colocando las muestras en Citrato de Sodio al 0.01 M a pH 6 durante 15 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con H_2O_2 al 1% en metanol durante 30 minutos. Se continuó con lavados en agua destilada. Las laminillas fueron incubadas en solución de Twin 20 al 0.1%, se bloquearon con albumina sérica bovina al 1% (Amersham Biosciences, Buckingham, UK) en PBS durante 2 horas posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, Clone MIB-5, (Dako) (24 horas), proteína nuclear que se expresa en las fases activas del ciclo celular. Posteriormente se lavo con PBS y se incubo con el anticuerpo secundario (biotinilado) durante 2 horas. Las laminillas fueron lavadas en PBS y reveladas con diaminobencidina (Dako, USA) durante 3 minutos haciendo evidente los sitios de unión al anticuerpo. Por último fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas, aclaradas y montadas. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Para cada edad existen 3 animales y se realizaron 2 laminillas de inmunohistoquímica para cada animal, es decir, 6 laminillas de inmunohistoquímica por edad. Se rastrearon las laminillas de inmunohistoquímicas hasta completar 20 a 30 cortes transversales de cordones/tubos seminíferos para cada edad.

Para determinar el porcentaje de tubos / cordones con presencia de células positivas al Ki-67 (inmunoreactividad), se contaron todos los cordones/tubos en corte transversal de las 6 laminillas de inmunohistoquímica existentes para cada edad y se especificó si el cordón contenía o no células positivas al Ki-67; se expresaron resultados en porcentaje.

El índice de proliferación lo determinamos contando células positivas dentro de cada cordón/tubo, al anticuerpo Ki-67, respecto al total de células dentro de cada cordón / tubo, cortado transversalmente. En este caso se rastrearon las dos laminillas de inmunohistoquímica existentes para cada animal, hasta completar 20 a 30 cordones/tubos en corte transversal.

5.0 RESULTADOS

5.1 Descripción Morfológica, Índice de Proliferación Celular e Inmunoreactividad

❖ 3dpp

A esta edad aún se observó el estroma separando los cordones seminíferos, mostrando un desarrollo lento en la formación de los cordones seminíferos (figura 12 A). El peso corporal (tabla 1 y gráfica 1) a esta edad fue de 59.90 ± 1.85 gr; un peso testicular (tabla 2 y gráfica 2) de $11.47 \text{ mg} \pm 1.23$; así que la relación testículo-peso corporal fue reducida 0.01% (tabla 3 y gráfica 3); el área de los cordones seminíferos fue de $5041 \pm 160 \mu^2$ (tabla 4 y gráfica 4).

Los conejos a esta edad aún no tenían los testículos escrotados.

Dentro de los cordones fue evidente la presencia de los gonocitos como células grandes, pálidas con uno o dos nucléolos. Sus mitocondrias se encontraron dispuestas en “media luna” alrededor del núcleo. Los gonocitos se ubicaron tanto en el centro del cordón, como en la base de estos. Las figuras mitóticas fueron abundantes así como la degeneración celular (figura 12 B).

Con respecto a los núcleos de las células de Sertoli, estos se ubicaron en el centro del cordón y/o en contacto con la lámina basal. Los cordones se observaron rodeados por células peritubulares en forma de huso en varias capas. En el espacio intertubular se apreció

un tejido laxo con células semejantes, en forma, a los fibroblastos y algunas, aparentemente células de Leydig (Figura 12 B). Se observaron algunas células germinales fuera de los cordones y el cordón rodeado por 4 capas de células en forma de huso (Figura 12 B).

El $65.37\% \pm 7.04$ de los cordones mostró proliferación celular (tabla 6, gráfica 6 y figura 16 A).

El índice de proliferación, fue de 8.06 ± 0.74 . Esta se presentó en las células germinales y de Sertoli (tabla 5, gráfica 5 y figura 16 A).

❖ 6 dpp

El peso corporal (tabla 1 y gráfica 1) fue de 81.40 ± 7.05 g; con un peso testicular (tabla 2 y gráfica 2) de $18.8 \text{ mg} \pm 0.89$; con una relación testículo-peso corporal de 0.02% (tabla 3 y gráfica 3). El área de los cordones fue de $3782 \mu^2 \pm 164$ (tabla 4 y gráfica 4).

Los gonocitos y los núcleos de las células de Sertoli se dispusieron en el centro del cordón y en la periferia. Los gonocitos mostraron una gran degeneración y en algunos casos se observaron formando sincicios celulares (Figura 12 C). Se observó una reducción en la cantidad de capas que rodean a los cordones seminíferos, presentándose 3 capas (figura 12 D).

El $49.43\% \pm 11.7$ de los cordones mostró proliferación celular (tabla 6, gráfica 6 y figura 16 B).

El índice de proliferación, fue de 14.19 ± 1.18 . Esta se presentó en las células germinales y de Sertoli (tabla 5, gráfica 5 y figura 16 B).

❖ 10 dpp

El peso corporal (tabla 1 y gráfica 1) fue de $163.00 \text{ gr} \pm 7.95$ y el peso testicular de $29.20 \text{ mg} \pm 1.31$ (tabla 2 y gráfica 2); con una relación testículo-peso corporal de 0.01% (tabla 3 y gráfica 3) y el área de los cordones fue de $3593 \mu^2 \pm 102$ (tabla 4 y gráfica 4).

Los gonocitos conservaron la disposición de mitocondrias en media luna alrededor del núcleo. Escasos gonocitos se observaron proliferando. El citoplasma de las células de Sertoli se observó vacuolado, al parecer formando fagosomas degradando a los gonocitos en degeneración que aún se observaron, sobre todo los que están en el centro del cordón, que al no migrar degeneraron (Figura 12 E). En esta edad los gonocitos mas centrales se observaron enviando proyecciones citoplásmicas hacia la membrana basal.

Las células de Leydig mostraron gran cantidad de gotas lipídicas. Los núcleos de las células de Sertoli se presentaron, en su mayor parte hacia la periferia. Cada cordón estuvo cubierto por 3 capas celulares (Figura 12 F).

La proliferación se presentó en las células germinales y de Sertoli.

El $43.77\% \pm 12$ de los cordones seminíferos mostraron células en proliferación (tabla 6, gráfica 6 y figura 16 C). Índice de proliferación de 12.56 (tabla 5, gráfica 5 y figura 16 C).

❖ 20 dpp

La relación testículo-peso corporal fue de 0.13 % (tabla 3 y gráfica 3) con un peso corporal de $292.17 \text{ gr} \pm 8.78$ (tabla 1 y gráfica 1) y un peso testicular de $0.03 \text{ mg} \pm 1.14$ (tabla 2 y gráfica 2). Área de los cordones fue de $2882 \mu^2 \pm 45.5$ (tabla 4 y gráfica 4). Los gonocitos redujeron a casi nula su proliferación y continúan enviando prolongaciones citoplásmicas hacia la membrana basal (Figura 13 A y B), la degeneración de gonocitos también se redujo. Las células de Leydig continuaron observándose con gotas lipídicas. Cada cordón se observó cubierto por 2 capas de células mioides (Figura 13 A).

La proliferación se presentó en las células germinales y de Sertoli.

El $30.84\% \pm 2.49$ de los cordones seminíferos mostraron células en proliferación (tabla 6, gráfica 6 y figura 16 D). Índice de proliferación de 7.39 (tabla 5, gráfica 5 y figura 16 D).

❖ 35 dpp

La relación testículo-peso corporal fue de 0.01 % (tabla 3 y gráfica 3), con un peso corporal de $737.56 \text{ gr} \pm 32.3$ (tabla 1 y gráfica 1) y peso testicular de $91.6 \text{ mg} \pm 1.3$ (tabla 2 y gráfica 2). Área de los cordones fue de $2970 \mu^2 \pm 61$ (tabla 4 y gráfica 4). Los cordones seminíferos se apreciaron rodeados con una sola capa de células mioides (figura 13 C). Los gonocitos estuvieron ubicados algunos aún en el centro del cordón y otros en contacto con la lámina basal. Se apreció que los gonocitos aún en contacto con lámina basal llegan a degenerar. La disposición de mitocondrias ya no se observó en “media luna”, si no rodeando completamente al núcleo celular (Figura 13 C y D). Las células de Leydig se observaron con gotas lipídicas (Figura 13 D).

La proliferación se presentó en las células germinales y de Sertoli.

El $19.84\% \pm 2.57$ de los cordones seminíferos mostraron células en proliferación (tabla 6 y gráfica 6). Índice de proliferación de 6.78 ± 0.62 (tabla 5 y gráfica 5).

❖ 50 dpp

El peso testicular fue de $0.192 \text{ mg} \pm 2.41$ (tabla 2 y gráfica 2), y el peso corporal de $1190.70 \text{ gr} \pm 8.25$ (tabla 1 y gráfica 1); con una relación testículo-peso corporal de 0.01% (tabla 3 y gráfica 3). El área de los cordones fue de $3349 \mu^2 \pm 134$ (tabla 4 y gráfica 4). Los testículos ya se observaron descendidos completamente, con un escroto flácido y delgado. Se conservó la morfología similar a la de los animales de 35 dpp. Células de Leydig maduras y escasas inmaduras. A esta edad empezó la diferenciación del gonocito a espermatogonia y observamos a las espermatogonias en contacto con la lámina basal. Se muestran en las figuras 13 E y F, también se muestra el monitoreo de avance cronológico del gonocito, desde el centro del cordón hacia la lámina basal (figuras 13 E, F). No existió proliferación celular; por lo tanto los cordones seminíferos se mostraron sin inmunoreactividad y sin índice de proliferación (tabla 6 y 5 gráfica 6 y 5, figura 17 A).

❖ 60 dpp

La relación testículo-peso corporal fue de 0.02% (tabla 3 y gráfica 3) con un peso corporal de $1421.66 \text{ gr} \pm 78.8$ (tabla 1 y gráfica 1) y peso testicular de $290.5 \text{ mg} \pm 49.5$ (tabla 2 y gráfica 2). El área de los cordones fue de $3386 \mu^2 \pm 95.7$ (tabla 4 y gráfica 4) observándose un claro incremento. Se observó gran degeneración de células ubicadas en la parte central de los cordones, probablemente gonocitos que no se diferenciaron, los núcleos de las células de Sertoli se ubicaron, en gran parte, hacia la periferia, aunque todavía observamos algunos centrales (Figura 14 A); también identificamos espermatogonias de recién diferenciación (Figura 14 B). Las células de Leydig se presentaron como inmaduras (vacuoladas) y maduras, identificadas por la ausencia de vacuolas. Los gonocitos que aun no se encontraron en contacto con la lámina basal, degeneraron. Las células mioides las observamos en forma más cilíndrica.

La proliferación se presentó en las células germinales y también en las células de Sertoli, aunque muy disminuida, en estas últimas.

El $36.92 \% \pm 1$ de los cordones seminíferos mostraron células en proliferación (tabla 6 y gráfica 6, figura 17 B). Índice de proliferación de 8.35 ± 0.90 (tabla 5 y gráfica 5, figura 17 B).

❖ 70 dpp

La relación testículo-peso corporal fue de 0.02% (tabla 3 y gráfica 3) con un peso corporal de 1683.33 gr \pm 20.3 (tabla 1 y gráfica 1) y peso testicular de 364.3 mg \pm 28.5 (tabla 2 y gráfica 2) y el área de los cordones fue de 4861 $\mu^2 \pm$ 184 (tabla 4 y gráfica 4). Todavía se observó degeneración en gonocitos ubicados en la parte central y, algunos gonocitos en proceso de diferenciación a espermatogonia. Las espermatogonias ya diferenciadas proliferan y se diferencian en otros tipos de espermatogonias (Figura 14 C, D). Las células de Leydig completaron su maduración. Se comenzaron a formar pequeños espacios en la parte central de los cordones. Los gonocitos continuaron migrando. Se observó mayor cantidad de espermatogonias (Figura 14 C, D). Los núcleos de las células mioides se observaron aún más alargados.

La proliferación se presentó en las células germinales y dejó de ser evidente para las células de Sertoli.

El 66.17 % \pm 3.39 de los cordones seminíferos mostraron células en proliferación (tabla 6 y gráfica 6, figura 17 C). Índice de proliferación de 26.7 \pm 1.85 (tabla 5 y gráfica 5, figura 17 C).

