



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**MODELO ALTERNATIVO PARA EL ESTUDIO DEL VARICOCELE
EMPLEANDO NITROPRUSIATO Y SUS EFECTOS SOBRE LAS CÉLULAS DE
SERTOLI**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
CARLOS DURAND MONTAÑO

TUTOR: DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR, FMVZ. COMITÉ TUTORAL: DR.
OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ, FMVZ, DR. SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE, FMVZ.

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de **Biología de la reproducción** del **Instituto Nacional de Pediatría** (Recurso Federal número 054/2012).

Se contó además con una beca del **CONACYT** para estudios de posgrado con clave de registro: 489059

ASESORES DE TESIS

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Instituto Nacional de Pediatría

COMITÉ TUTORAL

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DR. SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Mario Pérez Martínez

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dra. Ana Delia Rodríguez Cortez

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Margarita Dolores Chávez Saldaña

Instituto Nacional de Pediatría

Julio César Rojas Castañeda

Instituto Nacional de Pediatría

DEDICATORIA

A **Nubia Monserrat**, quien es la persona más importante en mi vida y desde el día que la conocí, siempre me ha apoyado en todo, además, de hacerme crecer como persona en el ámbito laboral y en el familiar. “Te amo”.

A mis padres **Carlos** y **Cirila**, quienes desde un inicio siempre han creído en mí y me han apoyado en todo lo que he realizado desde el día en que nací, permitiéndome realizar todas las metas que me he propuesto. “No me imagino una vida sin ustedes”.

AGRADECIMIENTOS

A la directora de investigación, **Dra. Dolores Correa Beltrán** y el subdirector de Medicina Experimental, **M. C. Heriberto Caballero Ortega**, del Instituto Nacional de Pediatría, por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Rosa María Viguera Villaseñor** y al **Dr. Oscar Gutiérrez Pérez**, por el apoyo y el interés que siempre han mostraron a mi desarrollo académico, además de convertirse en grandes amigos.

A **Pedro Medina Granados** y a **Daniel Adrián Landero Huerta**, por su apoyo en situaciones que no hubiera podido realizar sin ellos.

A todos mis compañeros del **laboratorio de Biología de la reproducción** por el apoyo y cariño que siempre mostraron.

A mi **comité tutorial y al jurado** por las horas que me dedicaron para poder elaborar la tesis.

A **Daniel Santamaría del Ángel**, por su gran ayuda al momento de definir al nitroprusiato como parte para el modelo experimental.

A **Mercedes Edna García Cruz** por su ayuda en las pruebas de ROS y TBARs.

Al **CONACYT**, por el apoyo económico utilizado a lo largo de mi maestría.

Al **Instituto Nacional de Pediatría (INP)**, por permitirme realizar la parte experimental en sus instalaciones.

CONTENIDO

RESUMEN	9
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	10
INTRODUCCIÓN	10
<i>TESTÍCULO</i>	10
<i>Estructura</i>	10
<i>Túbulos seminíferos</i>	10
<i>Tipos celulares</i>	11
<i>Proceso de espermatogénesis</i>	13
<i>Meiosis</i>	16
<i>Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal</i>	16
<i>Patologías que afectan la función reproductiva</i>	17
ANTECEDENTES	18
<i>VARICOCELE</i>	18
<i>Fisiopatología</i>	18
<i>Etiología</i>	19
<i>Clasificación del varicocele</i>	20
<i>Riesgos del varicocele</i>	21
<i>Consecuencias del varicocele</i>	21
<i>Estudio del varicocele a través del uso de modelos animales</i>	27
<i>Mecanismo de acción del nitroprusiato</i>	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	35
MATERIAL Y MÉTODOS	36

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	38
DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN MEDIANTE SUBSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TBARS.....	38
MUERTE CELULAR.....	38
ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO Y ÁREA EPITELIAL.....	39
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE INHIBINA- α , RA Y PCNA, POR INMUNOHISTOQUIMICA.....	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
RESULTADOS.....	42
<i>Morfología del testículo</i>	42
<i>ROS en el testículo</i>	42
<i>Lipoperoxidación en testículo</i>	43
<i>Muerte celular en testículo</i>	43
<i>Histopatología testicular</i>	44
<i>Área de túbulos seminíferos</i>	46
<i>Inmadurez de las células de Sertoli</i>	46
<i>Funcionalidad de las células de Sertoli</i>	48
<i>Proliferación de las células germinales</i>	49
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS.....	58
GLOSARIO.....	67
ABREVIATURAS Y SIGLAS EMPLEADAS.....	68
ANEXO.....	70
Anexo 1. Índice Histopatológico.....	70