❖ 80 dpp

La relación testículo-peso corporal fue de 0.03% (tabla 3 y gráfica 3) con un peso corporal de 2353.00 gr \pm 37.8 (tabla 1 gráfica 1); peso testicular de 883.6 mg \pm 60.5 (tabla 2 y gráfica 2) y el área de los cordones fue de 7829 $\mu^2 \pm$ 208 (tabla 4 y gráfica 4), es muy evidente el aumento en el área tubular, respecto a la edad anterior. Se apreció claramente la luz tubular. Algunos gonocitos continuaron con muerte celular. Los núcleos de las células de Sertoli en su mayoría organizados hacia la parte basal del túbulo seminífero. Empezaron a surgir los primeros espermatocitos (figura 14 E, F). Se observan células de Leydig maduras. Los núcleos de las células mioides se observaron más alargados, debido probablemente al aumento en el tamaño de los tubos seminíferos que iniciaron con la proliferación celular.

En núcleos de las células de Sertoli se apreciaron escotaduras que son características de la maduración de estas células (Figura 14 F).

Fue evidente el aumento en la proliferación de las células germinales, sin evidencias de proliferación de células de Sertoli.

El 100 % de los cordones seminíferos mostraron células en proliferación (tabla 6 y gráfica 6, figura 17 D). Índice de proliferación de 36.28 ± 1.41 (tabla 5 y gráfica 5, figura 17 D).

❖ 100 dpp

La relación testículo-peso corporal se aumento hasta el 0.05%, (tabla 3 y gráfica 3) con un peso corporal de $2562.50 \text{ gr} \pm 60.5$ (tabla 1 y gráfica 1), peso testicular de $1527.5 \text{ mg} \pm 215$ (tabla 2 y gráfica 2) y el área de los cordones fue de $21490 \mu^2 \pm 610$ (tabla 4 y gráfica 4), evidentemente incrementada. Se observó un claro aumento en la luz tubular, número de células germinales y degeneración celular (figura 15 A). Es clara la actividad proliferativa desde espermatogonias, espermátocitos hasta espermátidas redondas y elongadas; las espermátidas elongadas en proceso de maduración (figura 15 B). Se logró diferenciar los diferentes tipos de espermatogonias y las metafases que dan origen a las espermátidas y de manera opuesta gran degeneración de espermátocitos, seguramente como un proceso de selección celular (figura 15 D).

Es clara la ausencia total de los gonocitos pues al parecer todo gonocito que no migró a lámina basal degeneró.

También se observaron alteraciones histológicas como hipoplasia de células germinales, degeneración de espermátocitos, de espermátidas y vacuolización de células germinales y formación de sinsicios de espermátidas (figura 15 A, C y D).

El 100 % de los cordones seminíferos mostraron células en proliferación (tabla 6 y gráfica 6, figura 17 E). Índice de proliferación de 68.11 ± 1.17 (tabla 5 y gráfica 5, figura 17 E).

5.2 Ciclos del Epitelio Seminífero

Dentro del epitelio seminífero existen sucesión de asociaciones celulares y se van produciendo cambios en áreas determinadas y en apariencias celulares de una misma asociación, a esto se le denomina el Ciclo del Epitelio Seminífero.

Para el conejo están reportadas 8 etapas del Ciclo del Epitelio Seminífero. En los cortes semifinos realizados para esta tesis se encontraron siete etapas. A continuación se describe lo encontrado, con base en lo reportado por Swierstra y Foote (1963)⁵⁸:

Etapa 1. Las células de Sertoli y espermatogonias tipo A estuvieron presentes a lo largo de la membrana basal. Las espermatogonias tipo A, eran ovaladas a redondas con cromatina nuclear fina ("similares a polvo") y su membrana nuclear fue fácilmente observada. Estuvieron presentes dos generaciones de espermatoцитos primarios, una generación "joven" a principio de la meiosis y una generación "madura", con meiosis más avanzadas. Los espermatoцитos primarios jóvenes se encontraron en la fase de preleptoteno ubicados cerca de la membrana basal, los espermatoцитos primarios "maduros" estuvieron en paquíteno y se encontraron más alejados de la membrana basal y más cerca del lumen tubular. En el comienzo de esta etapa, el núcleo de los espermatoцитos primarios jóvenes fue más redondo y con tinción más débil de su cromatina. La membrana nuclear, de estos espermatoцитos, que iban hacia leptoteno se hizo menos visible y la cromatina se empezó a marcar con más intensidad. Los espermatoцитos primarios viejos, tuvieron mayores núcleos en paquíteno. Las espermátidas tenían núcleos redondos con una membrana nuclear distinta, y fue evidente la coloración oscura del acrosoma, que cubría alrededor de la mitad de los núcleos (figura 18).

Etapa 2. El rasgo característico de esta etapa fue la elongación de los núcleos de las espermátidas. Al inicio, los núcleos eran ligeramente ovalados, y al final se habían alargado por completo. Dos generaciones de espermatoцитos primarios fueron evidentes. Ambas generaciones tenían membrana nuclear indistinta. La cromatina nuclear fue similar en ambas generaciones, como se describió para la etapa 1. Presencia de células de Sertoli y espermatogonias tipo A en la membrana basal. Se notó un incremento en el número de espermatogonias tipo A, en relación a la etapa 1 (figura 18).

Etapa 3. Las células de Sertoli y las espermatogonias de tipo A recubrieron la membrana basal. Una vez más dos generaciones de espermatoцитos primarios estuvieron presentes. Los núcleos de los espermatoцитos primarios jóvenes, fueron aún más pequeños, y el de los espermatoцитos primarios maduros se identificaron en fase de paquíteno. Las espermátidas ahora estuvieron más alargadas (figura 18).

Etapa 4. Espermatogonias tipo A, comenzaron a dividirse, y como resultado surgieron las espermatogonias intermedias, aunque todavía pudimos observar ambos tipos y por supuesto la presencia de las células de Sertoli a lo largo de la membrana basal. Las espermatogonias

intermedias tuvieron núcleos ovoides y su eje fue paralelo al de la membrana basal. La cromatina de los núcleos se tiñó en gránulos gruesos. Al inicio de esta etapa 4, pudimos observar dos generaciones de espermatozoides primarios. Los núcleos de la generación joven, que se encontraban cerca de la membrana basal, los identificamos en fase de paquíteno y la cromatina se tiñó intensamente. Los núcleos de la generación anterior de espermatozoides primarios eran muy grandes y los identificamos en la fase de diploteno o diacinesis. En esta etapa, estos espermatozoides primarios se sometieron a su primera división de maduración y dieron lugar a espermatozoides secundarios. Los espermatozoides secundarios tenían núcleos esféricos con una membrana nuclear distinta y su cromatina estaba en forma de gránulos unidos por filamentos. Los espermatozoides secundarios sólo estuvieron presentes en esta etapa. Poco después de su formación se sometieron a la división de maduración. Las espermátidas tuvieron un núcleo esférico con una evidente membrana nuclear. A menudo pudimos observar metafases de la división de los espermatozoides primarios y secundario, también espermátidas elongadas (figura 18).

Etapa 5. Durante esta etapa observamos espermátidas elongadas a nivel apical en el lumen del túbulo. Sólo una generación de espermatozoides primarios estuvo presente. La cromatina de los núcleos de estas células comenzó a extenderse y los núcleos se identificaron hacia la luz tubular, alejándose de la membrana basal. Las espermátidas eran esféricas y con una membrana nuclear distinta (figura 19).

Etapa 6. A nivel de la membrana basal seguimos observando a las células de Sertoli, a las espermatogonias tipo A y en esta etapa se sumaron las espermatogonias tipo B. Las espermatogonias tipo B tenían núcleo esférico y una membrana nuclear distinta. La cromatina de estas células era en forma de gránulos, su tinción era oscura. Los núcleos de los espermatozoides primarios aumentaron de tamaño durante la fase de paquíteno. Los núcleos de las espermátidas eran esféricos (figura 19).

Etapa 7. Las espermatogonias intermedias y espermatogonias B, se lograron observar con predominio sobre las espermatogonias A, en esta etapa. Los núcleos en paquíteno de los espermatozoides primarios se habían aumentado aún más de tamaño y la cromatina formó una densa red. Los núcleos de las espermátidas eran esféricos y fue evidente su membrana

nuclear. Los acrosomas de las espermátidas ya muy elongadas fueron visibles hacia la luz del túbulo (figura 19).

Respecto a la etapa 8 del Ciclo del Epitelio Seminífero, no fue posible identificarla, por ser la etapa en donde ocurre la espermiación, los conejos que utilizamos, por su edad, aún no habían completado esa parte de la espermatogénesis.

6.0 FIGURAS

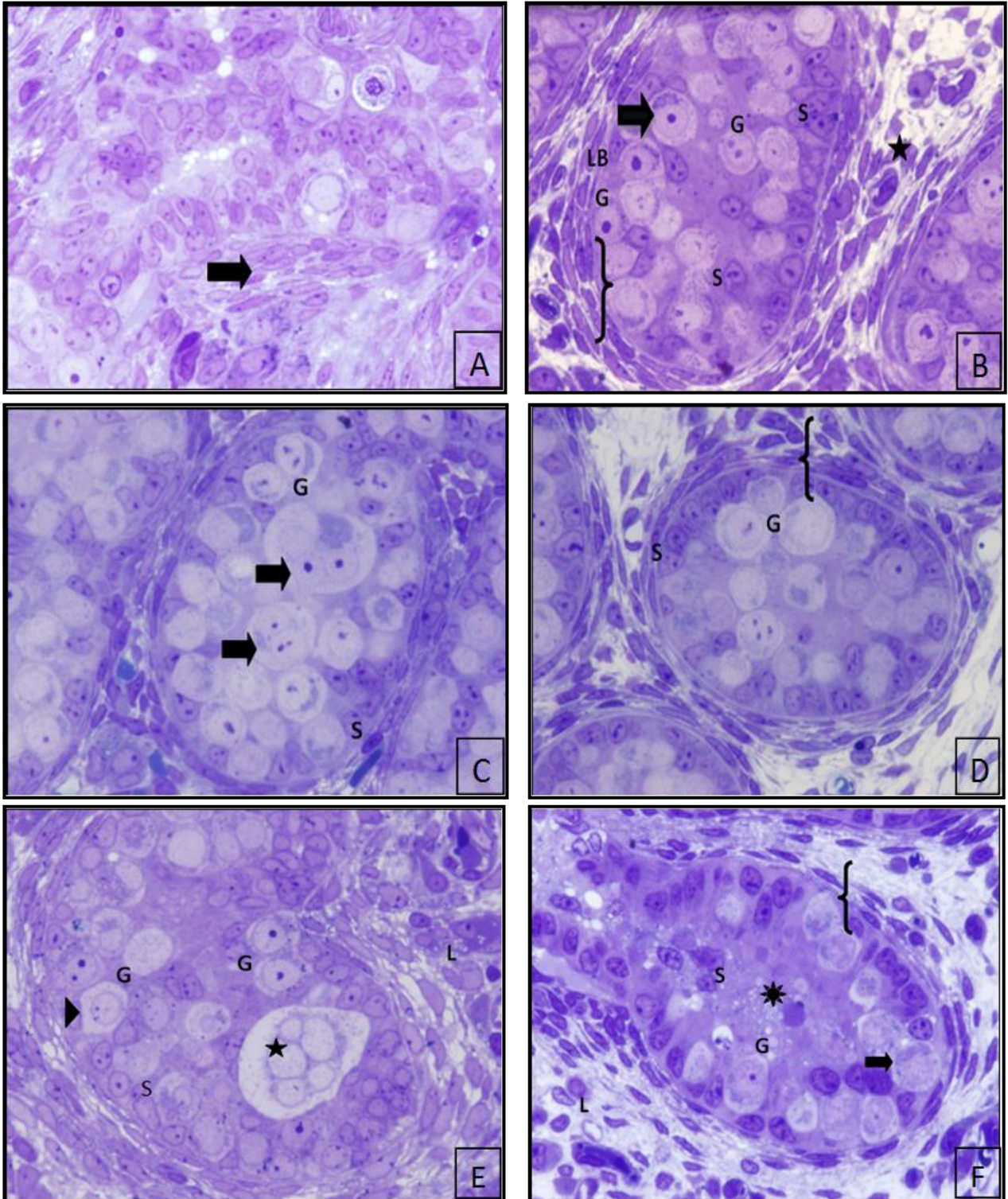


Figura 12: Cordones seminíferos de conejo de diferentes edades

Figura 12: Cordones seminíferos de conejos de diferentes edades: A) 3 dpp. Se observa el tejido del estroma aún participando en la formación de los cordones seminíferos, (flecha). B) 3 dpp. Intersticio celular, (flecha), gonocitos con mitocondrias dispuestas en “media luna”, (flecha); células de Sertoli; se observan 4 capas de células que rodean al cordón (llave); C) 6 dpp. Se aprecian sincicios celulares, signo de degeneración, (flechas). D) 6 dpp. Se observan 3 capas celulares que rodean al cordón, (llave). E) 10 dpp, gonocito, enviando proyecciones, (punta de flecha); sincicios celulares, (estrella); células de Leydig vacuoladas en el intersticio. F) 10 dpp. Células de Sertoli vacuoladas, (asterisco). Gonocitos (G), células de Sertoli (S), células de Leydig (L), lámina basal (LB). Azul de toluidina, 60X.

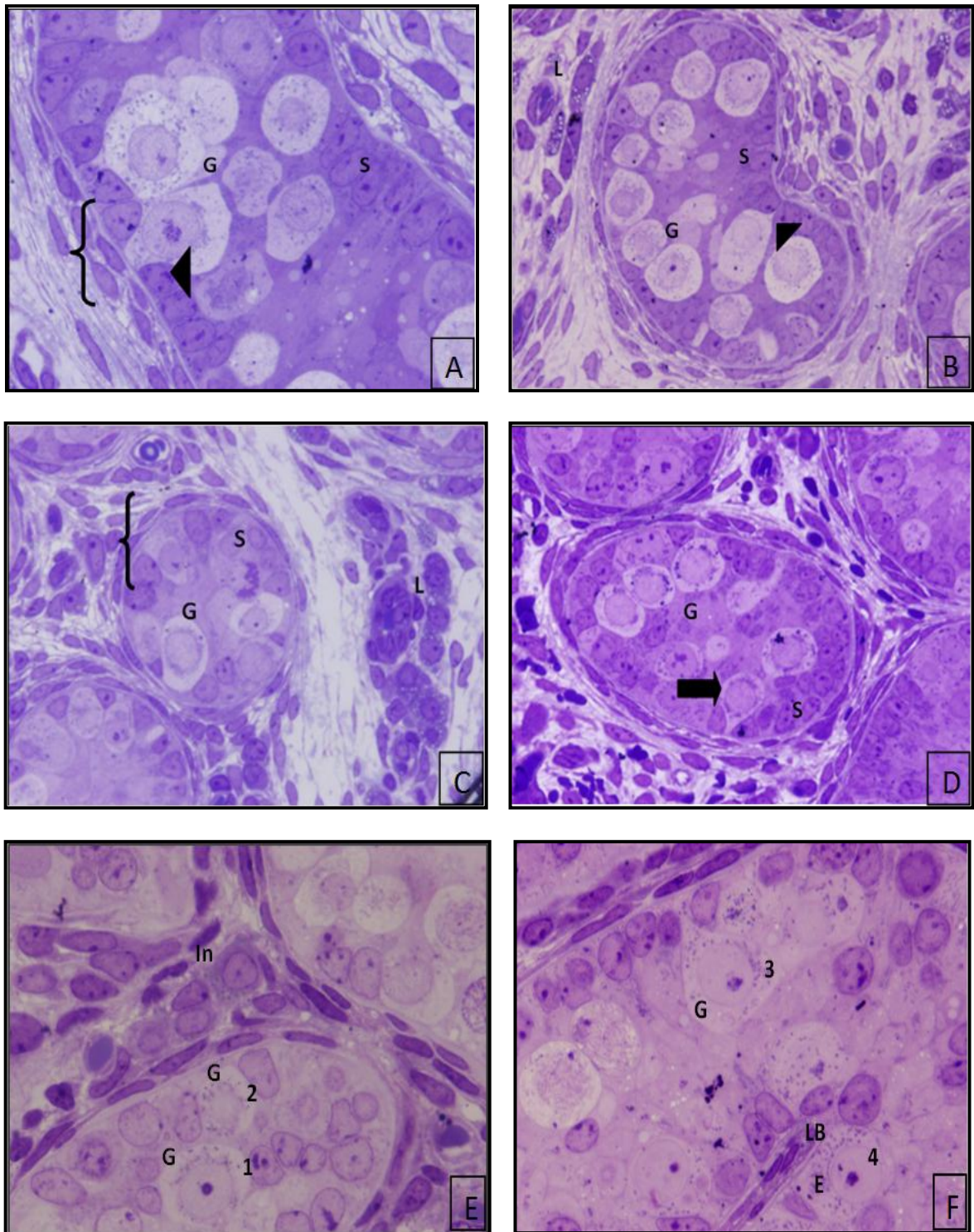


Figura 13: Cordones seminíferos de conejos de diferentes edades

Figura 13: Cordones seminíferos de conejos de diferentes edades A y B) 20 dpp. Se observan gonocitos enviando proyecciones hacia la membrana basal, (punta de flecha); las células de Sertoli se aprecian en su mayoría en contacto con la lámina basal; el cordón seminífero esta rodeado de 2 capas de células, (llave). C y D) 35 dpp. Se observan a los gonocitos sin la distribución en “media luna” de sus mitocondrias (flecha). En el intersticio hay células de Leydig vacuoladas. E y F) 50 dpp. Se observan a los gonocitos en diferentes ubicaciones permitiendo observar su desplazamiento hacia la lámina basal. Posición central en el cordón (1);desplazamiento a la lámina basal (2), gonocito con proyección citoplásmica (3);, finalmente observamos al gonocito en completo contacto con la lámina basal (4). Gonocito (G), espermatogonia (E), células de Sertoli (S), células de Leydig (L), lámina basal (LB),Intersticio (In). Azul de toluidina. A, E y F 100 X. B, C y D 60 X

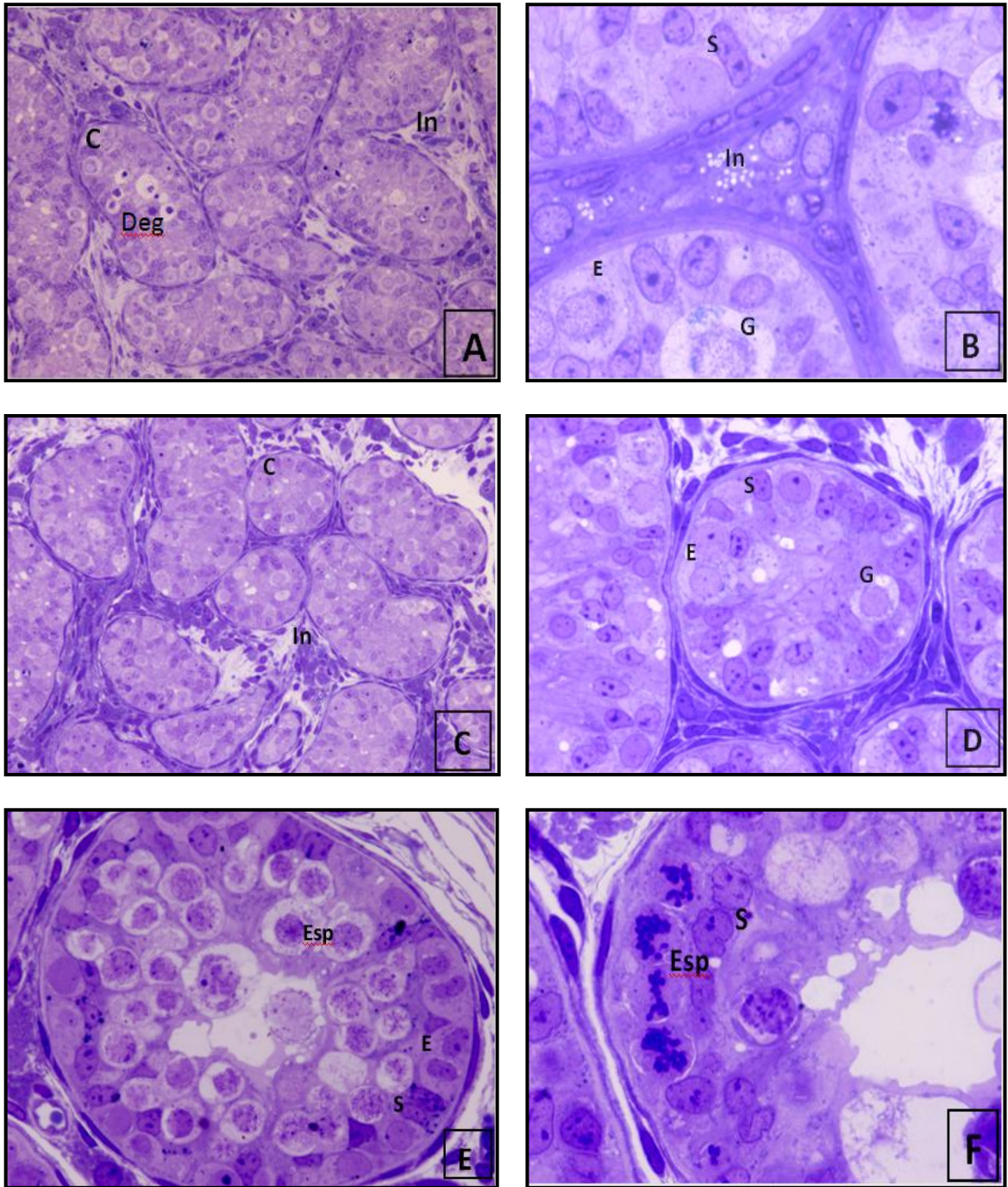


Figura 14: Cordones /Tubos seminíferos de conejos de diferentes edades

Figura 14: Cordones/tubos seminíferos de conejos de diferentes edades: A) 60 dpp. Se observa gran degeneración de células ubicadas en la parte central de los cordones. B) 60 dpp. Espermatogonias recién diferenciadas, aún se observan gonocitos centrales, en el intersticio se aprecian a las células de Leydig vacuoladas. C) 70 dpp. Se observa una disminución en la degeneración celular. D) 70 dpp. Las células de Leydig completan su maduración, se aprecian espermatogonias, y aún algunos gonocitos. E y F) 80 dpp. Se observan los primeros espermatoцитos, a los núcleos de las células de Sertoli se les aprecian escotaduras, características de su maduración y formación de la luz tubular. Degeneración celular (Deg); gonocitos (G); células de Sertoli (S); espermatogonias (E); espermatoцитos (Esp); intersticio (In); y cordones (C). Azul de toluidina. A y C, 20X. D, 60X. B, E y F, 100X.

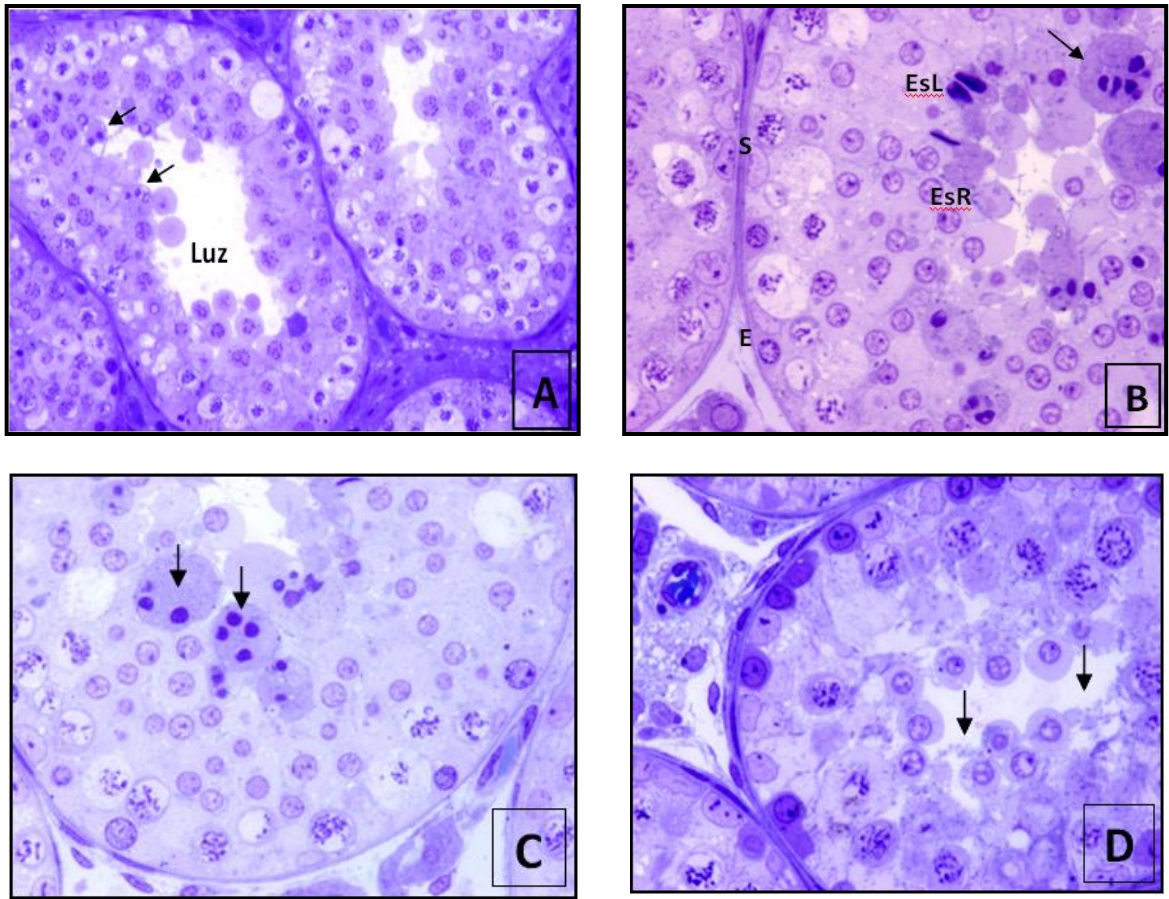


Figura 15: Tubos seminíferos de conejos de 100 dpp

Tubos seminíferos de conejos de 100dpp. A) Se observa aumento en la luz tubular; degeneración celular, (flechas). B) Se observa gran actividad proliferativa desde espermatogonias hasta espermatocitos, espermatidas redondas y elongadas; células de Sertoli. C) Se aprecian espermatidas multinucleadas (sinsicios celulares). D) Se observa evidente descamación celular al centro del tubo seminífero (flecha). Espermatogonias (E), células de Sertoli (S), espermatidas redondas (EsR), espermatidas elongadas (EsL). Azul de toluidina. A, 60X. B - D, 100X.