RESUMEN

El varicocele (VAR) es la dilatación patológica del plexo pampiniforme y de la vena testicular siendo una de las causas más comunes de infertilidad masculina aun corregida la enfermedad. Su incidencia en la adolescencia y en la etapa adulta es del 15 al 28%, y no se diagnostica antes de los 10 años de edad, lo cual hace suponer que se origina en la adolescencia periodo crítico para el establecimiento de la fertilidad futura. Dentro de los riesgos del VAR se encuentra la hipotrofia testicular, los mecanismos exactos que generan la enfermedad aún se desconocen, aunque se ha propuesto al estrés oxidante (EO) como la principal causa de daño. El objetivo del presente trabajo es determinar si la administración de nitroprusiato (NP), como modelo alternativo del VAR en ratas prepúberes, genera EO afectando la maduración de las células de Sertoli (SC). El NP es un compuesto generador de EO, tal y como se ha observado en el VAR. Por tanto estudiamos el efecto del NP, como modelo alternativo del VAR como generador de EO y sus efectos sobre la maduración de las SC en una etapa prepúber. Se utilizaron 36 ratas macho Wistar de 14 días de edad y se formaron 4 grupos experimentales [Control, Vehículo (solución salina), Nitroprusiato [NP (12mg/kg de nitroprusiato)] y Control ferricianuro [Ctrl FC (12mg/kg de ferricianuro)]. Se realizaron las pruebas de lipoperoxidación, apoptosis, índice histopatológico, área epitelial e inmunohistoquímicas dirigidas a inhibina- α (marcador de inmadurez de las CS), receptor de andrógenos (RA) (marcador de funcionalidad de las CS) y antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). El grupo NP presento una tendencia al aumento de la lipoperoxidación, aumento significativo de radicales libres, de células en apoptosis, de las alteraciones histológicas, de los gránulos de inhibina α , antígeno nuclear de proliferación celular y reducción significativa del área tubular y RA en comparación con los demás grupos experimentales. La aplicación de NP genera EO, tal y como se presenta en el VAR, lo que afecta la maduración de las CS generando una disminución en el número de células germinales.

Palabras clave: Varicocele (VAR), testículo, nitroprusiato (NP), Adolescencia, estrés oxidante (EO), células de Sertoli (CS).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La aplicación de nitroprusiato como modelo alternativo de varicocele, aumentará las concentraciones de especies reactivas de nitrógeno en el testículo de ratas prepúber, manteniendo la inmadurez de las células de Sertoli?

INTRODUCCIÓN

TESTÍCULO

Estructura

Los testículos son órganos pares, cada uno de ellos está situado en un compartimiento individual dentro de la bolsa testicular (escroto) y se encuentra rodeado por una cavidad serosa estrecha que se desarrolla a partir de la cavidad peritoneal. Esta cavidad se halla dentro de la túnica vaginal del testículo, una de las cubiertas testiculares. En los tubos seminíferos del testículo se forman los espermatozoides y en las células de Leydig (CL) se sintetiza la hormona sexual masculina (testosterona) (Figura 1) (Welsch, 2010).

Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos están contorneados y son las estructuras dominantes en los preparados histológicos de testículo. Se cortan a todos los planos posibles, en la mayor parte de los casos la luz está vacía, pero puede contener espermatozoides aislados (Figura 1) (Welsch, 2010).

Dentro de los túbulos seminíferos, el epitelio seminífero está dividido en dos compartimentos que están separados por las uniones estrechas formadas entre las células de Sertoli (CS). Estos reciben el nombre de compartimento basal que se encuentra por debajo de las uniones estrechas y se comunica en grado reducido con el medio matricial del tejido conjuntivo subepitelial, y el compartimento adluminal que se encuentra por arriba de las uniones estrechas en donde hay un medio

cerrado (sobre todo en el aspecto inmunológico) en el que se diferencian las células germinales (CG) a espermatozoides. Por su parte, las uniones estrechas junto con las células mioideas que rodean al túbulo seminífero y la lámina basal, forman la barrera hematotesticular que protege a las CG de factores externos que puedan dañarlas (Welsch, 2010).

Tipos celulares

Dentro de los testículos podemos encontrar los siguientes tipos celulares:

Las CL que están distribuidas en grupos e hileras en el intersticio entre los lobulillos testiculares (Figura 2); se originan del mesénquima intertubular del testículo. Las CL constituyen en conjunto una glándula de secreción interna difusa, ya que sintetizan los andrógenos u hormonas sexuales masculinas, principalmente testosterona (Mendis y Siril, 2001; Parthasarathy y Balasubramanian, 2008a; Welsch, 2010).

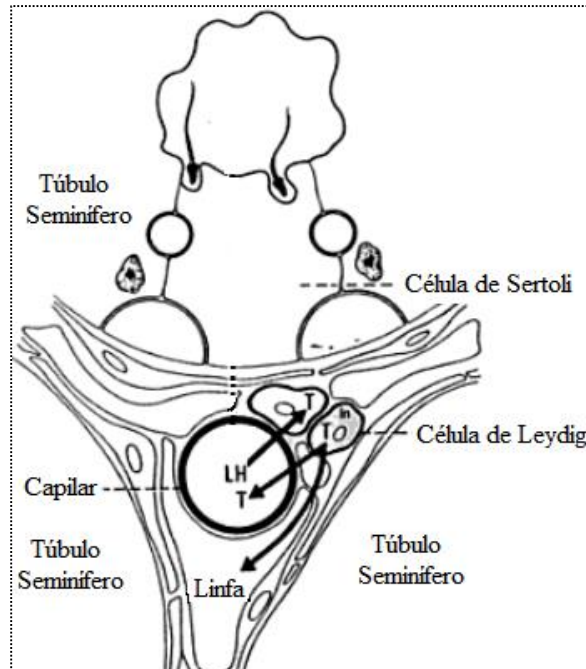


Figura 2. **Epitelio seminífero**, representación esquemática de la ubicación de las células de leydig y de su estimulación para producir testosterona por acción de la hormona luteinizante, Imagen modificada de Álvarez (1989).

Las CS son células contenidas en los túbulos seminíferos brindando soporte estructural y metabólico a las CG durante la espermatogénesis. Al ser estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) estimulan la maduración de los espermatozoides (Figura 3) (Buzzard y col., 2002; Walker y Cheng 2005; Welsch, 2010).

Las CS pasan por diferentes procesos durante el desarrollo del organismo:

- **Diferenciación:** Ocurre en el desarrollo embrionario al diferenciarse a partir de las células mesenquimales.
- **Proliferación:** Consta de dos etapas, la primera se da en el periodo fetal y la segunda en el periodo peripuberal. Existen marcadores con los cuales se puede cuantificar la proliferación de las CS y otros tipos celulares (CG), como el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, por sus siglas en inglés) es una proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. Esta proteína se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de ADN, ya que es un cofactor de la ADN polimerasa delta. Cuando existe daño en el ADN, la proteína PCNA se reubica y participa en la vía de reparación del ADN (Maga y Hübscher, 2003).
- **Maduración:** Se presenta en la etapa adulta y puede ser identificada por la expresión de proteínas [Receptor de andrógenos (RA), Glicoproteína sulfatada-2 (SGP-2)], factores de transcripción [(GATA-1 y 4), gen del tumor de Wilms (WT1)] y las hormonas que producen estas células (Inhibina-B) (Sharp y col., 2003). Por su parte las células inmaduras expresan proteínas (WT1) y hormonas que producen estas células (gránulos de Inhibina- α) (Sharp y col., 2003; Nistal y col., 2011).

Por su parte, el número de CS en el adulto está determinado por el tamaño de ambos testículos y la producción diaria de los espermatozoides. Esto se debe a que cada CS tiene la capacidad para soportar determinado número de CG y esta

capacidad varía entre especies. El número de CS está determinado antes de la edad adulta (Buzzard y col., 2002; Sharpe y col., 2003; Walker y Cheng, 2005).