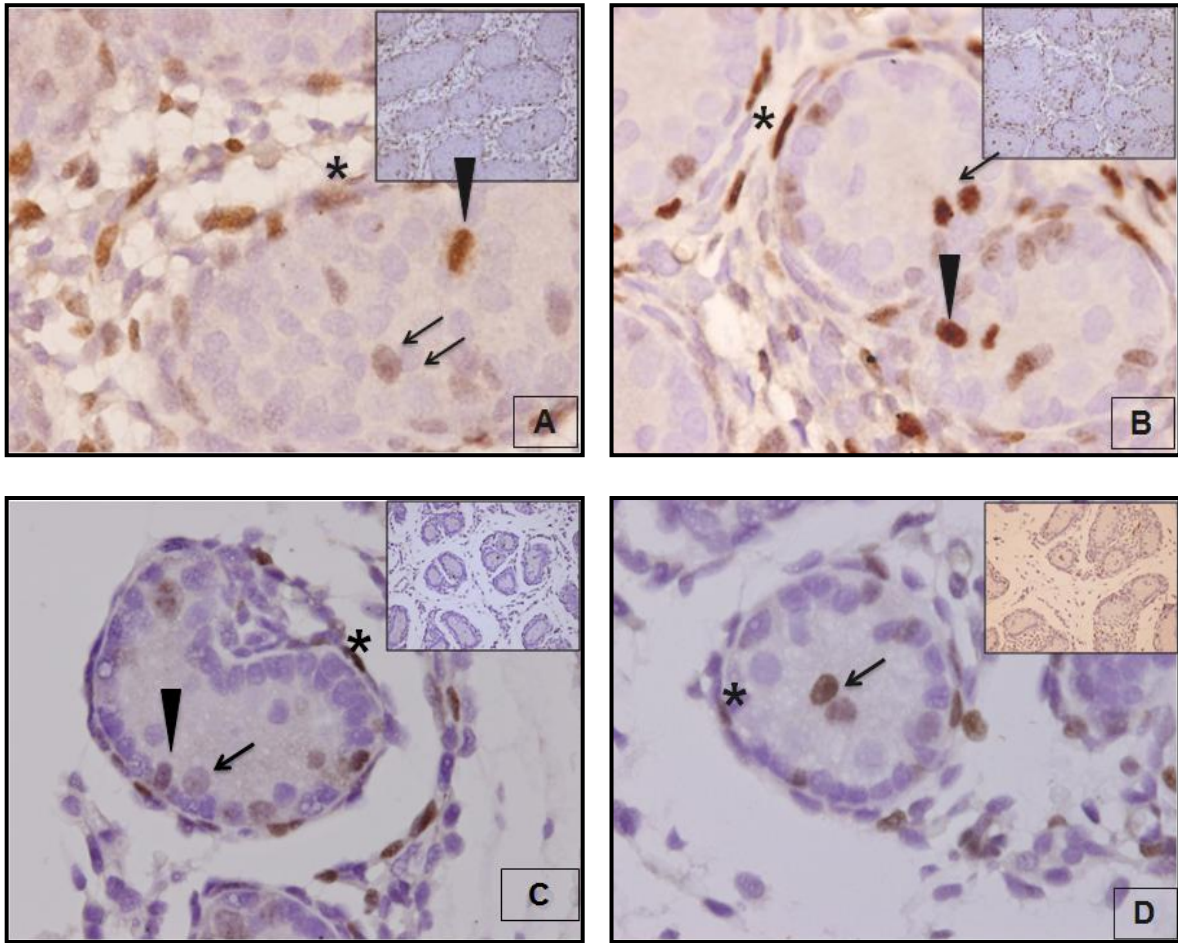


Figura 16: Inmunohistoquímica de proliferación

Cordones seminíferos de conejos de diferente edades en donde se observa la proliferación celular mediante la técnica de inmunohistoquímica. A) 3 dpp, B) 6 dpp, C) 10 dpp y D) 20 dpp. Proliferación en células germinales (flecha), de Sertoli (punta deflecha) y células intersticiales (asterisco). 60X e inserto 20X.

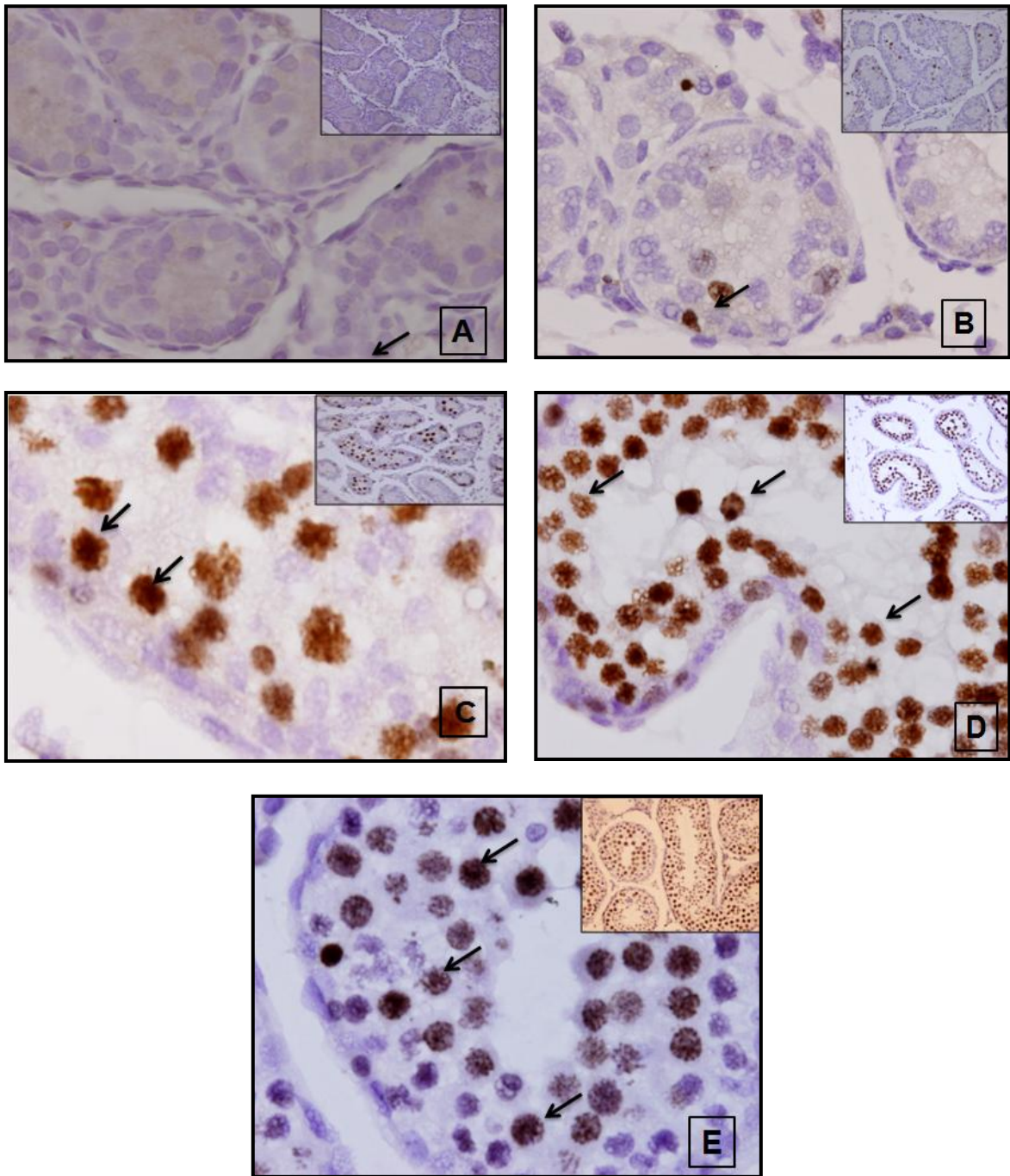
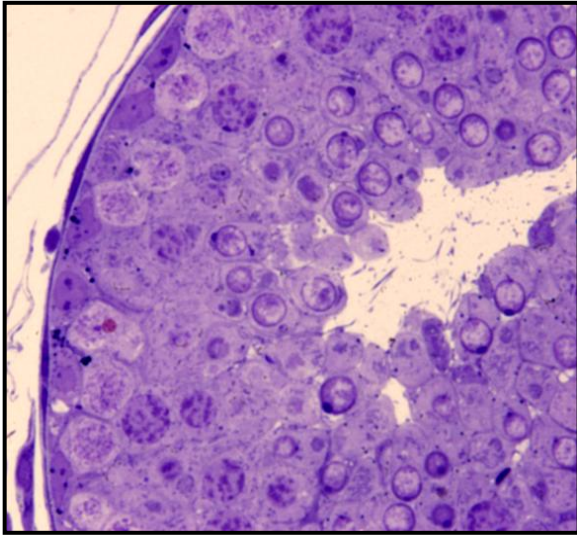
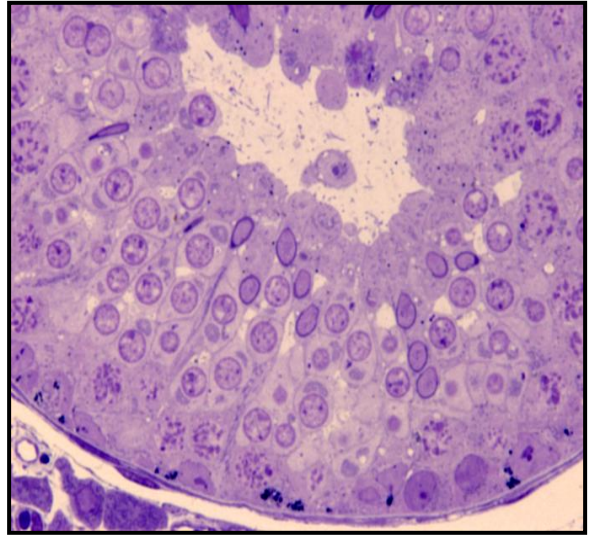


Figura 17: Inmunohistoquímica de proliferación

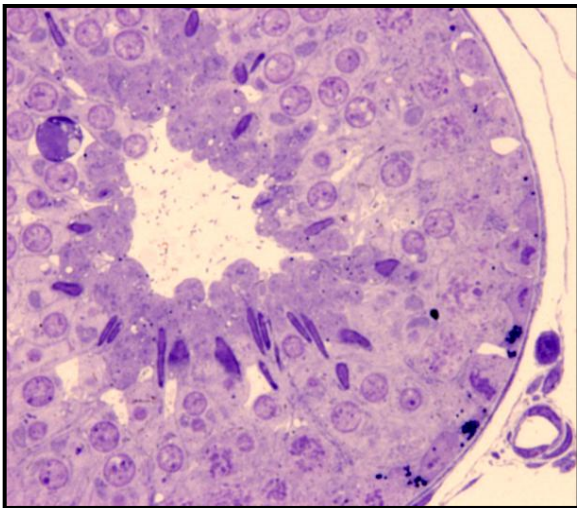
Cordones/tubos seminíferos de conejos de diferentes edades en donde se observa la proliferación celular empleando la técnica de inmunohistoquímica: A) 50 dpp, B) 60 dpp, C) 70 dpp, D) 80 dpp y E) 100 dpp. A los 50 dpp no se aprecia proliferación alguna y a los 60 dpp se reinicia actividad celular y se modifica gradualmente en forma ascendente, hasta llegar a los 100 dpp. Proliferación en células germinales (flecha). 60X e inserto 20X.