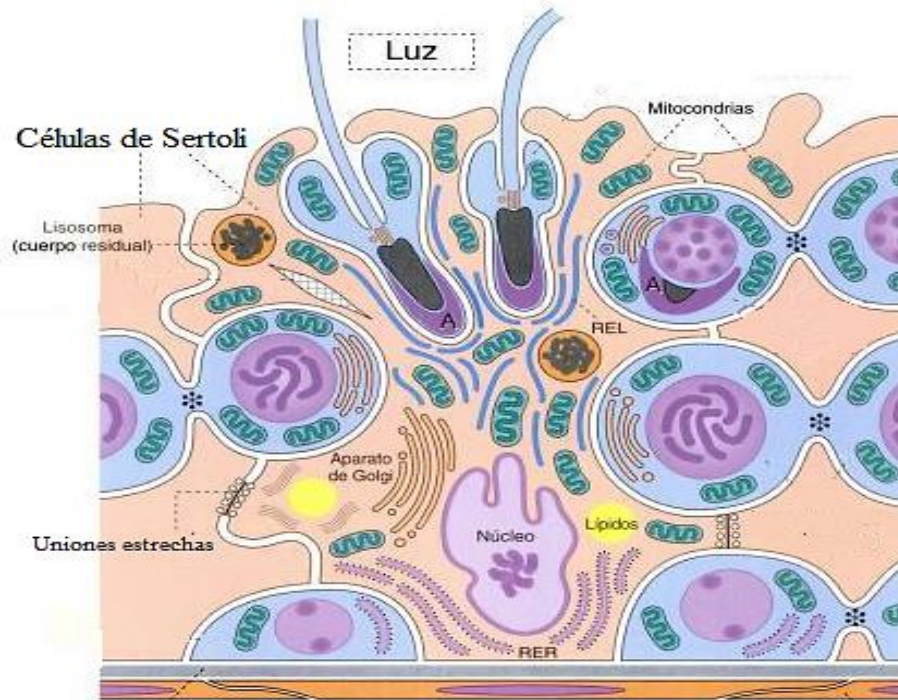


Figura 3. **Epitelio seminífero**, representación esquemática con células de Sertoli (Tomada de Welsch, 2010).

Las CG, que tienen un origen embrionario se diferencian a partir de las CG primordiales, las cuales migran desde el aparato digestivo primitivo hasta la cresta gonadal diferenciándose a *stem cell* y finalizando como gonocitos en el desarrollo embrionario. Estos gonocitos migran desde el centro del epitelio de los cordones seminíferos (túbulos seminíferos antes de formar la luz) y al contacto con la lámina basal se diferencian a espermatogonias, las cuales, entrarán en la espermatogénesis para finalmente diferenciarse a espermatozoides (Solari, 2007; Viguera, y col., 2013).

Proceso de espermatogénesis

A su vez, la espermatogénesis es el proceso fisiológico donde se lleva a cabo la formación y maduración del espermatozoide en los túbulos seminíferos (en la rata tiene una duración de 65 días y en el humano de 64 a 75 días) (Figura 4) y es

estimulada por la acción de las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) que son producidas por las células gonadotropas de la adenohipófisis (Hess, 1999; Johnson y col., 2000; Maeda y col., 2000; Royere y col., 2004; Franca y col., 2005; Málaga y col., 2005; Guyton, 2011).

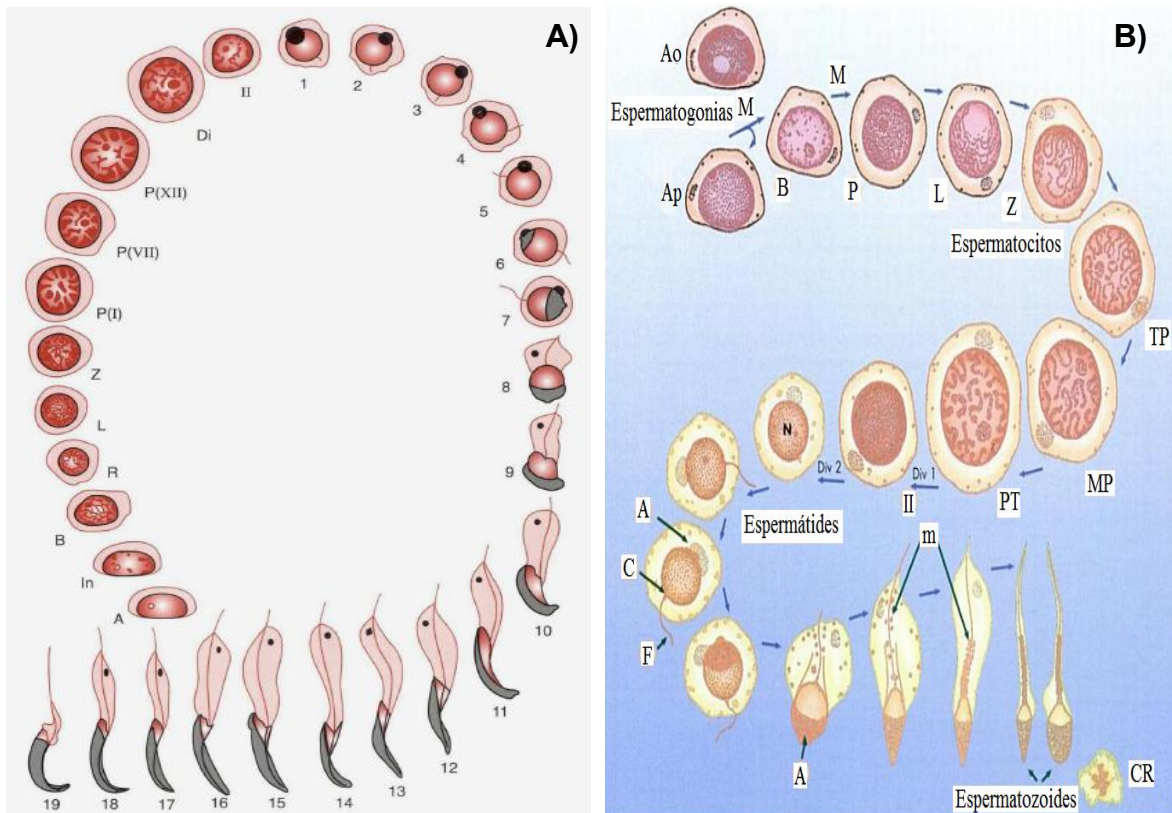


Figura 4. **A) Fases del ciclo celular de la espermatogénesis en la rata.** A, Espermatogonia tipo A; In, Espermatogonia intermedia; B, Espermatogonia tipo B; R, Espermatocito primario; L, Espermatocito en leptoteno; Z, Espermatocito en cigoteno; P (I), P (VII) /P (XII), temprano, intermedio y tardío (Espermatocito en paquiteno). Los números romanos indican la fase del ciclo en el cual se encuentran; Di, Diploteno; II, Espermatocito secundario; 1-19, pasos de la espermiogénesis (Obtenida de Maeda y col., 2000), **B) Fases del ciclo células de la espermatogénesis en humano,** Espermatogonias A: Oscura (Ao), Pálida (Ap), Espermatogonia tardía (B), Mitosis (M), Espermatocitos: Preleptoteno (P), Leptoteno (L), Zigoteno (Z), Paquiteno temprano (TP), Paquiteno medio (MP), Paquiteno tardío (PT), Secundario (II), Primera división de maduración (Div 1), segunda división de maduración (Div 2), Núcleo (N), Acrosoma (A), Centríolos (C), Flagelo (F), Mitocondria (M) y Cuerpo residual (CR) (Tomada de Urbina y Lerner, 2008).

La fase de la espermiogénesis, es el proceso por medio del cual las espermatídes se transforman en espermatozoides maduros; este proceso puede llevarse a cabo en una a tres semanas, dependiendo de la especie. Estas transformaciones

consisten en la condensación y elongación del núcleo que se dirige a la periferia de la célula, la formación del acrosoma a partir de la fusión de las vesículas producidas por el aparato de Golgi, formación del flagelo que se desarrolla a partir del centriolo que se localiza en el polo posterior de la espermátide, reorganización de las mitocondrias y pérdida del citoplasma (Maeda y col., 2000). En un principio, la espermátide tiene la forma de una célula redonda, lo cual no dura mucho ya que la célula comienza a alargarse para finalmente formar el espermatozoide (Figura 5) (Maeda y col., 2000; Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2007; Guyton, 2011).