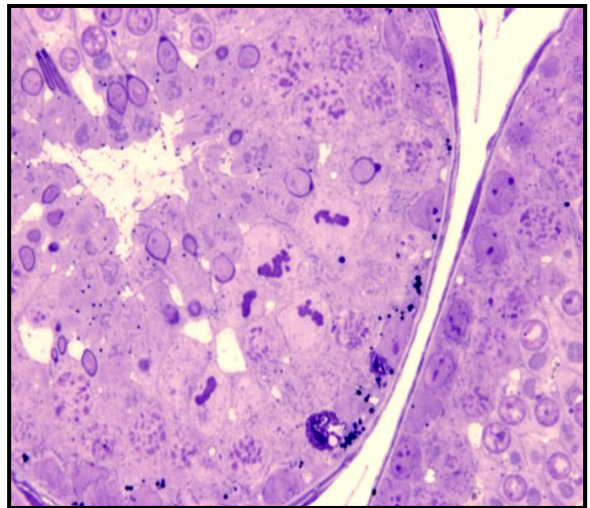
Etapa I



Etapa II

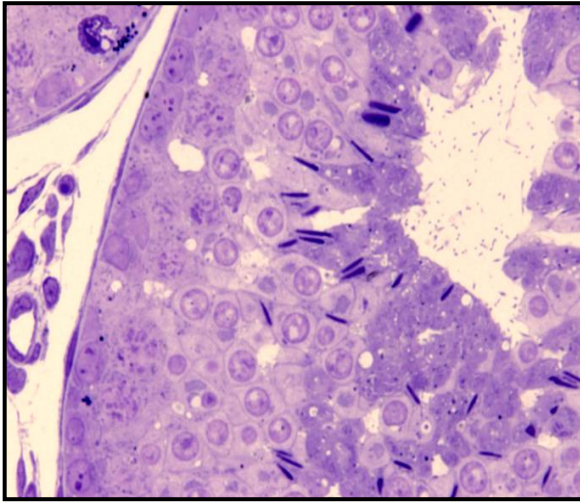


Etapa III

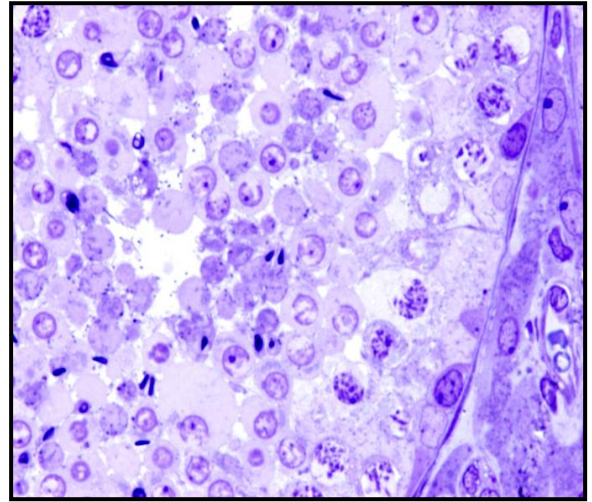


Etapa IV

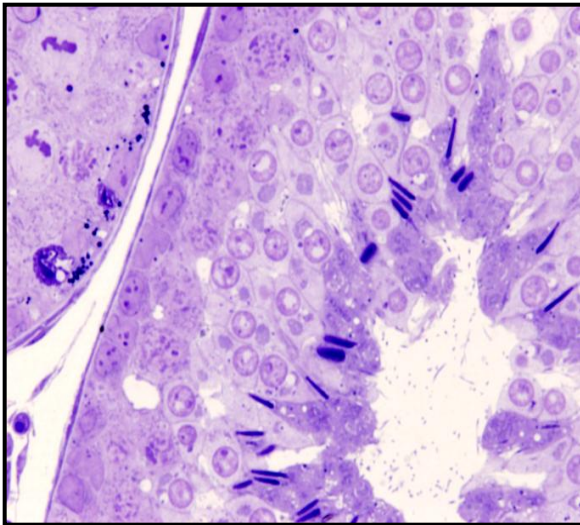
Figura 18: Etapas I, II, III y IV del Ciclo del Epitelio Seminífero



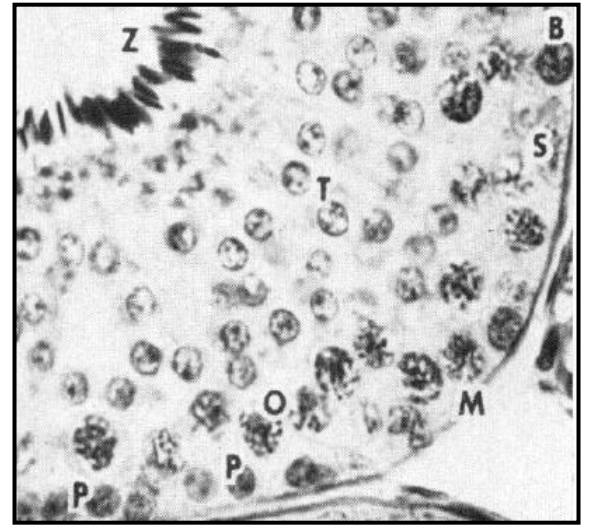
Etapa V



Etapa VI



Etapa VII



Etapa VIII
(Tomada de Swierstra y Foote, 1963)

Figura 19: Etapas V, VI, VII y VIII del Ciclo del Epitelio Seminífero

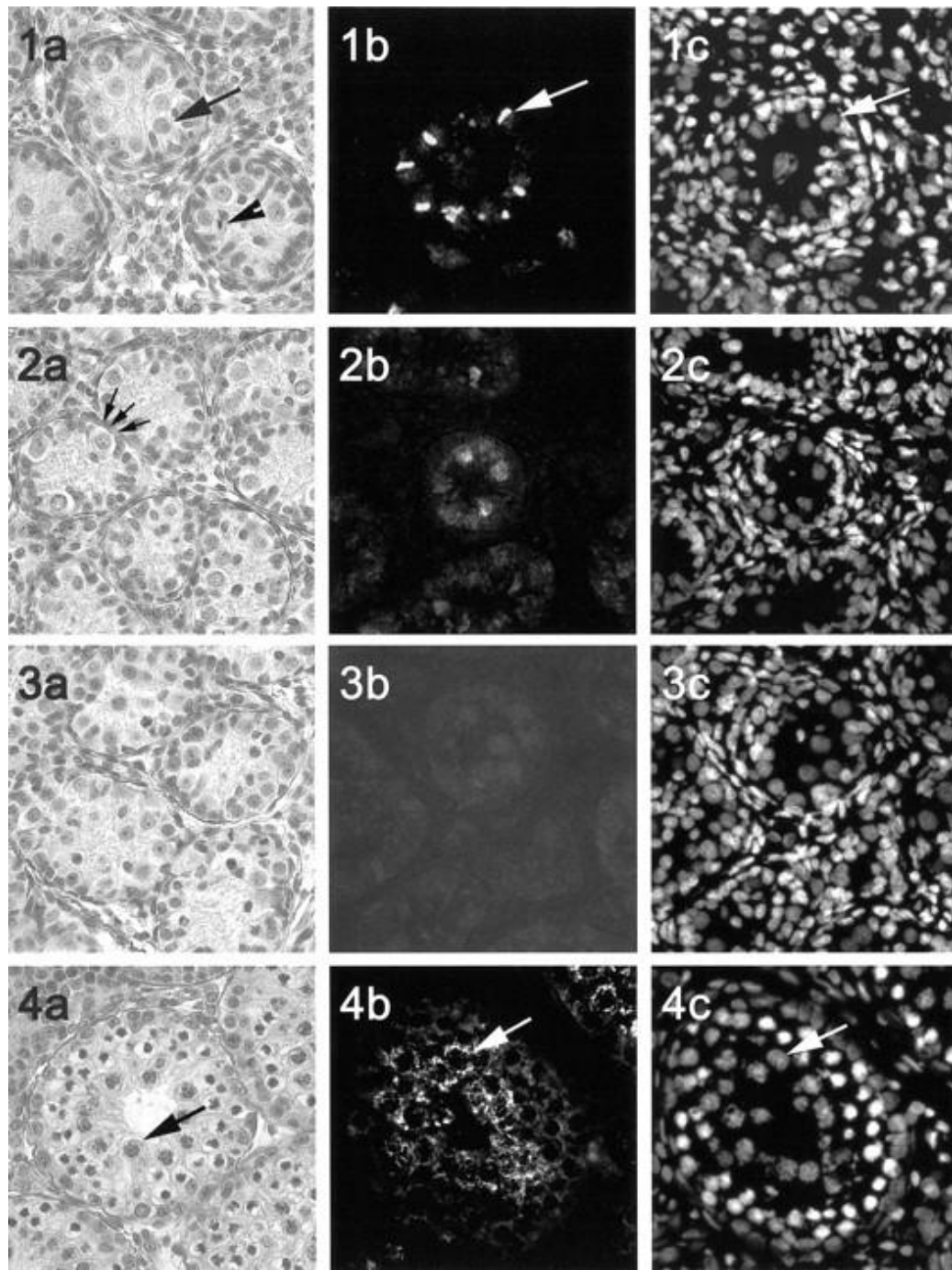


Figura 20: Inmunofluorescencia de Ricken y Viebahn (2002)

Num. 1 cordones de 10 dpp; Num. 2 cordones de 35 dpp; Num 3. cordones de 49 dpp;
 Num. 4 tubos de 84 dpp.

7.0 TABLAS Y GRÁFICAS

| Peso Corporal | | |
|---------------|-----------|------|
| Edad (dpp) | Peso (gr) | ± ES |
| 3 | 59.90 | 1.85 |
| 6 | 81.40 | 7.05 |
| 10 | 163.00 | 7.95 |
| 20 | 292.16 | 8.78 |
| 35 | 737.56 | 32.3 |
| 50 | 1190.67 | 8.25 |
| 60 | 1421.66 | 78.8 |
| 70 | 1683.33 | 20.3 |
| 80 | 2353.00 | 37.8 |
| 100 | 2562.50 | 60.5 |

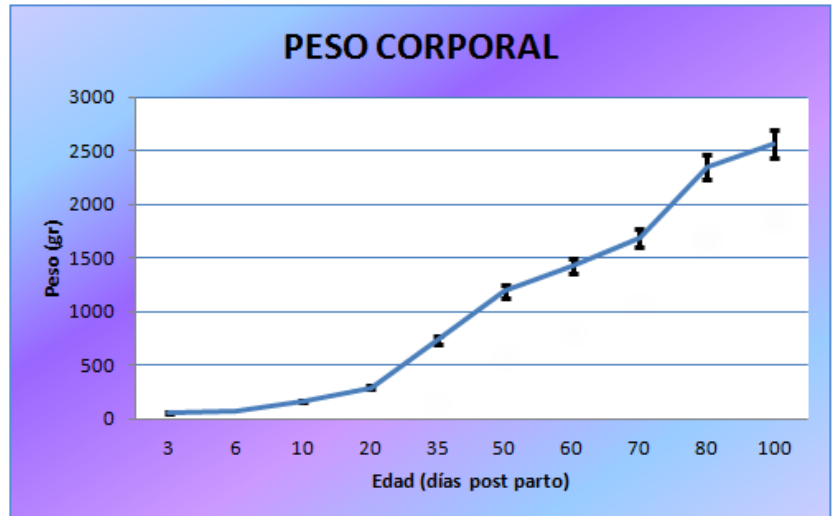


Tabla y Gráfica 1: Peso Corporal

Tabla 1 y Gráfica 1. Se muestra el aumento del peso corporal constante en proporción directa al aumento de la edad.

| Peso Testicular | | |
|-----------------|-----------|------|
| Edad (dpp) | Peso (mg) | ± ES |
| 3 | 11.4 | 1.23 |
| 6 | 18.8 | 0.89 |
| 10 | 29.2 | 1.31 |
| 20 | 39.8 | 1.14 |
| 35 | 91.6 | 1.3 |
| 50 | 192 | 2.41 |
| 60 | 290.5 | 49.5 |
| 70 | 364.3 | 28.5 |
| 80 | 883.6 | 60.5 |
| 100 | 1527.5 | 215 |



Tabla y Gráfica 2: Peso Testicular

Tabla 2 y Gráfica 2. A medida que el conejo va aumentando su edad, se aumenta el peso testicular, de manera homogénea. Pero a partir de los 70 dpp, se observa un aumento abrupto seguramente por el incremento en la actividad celular testicular, alrededor del inicio de la prepubertad.

| Relación Peso testicular – Peso corporal | |
|---|---------------------------|
| Edad (dpp) | % peso test - corporal |
| 3 | 0.0191 |
| 6 | 0.0231 |
| 10 | 0.0179 |
| 20 | 0.0136 |
| 35 | 0.0124 |
| 50 | 0.0161 |
| 60 | 0.0204 |
| 70 | 0.0216 |
| 80 | 0.0375 |
| 100 | 0.0596 |

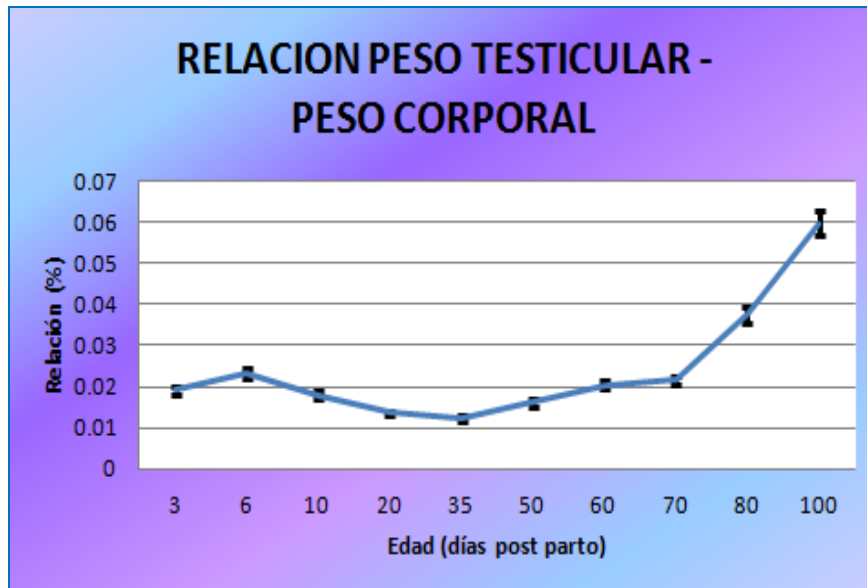


Tabla y Gráfica 3: Relación Peso testicular – Peso corporal

Tabla 3 y Gráfica 3. Observamos que en los primeros días la relación es mínima, pero esta relación va aumentando proporcionalmente a la actividad celular (proliferación) en el testículo.

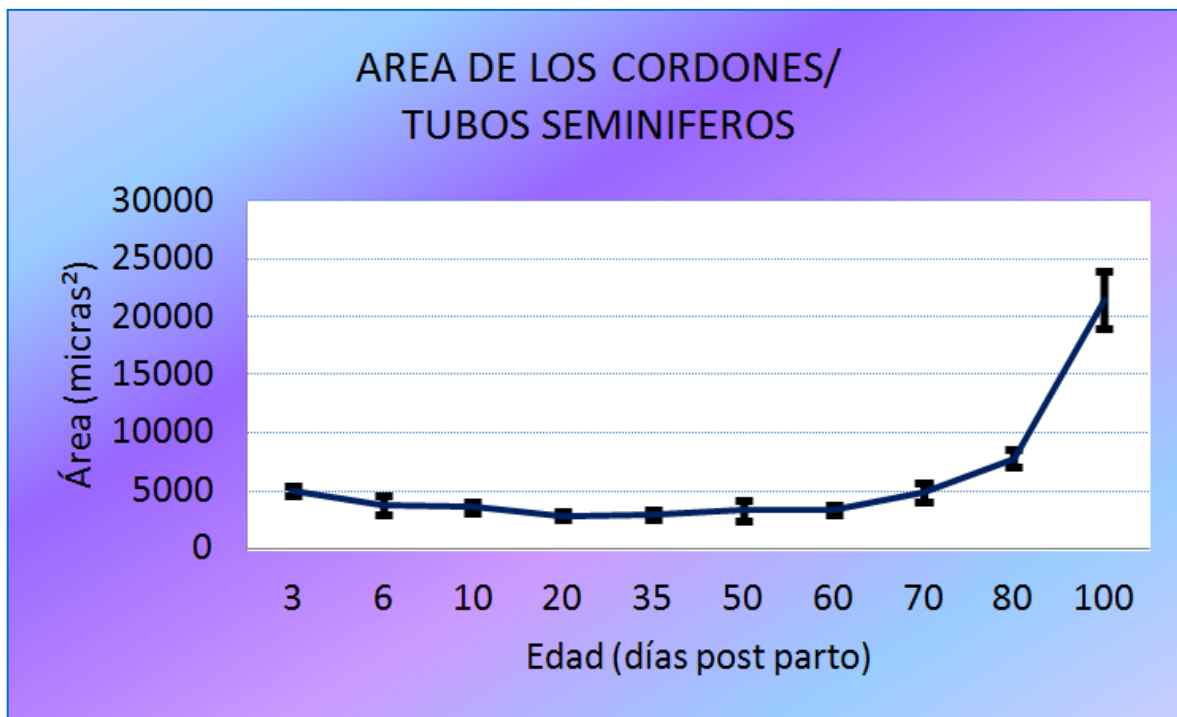
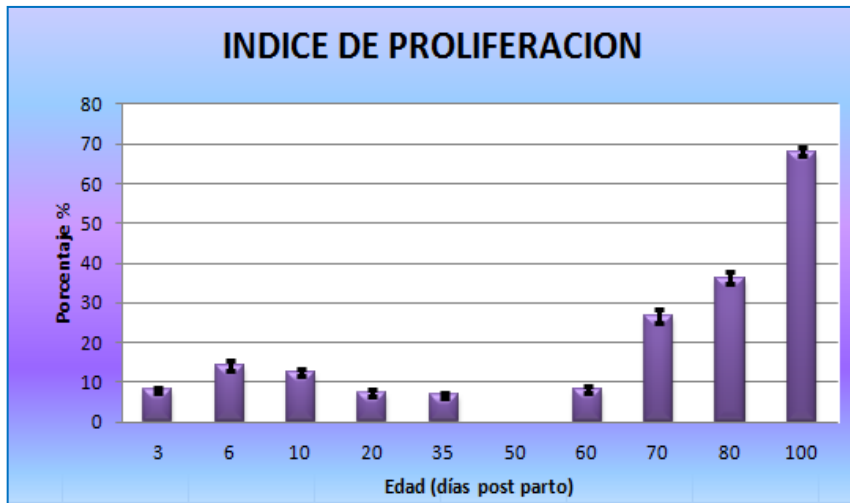


Tabla y Gráfica 4: Área de los cordones / tubos seminíferos

| Edad (dpp) | Área micra ² | ± ES |
|------------|-------------------------|------|
| 3 | 5041 | 160 |
| 6 | 3782 | 164 |
| 10 | 3593 | 102 |
| 20 | 2882 | 45.5 |
| 35 | 2970 | 61 |
| 50 | 3349 | 134 |
| 60 | 3386 | 95.7 |
| 70 | 4861 | 184 |
| 80 | 7829 | 208 |
| 100 | 21490 | 610 |

Tabla 4 y Gráfica 4. En la edad de 3 dpp encontramos alta proliferación celular, seguramente fruto de esto el cordón está aumentado en tamaño. Se mantienen los tamaños de las áreas más o menos constantes, hasta que se reinicia actividad celular a los 70 dpp, por lo tanto se aumenta aún más el tamaño del tubo seminífero, directamente proporcional al avance de la edad.



| Edad (dpp) | Índice de Proliferación |
|------------|-------------------------|
| 3 | 8.06 |
| 6 | 14.19 |
| 10 | 12.56 |
| 20 | 7.39 |
| 35 | 6.78 |
| 50 | 0 |
| 60 | 8.35 |
| 70 | 26.7 |
| 80 | 36.28 |
| 100 | 68.11 |

Tabla y Gráfica 5: Índice de Proliferación

A los 6 dpp, se evidencia aumento en el número de células positivas a la proliferación, que decrece hasta la nulidad a los 50 dpp (periodo de quiescencia). Se reinicia actividad proliferativa a los 60 dpp, que va aumentando gradualmente, hasta alcanzar a los 100 dpp una alta actividad.

| Edad (dpp) | Porcentaje de cordones/tubos en proliferación \pm ES |
|------------|--|
| 3 | 65.37 \pm 7.04 |
| 6 | 49.43 \pm 11.7 |
| 10 | 43.77 \pm 12 |
| 20 | 30.84 \pm 2.49 |
| 35 | 19.84 \pm 2.57 |
| 50 | 0 |
| 60 | 36.92 \pm 1 |
| 70 | 66.17 \pm 3.39 |
| 80 | 100 |
| 100 | 100 |

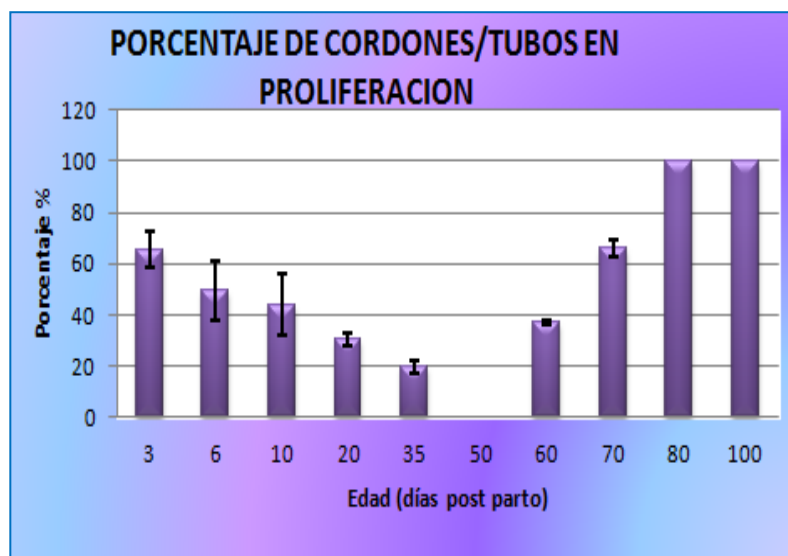


Tabla y Gráfica 6: Porcentaje de cordones/tubos en proliferación.

La inmunoreactividad mostró actividad celular (proliferación), en los cordones, en los 3 dpp y 6dpp, decreciendo hasta la nulidad en los 50 dpp. Se reinicia a los 60 dpp, y se va aumentando gradualmente hasta llegar al 100 % a los 100 dpp, el inicio de la pubertad (edad prepuberal).

8.0 DISCUSIÓN

A pesar de los avances en biología de la reproducción, los mecanismos responsables de diversas patologías asociadas a la función testicular en el humano aun son incompletos. El avance en este campo ha sido gracias al empleo de modelos murinos, u otros roedores como la rata. Sin embargo, el periodo de pre-espermatogénesis en la rata es muy corto, ya que inicia la diferenciación de gonocitos a espermatogonias en los primeros tres días de edad, concluyéndose aproximadamente a los 10 dpp con presencia de los primeros espermatozoides a los 16 dpp, es decir, el inicio de la espermatogénesis es próxima a la diferenciación de los gonocitos³⁰. La duración de la pre-espermatogénesis en el conejo es intermedia entre mamíferos pequeños y grandes con una duración de 50 días (similar a lo reportado por Gondos et al 1973⁵⁹) excede a lo que sucede en la rata, pero es próximo a lo que pasa en el humano donde, el proceso de diferenciación se presenta en los primeros 60 días. Al contar con un mayor periodo de diferenciación de gonocitos nos permite conocer más a fondo los mecanismos que participan en este proceso, el cual es de suma importancia en el humano, ya que se propone que la falta de diferenciación de los gonocitos es el principal factor para el desarrollo del carcinoma *in situ*⁶⁰. Las investigaciones que abarcan antes del inicio de la espermatogénesis son escasas en humanos, en modelos murinos y más aun en el conejo. En este trabajo se describe el desarrollo testicular del conejo, señalando los periodos importantes de diferenciación y proliferación, indispensables para el establecimiento de la fertilidad futura.