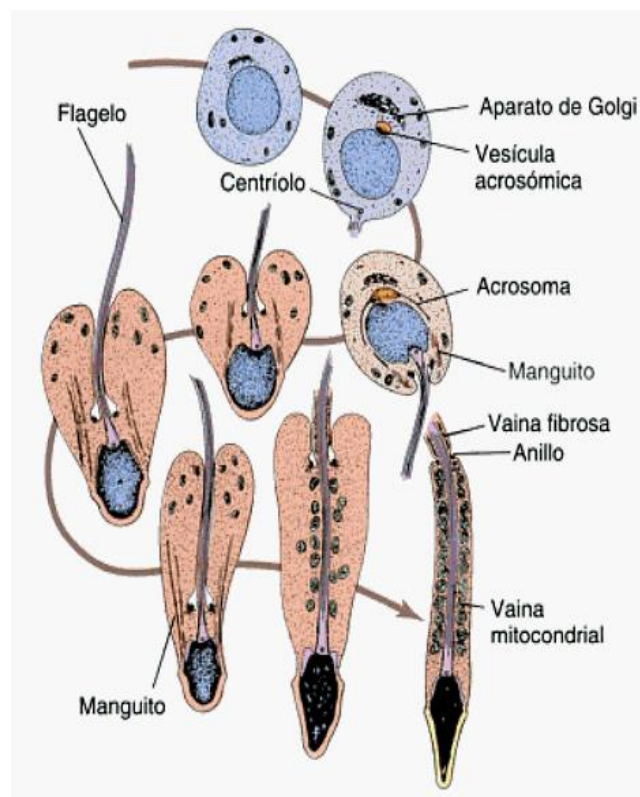


Figura 5. Imagen que muestra las modificaciones en la estructura de los orgánulos de la espermátide en el humano (Espermiogénesis) Tomada de Ross y Pawlina (2007).

La maduración de los espermatozoides en el testículo termina con la fase de espermiación o liberación de estos a la luz del túbulo seminífero, favorecida por los movimientos peristálticos del epitelio seminífero y la participación de las CS. En este momento, los espermatozoides son transportados a la red de *testis* pasando por los conductos eferentes y de allí al epidídimo en donde sufrirán un proceso de

maduración celular que les permitirá adquirir su potencial fecundante y cuyo rasgo más perceptible es la adquisición de la motilidad (Los espermatozoides se almacenan posteriormente en la cauda del epidídimo) (Olivera y col., 2006; Ross y Pawlina, 2007).

Meiosis

Dentro de la espermatogénesis existe otro proceso que atraviesan las CG, que lleva el nombre de meiosis.

La meiosis es un proceso de división celular, el cual, a partir de una célula diploide ($2n$) se generan 4 haploides ($1n$). Este proceso requiere de dos divisiones celulares, meiosis I y meiosis II, ambas comprenden profase, metafase, anafase y telofase. Durante la meiosis I los miembros de cada par homólogo de cromosomas se distribuyen en diferentes núcleos. En la meiosis II, las cromátides hermanas que formaban cada cromosoma se separan y se distribuyen en los núcleos de las células hijas. Las únicas células que sufren el proceso meiótico son las de la línea germinal, es decir, aquellas que van a formar los gametos masculinos y femeninos (Audesirk y col., 2004).

Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal

Las funciones del testículo requieren una integración fisiológica entre elementos neuroglandulares individuales que son ejercidos por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, en donde el hipotálamo segrega la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) de las regiones preópticas y mediobasal que estimula la secreción de LH y FSH por las células gonadotropas de la adenohipófisis (Figura 6) (Samuel y col., 2001; Palacios, 2008).