El conejo es una especie comúnmente empleada en estudios de cáncer^{61,62}, inmunología⁶³, así como toxicologías reproductivas en machos⁶⁴; por lo que el conocer el desarrollo de las células testiculares postnatales es de gran importancia para ser empleado como patrón de comparación en estudios de biología de la reproducción postnatal. Se reitera la importancia, aunque ya se ha mencionado, de que esta ventana de tiempo, posterior al nacimiento es crucial para el establecimiento de la fertilidad futura.

En países como Estados Unidos de Norte América, Alemania, Dinamarca y otros se han encontrado opciones de diferentes razas de conejo como modelo de estudio para las patologías reproductivas del macho, en algunos de ellos se emplea la raza Dutch Belted, la

cual no está disponible en nuestro país. Como sabemos, la raza más usada para la investigación biomédica aquí en México, es el conejo Nueva Zelanda Blanco, el cual por supuesto es excelente como modelo animal de estudio en muchos ámbitos; sin embargo se le han encontrado ciertos defectos como modelo de estudio para biología reproductiva. Es por eso que proponemos a la raza Chinchilla para utilizarla en este campo de la investigación, la cual sabemos que tiene ventajas sobre la raza Nueva Zelanda. Existen reportes del desarrollo de la *Diabetes mellitus* espontánea que se presenta en la raza de conejo Nueva Zelanda Blanco^{65,66}. Sumado a esto, la asociación de razas de conejos de los Estados Unidos de Norteamérica (American Rabbit Breeders Association, Inc.), menciona de la gran predisposición de los conejos nueva Zelanda a padecer obesidad. Se sabe que tanto la diabetes como la obesidad afectan la función reproductiva⁶⁷.

El conejo de la raza chinchilla ha sido poco estudiado y se ha empleado principalmente para estudios de técnicas quirúrgicas y de disfunción eréctil⁶⁸⁻⁷⁰.

La mayoría de los estudios sobre el desarrollo testicular se limitan al testículo de organismos maduros dejando a un lado el desarrollo postnatal. Esto probablemente debido a que se considera al testículo neonatal e infantil como quiescente. Sin embargo se ha demostrado que las células germinales pre-espermatogénicas en el conejo no están inactivas⁷¹.

Efectivamente las técnicas de inmunohistoquímica de proliferación celular, realizadas para la elaboración de esta tesis, nos arrojaron resultados de actividad celular, desde el día 3 post parto (pp), hasta el día 35 pp y es en el día 50 pp donde ya no encontramos proliferación y se reinicia la actividad celular hasta el día 60 pp.

Iczkowski et al (1991)⁷¹ en estudios con conejos Nueva Zelanda blancos reporta que las células germinales alcanzan porcentajes altos de mitosis hasta el día 21, con un cese entre los días 28 al 35 y que se retoma la actividad celular al día 49 en el inicio de la espermatogénesis, también cita en esta edad la aparición de los primeros espermatoцитos (actividad meiótica). Diferimos con este autor, ya que encontramos positividad a la proliferación celular hasta el día 35 pp y vimos ausencia total de actividad celular en el día 50 pp y se retoma hasta el día 60 pp. Determinamos inicio de la espermatogénesis con el arranque de esta actividad celular en el día 60 pp; y aparición de primeros espermatoцитos

hasta el día 80 pp; esto puede deberse al hecho de que en los estudios que hacen Iczkowski et al (1991)⁷¹ emplean una raza diferente a la nuestra (chinchilla).

Ford (1970)⁷², en su artículo *Comparison of testicular maturation in two inbred rabbit lines*, realiza una comparación de la maduración testicular en dos líneas endogámicas de conejo y demuestra las diferencias que existen entre individuos de razas diferentes con respecto a los tiempos de maduración testicular; de ahí la importancia de tener adecuadamente descrito nuestro estudio sobre los aspectos celulares testiculares que son de interés en biología de la reproducción.

Respecto a las células de Sertoli, Iczkowski⁷¹ mencionan que la forma columnar de este tipo celular es escaso en el periodo prepuberal, a diferencia de su forma citoplasmática en forma de “ramas de árbol” que existe en el adulto donde se extiende su citoplasma a lo largo del lumen tubular. Las imágenes de nuestros conejos nos demuestran que se empieza a distribuir el citoplasma de las células de Sertoli a lo largo del lumen tubular (“ramas de árbol”) a partir de los 50 dpp, seguramente con la finalidad de ir albergando a los primeros espermatocitos que surgirán en los siguientes días. Iczkowski⁷¹ reporta que la diferenciación a espermatogonias tipo A, de contornos aplanados y ovalados, con patrones de densidad en la cromatina aumentados y nucléolos ubicados excéntricos; lo observa en el día 49 de edad. Efectivamente a los 50 dpp en nuestros cortes semifinos observamos células con estas características, esto nos marca la aparición de las primeras espermatogonias al día 50 pp.

En sus observaciones, Iczkowski⁷¹, menciona que entre el día 21 y 49 de edad se presenta la reorganización completa a nivel basal de las células germinales; en nuestras imágenes de 60 dpp esta reorganización esta todavía concluyéndose.

Higuchi⁵⁵, estudiando conejos Duch belted, reporta el descenso testicular entre la semana 6 y 9 (42 a 54 días de edad). En nuestro estudio, con conejos raza Chinchilla, a los 50 días pp, ya presentaban los testículos escrotados, por lo tanto asumimos que este proceso se presenta entre los días 40 al 50 de edad. Coincidiendo con lo reportado por este autor.

Gondos⁵⁹ menciona que a partir del día 42 pp, el epitelio seminífero contiene solo gonocitos, preespermatozonias y células Sertoli; nuestras imágenes demuestran que es

hasta el día 50 pp donde vemos las primeras espermatogonias, antes de esto solo se observan gonocitos y células Sertoli en los cordones seminíferos. También este autor reporta la presencia de los primeros espermátocitos en el día 56 pp, espermátidas al día 84 pp a esta edad también la formación de luz tubular y espermatozoides maduros entre el día 91 a 98 pp. Haciendo comparaciones con lo que reporta este autor observamos la presencia de primeros espermátocitos hasta el día 80 pp, también a esta edad formación bien definida de luz tubular; espermátidas hasta el día 100 pp, y aunque ya son elongadas, no apreciamos presencia de espermatozoides maduros como lo reporta Gondos⁵⁹ a esta edad. Reiterando datos de inicio de espermatogénesis, Gondos⁵⁹ lo reporta entre el día 49 a 56 pp. Diferimos en este punto, pues nuestras inmunohistoquímicas de actividad celular a esta edad (50 dpp), nos arrojan negatividad; es hasta los 60 dpp donde se da reinicio de proliferación celular y por esto determinamos que posterior a esta edad se iniciaría la espermatogénesis, aparentemente a los 70 dpp.

Analizando datos sobre el Ciclo del Epitelio Seminífero en conejos, como ya se mencionó anteriormente en 1963, Swierstra y Foote⁵⁸ describieron 8 etapas del Ciclo del Epitelio Seminífero para conejos, como los animales usados para esta tesis aún no completaban la parte de espermiación de la espermatogénesis, no logramos identificar la etapa 8, que es donde se da este punto crucial. Estos autores aunque trabajaron con conejos Dutch Belted, encontramos semejanzas al conejo Chinchilla que nosotros utilizamos (figuras 18 y 19).

Ricken y Viebahn⁷³, en su artículo *Stage-Specific Expression of the Mitochondrial Germ Cell Epitope PG2 During Postnatal Differentiation of Rabbit Germ Cells*, realizaron inmunofluorescencias a partir de tejidos en congelación para marcar el epitope mitocondrial PG2, el cual es positivo en las células germinales y pre- espermatogonias, proliferando antes de entrar en división meiótica⁷⁴. A pesar de que estos investigadores utilizaron conejos nueva Zelanda, coincidimos en varios puntos en los resultados que ellos reportan y lo que nosotros encontramos. En sus imágenes de inmunofluorescencias de conejos de 10 días, se puede observar la disposición mitocondrial en media luna (figura 20), que nosotros advertimos en nuestros cortes semifinos de los conejos de 10 dpp (figura 12 E Y F). Sumando nuestros hallazgos a estos reportes, la disposición en media luna la advertimos

desde el día 3 pp, 6pp y 10 pp, vemos que en los cortes semifinos de 20 dpp ya se presenta una redistribución mitocondrial más homogénea en todo el citoplasma. Ricken y Viebah⁷³ reportan esta redistribución hasta el día 35 pp. De igual forma las inmunohistoquímicas realizadas para esta tesis, nos arrojan positividad en estas edades ya mencionadas (figuras 16 A, B, C y D), es decir, presencia de actividad proliferativa.

En este mismo trabajo, los autores reportan a los 49 dpp ausencia de inmunorreactividad (figura 20) y definen este periodo como paralelo al de la quiescencia mitótica, durante el cual la base de células madres se está reorganizando en el cordón seminífero. En nuestras inmunohistoquímicas de 50 dpp, no existió positividad a la proliferación celular por lo tanto coincidimos en el periodo de ausencia de proliferación celular, alrededor del día 50 pp. Vemos reactivación proliferativa a partir del día 60 pp; Ricken y Viebahn⁷³ la reportan al día 84, ya como actividad meiotica. De acuerdo a Ricken y Viebahn⁷³, la importancia funcional de la acumulación perinuclear (“disposición en media luna”) de PG2 en la pre-espermatogonia (gonocito); puede ser indicativo del aumento de las necesidades metabólicas del núcleo. Diferimos en este punto, basándonos en los resultados de índices de proliferación (número de células positivas en relación al número total de células, índice de proliferación, ver gráfica 5), ya que a los 3 dpp es muy evidente la disposición en “media luna” y el índice de proliferación solo es de 8 y a los 20 dpp, es de 7, es decir, pocas células son activas mitóticamente.

En imágenes de conejos de 100 días de edad observamos alteraciones en el epitelio seminífero, como espermátidas multinucleadas, hipoplasia celular y vacuolización citoplasmática de las células Sertoli. Estos hallazgos nos hacen coincidir con Morton⁵⁴, quien en su artículo, refleja las ventajas del uso de conejos en toxicologías reproductivas en machos. Haciendo importante hincapié en que sí, se debe tener cuidado con los altos porcentajes de espermátidas multinucleadas (94%) y vacuolización de células Sertoli (61%), en conejos de 91 días de edad; asegura que son cambios degenerativos inespecíficos que se producen en testículos de conejos clínicamente sanos. Sugiere que en estudios que involucren testículos de conejos se deben considerar estas alteraciones como “normales”, pero que sí, es importante incrementar el número de animales a estudiar para poder detectar cuales son las alteraciones reales cuando deban asociarse a manipulación experimental.

También es importante complementar los estudios experimentales con la evaluación cuantitativa y cualitativa del eyaculado, peso de los testículos, glándulas y órganos accesorios reproductivos, estos parámetros pueden ser necesarios para demostrar que un compuesto provoca efectos adversos o no.

Filho et al⁷⁵, hicieron biopsias a conejos Nueva Zelanda con la finalidad de evaluar daño a espermatogénesis, causada por técnicas de extracción de semen, en sus conejos controles de 7 a 8 meses de edad (213 – 244 días), que eran sanos y fértiles. Hace la siguiente descripción de la espermatogénesis en los tubos seminíferos de sus conejos, basada, en el índice de Johnsen: 14% los evalúa sin presencia de espermatozoides, solo espermátidas, y presencia de espermatoцитos; 21% sin presencia de espermatozoides y solo espermátidas. La coincidencia con nuestros hallazgos nos, reiteran la importancia de tener bases histomorfológicas bien definidas, las cuales podamos usar para tener como punto de referencia y de comparación para futuros estudios con manipulación experimental.

Solo como un dato adicional ciertos autores^{76,77}, reportan que en el ser humano también es común observar alteraciones en la producción espermática.

9.0 CONCLUSIÓN

Existen variantes en el desarrollo testicular entre las diferentes razas de conejos que deben ser tomadas en cuenta al considerar a esta especie como modelo de investigación en el campo de biología de la reproducción.

La identificación y diferenciación de las células testiculares posnatales del conejo Chinchilla permite establecer bases morfológicas para ratificar a esta especie como un excelente modelo de estudio en biología reproductiva de machos.