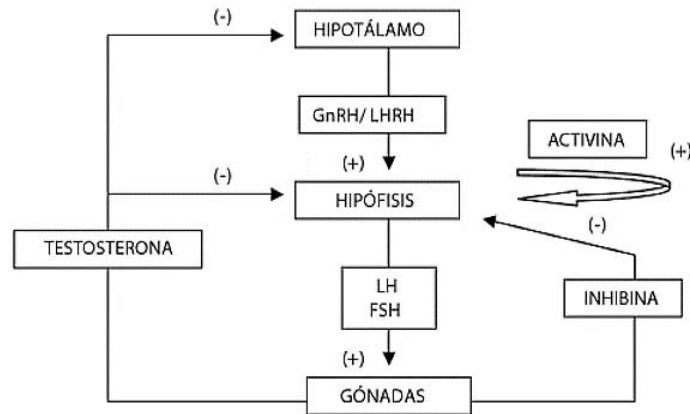


Figura 6. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, modificado de Palacios (2008).

A su vez, la FSH estimula a las CS para la producción de inhibina y la LH actúa sobre las CL, estimulando la síntesis de testosterona (Samuel y col., 2001; Palacios, 2008).

Existen mecanismos de retroalimentación negativa entre los esteroides sexuales testiculares, la hipófisis y el hipotálamo, de manera que al aumentar, inhiben la secreción de GnRH y en consecuencia de las gonadotropinas. De igual manera, la testosterona actúa negativamente interfiriendo con la secreción de la LH, esto debido a que el hipotálamo tiene receptores especializados para el acoplamiento de la testosterona sin necesidad de que esta sea aromatizada. Otra hormona que también tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de FSH es la inhibina, producida por las CS y que es liberada en la última fase de la espermatogénesis (Samuel y col., 2001; Palacios, 2008).

Patologías que afectan la función reproductiva

Al alterar el eje-hipotálamo-hipófisis- gónada pueden originarse varias alteraciones testiculares, las cuales se ven reflejadas en la producción de espermatozoides y por lo tanto disminuye la fertilidad masculina hasta llegar a generar infertilidad, la cual se define como la incapacidad de una pareja, de concebir un hijo después de un

año de relaciones sexuales frecuentes y sin utilizar ningún medio anticonceptivo. Actualmente la infertilidad llega a afectar hasta un 20% de las parejas, en algún momento de su vida reproductiva (Vite y col., 2005; Góngora y col., 2011).

Se estima que del 20 al 50% de la incapacidad de la pareja para poder procrear un hijo es debido a problemas de infertilidad que presentan los varones y el 40% es asociado a ambos (Vite y col., 2005; Góngora y col., 2011). Por esta razón, es muy importante la evaluación de los varones con infertilidad, para estudiar el problema y otorgar un tratamiento que permita al hombre como individuo tener una salud tanto física como mental y abordando los distintos orígenes de la enfermedad.

En la actualidad la infertilidad es causada por diversas etiologías, tal es el caso de la torsión testicular, obesidad, estilo de vida, drogas, fármacos y enfermedades infecciosas del tracto reproductor, como la epididimitis, orquitis, prostatitis y vesiculitis, y patologías de origen idiopático como la criptorquidia y el varicocele (Brugo, 2003; Vite y col., 2005; Rafaela, 2008).

ANTECEDENTES

VARICOCELE

Fisiopatología

El varicocele (VAR) es la dilatación patológica del plexo pampiniforme y de la vena testicular (Figura 7) siendo una de las causas más comunes de infertilidad masculina asociada a una disminución de la cuenta espermática. En la vena testicular izquierda se presenta con una frecuencia hasta del 90%, aunque también se presenta en la vena testicular derecha del 1 al 2% y solo del 1 al 2% se presenta de forma bilateral (Turek y Lipshultz, 1995; Cueva y Echevarría, 2001; Miyaoka y Esteves, 2012).