10.0 REFERENCIAS

1. Diaz HV, Merchant LH. Bases moleculares de la determinación sexual en mamíferos. *Ciencia Ergo Sum* 2009; 15 (03): 287-96.
2. Langman J. *Embriología Médica*. Editorial Médica Panamericana, 11va ed. Buenos Aires, Argentina, 2009.
3. Langman J. *Embriología Médica*. Editorial Médica Panamericana, 10 ma ed. Buenos Aires, Argentina, 2007.
4. Amann R, Veeramachaneni D. Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction* 2007; 13: 541-61.
5. Cunningham GJ, Bradley KG. *Fisiología Veterinaria*. Editorial Elsevier Saunders. Barcelona, España, 2009.
6. Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nature Genetics* 1999; 22(3):295-99.
7. Meyer P. *Fisiología Humana*. Editorial Salvat. México, 1985.
8. Medis-Handagama SM, Ariyarathe-Siril HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction* 2001; 65(3):660-71.
9. Chen Y, Wang H, Qi N, Wu H, Xiong W, Ma J, Lu Q, Han D. Functions of TAM RTKs in regulating spermatogenesis and male fertility in mice. *Reproduction* 2009; 138 (4): 655-66.
10. Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. Marked extension of proliferation of rat Sertoli cells in culture using recombinant human FSH. *Reproduction* 2002; 124(5):633-41.
11. Walker WH, Chen J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 2005; 130: 15–28
12. Sharpe RM, Mckinnell 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 (6):769-84.
13. O'shaughnessy PJ, Morris Id, Huhtaniemi I, Baker Pj, Abel MH. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells:

data from mutant and genetically modified mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 306 (1-2): 2-8.

14. Culty M. Gonocytes, The Forgotten Cells of the Germ Cell Lineage. *Birth Defects Research* 2009; 87:1–26.

15. Rajpert ME, Hanstein R, Jorgensen N, Graem N, Vogt PH, Skakkebaek NE. Developmental expression of POU5F1(OCT3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Human Reproduction* 2004; 19: 1338–1344.

16. Hoein-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Brask SS, Graen N, Skakkebaek Ne, Leffers H, Rajpert ME. Transcription factor AP-2 γ is a developmentally regulated novel marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. *Clinical Cancer Research* 2004b; 10: 8521–8530.

17. Edelman GM, Crossin KL. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annual Review of Biochemistry* 1991; 60: 155-190.

18. Seki T, Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult centralnervous system. *Neuroscience Research* 1993; 17: 265-290.

19. Cunningham BA. Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Current Opinion in Cell Biology* 1995; 7: 628-633.

20. Ling Lh, Jester Wf, Orth JM. Expression of 140-kDa Neural Cell Adhesion Molecule in Developing Testes In Vivo and in Long-Term Sertoli Cell-Gonocyte cocultures. *Journal Andrology* 1998; 19: 365-73.

21. Wu J, Jester WF, Laslett Al, Meinhardt A, Orth JM. Expression of a novel factor, short-type PB-cadherin, in Sertoli cells and spermatogenic stem cell of the neonatal rat testis. *Journal endocrinology* 2003;176: 381-391.

22. Gnessi L, Emidi A, Jannini Ea, Carosa E, Maroder M, Arizzi M, Ulisse S, Spera G. Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action. *Jornal Cell Biology* 1995; 131: 1105 – 1121.

23. Li H, Papadopoulos V, Vidic B, Dym M, Culty M. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* 1997; 138: 1289 – 1289.

24. Thuiller R, Wang Y, Culty M. Prenatal exposure to estrogenic compounds alters the expression pattern of platelet-derived growth factor receptors alpha and beta in neonatal rat testis: identification of gonocytes as targets of estrogen exposure. *Biology Reproduction* 2003; 68: 867 – 880.
25. Basciani S, De Luca G, Dolci S, Brama M, Arizzi M, Mariani S, Rosano G, Spera G, Gnassi L. Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology* 2008; 149: 6226-6235.
26. Dolci S, Williams De, Ernst Mk, Resnick JI, Brannan Ci, Lock Lf, Lyman Sd, Boswell Hs, Donovan PJ. Requirement for most cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 1991; 352: 809–811.
27. Dolci S, Pellegrini M, Di Agostino S, Geremia R, Rossi P. Signaling through extracellular signal regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 40225–40233.
28. Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 1993;118: 1089–1094.
29. Yan W, Suominen J, Toppari J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *Journal Cell Science* 2000; 113: 161–168.
30. Viguera RM, Moreno NA, Reyes TG, Molina OD, Cardenas LM, ROJAS JC. The effect of estrogen on testicular gonocyte maturation. *Reproductive Toxicology* 2006; 22: 513–520.
31. Holdcraft R, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology* 2004; 27(6):335-42.
32. Shalet SM. Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatric Blood Cancer* 2009; 53(2):285-8.
33. Stillman B. Cell Cycle control of DNA Replication. *Science* 1996; 6: 1659-63.
34. Galina C, Valencia J. Reproducción de animales domésticos. Editorial Limusa. México 2008.
35. Austin CR, Short RV. Reproduction in mammals. Germ cells and fertilization. Cambridge University Press. Great Britain 1982. P.p.13,77, 83,88.

36. Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human Reproduction* 1998; 13(1):1-8.
37. Hafez E, Hafez B. Reproducción e Inseminación artificial en animales. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. México 2002. P.p. 101- 105
38. Sofikitis N, Pappas E, Kawatani A, Baltogiannis D, Loutradis D, Kanakas N, Giannakis D, Dimitriadis F, Tsoukanelis K, Georgiou I, Makrydimas G, Mio Y, Tarlatzis V, Melekos M, Miyagawa I. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Human Reproduction Update* 2005; 11 (3): 229-59.
39. Hayashi T, Kageyama Y, Ishizaka K, Kihara K, Oshima H. Involvement of apoptosis in the control of Sertoli and pre-meiotic germ cell numbers in the developing rabbit testis. *Andrology* 2002; 34: 34-40.
40. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unknown (review). *Journal Cell Physiol* 2000;182:311-22.
41. 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(4):240-54.
42. Fox JG, Anderson LC, Loew MF, Quimby WF. *Laboratory Animal Medicine*. 2^o ed. USA: Elsevier, 2002.
43. Li QY, Hou J, Chen YF, An XR. Full-term development of rabbit embryos produced by ICSI with sperm frozen in liquid nitrogen without cryoprotectants. *Reproduction in domestic animals* 2010; 45 (4):717-22.
44. Okamoto I, Patrat C, Thépot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, Diabangouaya P, Wolf JP, Renard JP, Duranthon V, Heard E. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 2011; 472 (7343):370-4.
45. Lagutina I, Zakhartchenko V, Fulka H, Colleoni S, Wolf E, Fulka J Jr, Lazzari G, Galli C. Formation of nucleoli in interspecies nuclear transfer embryos derived from bovine, porcine, and rabbit oocytes and nuclear donor cells of various species. *Reproduction* 2011; 141(4):453-65.

46. Rapallino MV, Cupello A. GABA and chloride permeate via the same channels across single plasma membranes microdissected from rabbit Deiters' vestibular neurones. *Acta Physiologica Scandinava* 2001; 173 (2): 231-8.
47. Tena BE, Graullera RV, Valero EG, Martínez MM. Respuesta corneal de conejos raza N.Z.B. al implante de suturas de monofilamento de nylon calibre 10/0 conteniendo pigmentos minerales. *Revista AMMVEPE* 2008; 19(4):103-107.
48. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* 2011; 414(2):153-63.
49. Yeramili VA, Knight KL. Somatically diversified and proliferating transitional B cells: implications for peripheral B cell homeostasis. *Journal of immunology* 2011; 186 (11):6437-44.
50. Zhu YM, Yuan ZY, Wu H, Zhou DD, Jing GX. Midazolam in rabbits terminates dysrhythmias caused by intracerebroventricular ropivacaine. *Journal Zhejiang Science* 2011; 12(8):668-676.
51. Lee CJ, Goncalves, Wells PG. Embryopathic effects of thalidomide and its hydrolysis products in rabbit embryo culture: evidence for a prostaglandin H synthase (PHS)-dependent, reactive oxygen species (ROS)-mediated mechanism. *Journal FASEB* 2011; 25 (7): 2468-83.
52. Sweeting JN, Siu M, Wiley MJ, Wells PG. Species- and strain-dependent teratogenicity of methanol in rabbits and mice. *Reproductive Toxicology* 2011; 31(1):50-8.
53. Püschel B, Daniel N, Bitzer E, Blum M, Renard JP, Viebahn C. The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): a model for mammalian reproduction and early embryology. *Cold Spring Harbor Protocols* 2010 (1); pdb.emo139.
54. Morton D. The use of rabbits in male reproductive. *Environmental Health Perspectives* 1988; 77: 5-9.
55. Higuchi TT, Palmer SJ, Gray LE, Rao-Veeramachaneni DN. Effects of Dibutyl Phthalate in Male Rabbits following in Utero, Adolescent, or Postpubertal Exposure. *Toxicological Sciences* 2003; 72: 301–313.
56. www.criver.com

57. Quesenberry KE, Carpenter JW, Bennett RA, Mullen HS. Soft tissue surgery; Ferrets, rabbits and rodents: clinical medicine and surgery. 2^a ed. St. Louis: Saunders; 2004: 274-284.
58. Swierstra y Foote. Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *Journal Reproduction and Fertili* 1963; 5: 309-322.
59. Gondos B, Renston RH, Conner LA. Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. *American Journal Anatomy* 1973; 136(4):427-39.
60. Almstrup K, Høi-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansorge W, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H. Embryonic stem cell like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 2004; 64: 4736–4743
61. Feng L, Wang X, Jin H. Rabbit monoclonal antibody: potential application in cancer therapy. *American Journal or Traslational Research* 2011;3(3): 269-74.
62. Høi – Hansen CE, Rajpert – De Meyts E, Daugaard G, Skakkebaek. Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumors: a clinical review. *Annals of Oncology* 2005; 16: 863 – 868.
63. Hamada-Tsutsumi S, Suzuki K, Akahori Y. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity is induced by a single-chain Fv-protein III fusion in the presence of a rabbit anti-protein III polyclonal antibody. *Immunology Letters* 2011; 136(1):44-8
64. Veeramachaneni DN. Germ cell atypia in undescended testes hinges on the aetiology of cryptorchidism but not the abdominal location per se. *Int J Androl* 2006; 29:235–240
65. Roth SI, Conaway HH, Sanders LL, Casali RE, Boyd AE 3rd. Spontaneous diabetes mellitus in the New Zealand white rabbit: preliminary morphologic characterization. *Laboratory Investigation* 1980; 42(5):571-9.
66. Roth SI, Conaway HH. Animal model of human disease. Spontaneous diabetes mellitus in the New Zealand white rabbit. *American Journal Pathology* 1982; 109(3):359-63.

67. Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Chávez-Saldaña M, Gutiérrez-Pérez O, García-Cruz ME, Reyes-Romero MM, Cuevas-Alpuche JO, Zambrano E. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochemica* 2011; 113: 214-220.
68. Van der Horst C, Seif C, Boehler G, Martinez Portillo FJ, Braun PM, Juenemann KP. Impact of electrostimulation of neurovascular bundles and pudendal nerves on the membranous urethra in male rabbits. *Journal of Urology* 2006; 175(4):1564-7.
69. Kalagassy EB, Carbone LG, Houpt KA. Effect of castration on rabbits housed in littermate pairs. *J Appl Anim Welf Sci.* 1999;2(2):111-21.
70. Binnebösel M, Klink CD, Otto J, Conze J, Jansen PL, Anurov M, Schumpelick V, Junge K. Impact of mesh positioning on foreign body reaction and collagenous ingrowth in a rabbit model of open incisional hernia repair. *Hernia.* 2010; 14(1):71-7
71. Iczkowski KA, Sun EL, Gondos B. Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. *American Journal Anatomy* 1991; 190: 266-272.
72. Ford L. Comparison of testicular maturation in two inbred rabbit lines. *American Journal Veterinary Research* 1970;31(5):941-5.
73. Ricken AM & Viebahn C. Stage-Specific Expression of the Mitochondrial Germ Cell Epitope PG2 During Postnatal Differentiation of Rabbit Germ Cells. *Biology of Reproduction* 2002; 67, 196 – 203.
74. Hayashi T, Kageyama Y, Ishizaka K, Kihara K, Oshima H. Sexual dimorphism in the regulation of meiotic process in the rabbit. *Biol Reprod* 2000; 62:1722–1727.
75. Filho AB, Souza RS, Azeredo-Oliveira MT, Perruqueti RL and Cedenho AP. Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genetics and Molecular Research* 2010; 9(3): 1405 – 1413.
76. Sharpe RM. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions Royal Society London. Biological Sciences* 2010; 27;365(1546):1697-712.
77. Holstein AF. Spermatogenesis in the aged--a borderland between normal and pathologic anatomy. *Der Urologe Ausg* 1986; 25(3):130-7.