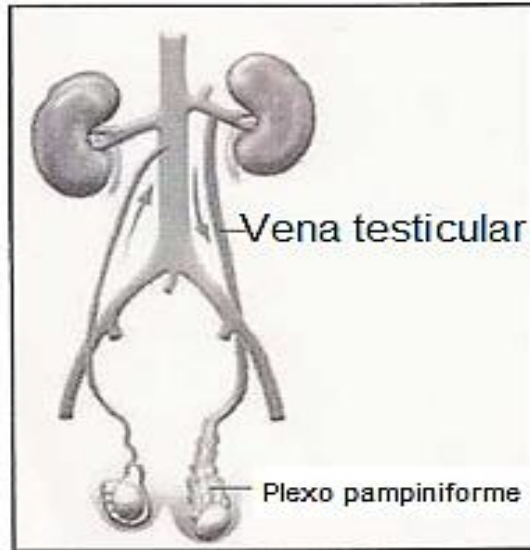


Figura 7. Imagen que muestra la dilatación de la vena testicular izquierda y del plexo pampiniforme varicocele.

Su incidencia en la adolescencia y en la etapa adulta es del 15 al 28% (Pfeiffer y col., 2006; Glasberg, 2007) y en adultos representa hasta el 42% de los individuos diagnosticados con Infertilidad primaria (Naughton y col., 2001; Greenfield y col., 2002; Blumer y col., 2011). Esta anomalía regularmente, no se presenta antes de los 10 años de edad, lo cual hace creer que tiene sus orígenes en la adolescencia.

Etiología

Se han propuesto diversas teorías para tratar de explicar el origen del VAR, una de ellas dice que debido al origen de la vena testicular izquierda esta desarrolla un aumento de presión hidrostática que es transmitido al plexo pampiniforme, provocando que las venas se dilaten y presenten tortuosidad (cascanueces) y probablemente una obstrucción parcial de la vena renal (Paduch, 1999; Naughton y col., 2001; Blumer y col., 2011).

Otra teoría plantea que existen diferencias anatómicas entre la vena testicular izquierda y la derecha, lo que provocará una mayor disposición de la vena testicular izquierda a desarrollar VAR, esto debido a que la vena testicular derecha proviene directamente de la parte inferior de la vena cava, mientras que la vena testicular

izquierda proviene de la vena renal, lo que puede hacerla más susceptible (Paduch, 1999; Naughton y col., 2001; Blumer y col., 2011).

Una tercera teoría propone que la disminución del flujo sanguíneo es causada por la deficiencia de las valvas venosas en la vena testicular, provocando un reflujo de la sangre (Paduch, 1999; Naughton y col., 2001). Se debe señalar que estas teorías no han sido completamente comprobadas y una o más podrían estar involucradas, es por esto que el VAR se considera una enfermedad multifactorial.

Por otra parte, para la clasificación del VAR se han descrito diferentes grados en donde se evalúa al paciente con un examen físico, este debe realizarse con la persona en decúbito supino y de pie, para que pujan y halla una dilatación de la vena testicular y del plexo pampiniforme (maniobras de valsalva) y de esta forma poder ser evaluadas, adicionalmente cuando el VAR es subclínico se realiza un examen de ecografía Doppler (Briceño, y col., 2008).

Clasificación del varicocele

Con base en las características clínicas se clasifica de la siguiente manera:

- Subclínico: No palpable o visible en reposo o maniobras de valsalva, pero se demuestra reflujo en el examen de ecografía Doppler.
- Grado 1: Palpable durante las maniobras de valsalva pero no visible.
- Grado 2: Visible y palpable con maniobras de valsalva.
- Grado 3: Visible y palpable sin maniobras de valsalva.

En estudios realizados en pacientes adultos con fertilidad primaria y secundaria, se ha observado que la infertilidad está asociada al grado del VAR, en muchos casos pacientes con infertilidad primaria padecen VAR de grado III y el daño es muy severo, a diferencia de pacientes con infertilidad secundaria en donde el grado del

VAR varia y no necesariamente va a desarrollar problemas de fertilidad (Mori y col., 2008).

Riesgos del varicocele

Dentro de los riesgos del VAR se encuentra la hipotrofia testicular (disminución del volumen del testículo). Los mecanismos exactos que generan la enfermedad aún se desconocen, aunque se han estudiado varios factores producidos por el VAR que parecen participar en la misma, como son la temperatura, la presión venosa, hipoxia, reflujo de metabolitos que provienen del riñón y de la adrenal, estrés oxidante (EO) y alteraciones endocrinas (Glezerman y col., 1976; Naughton y col., 2001; Vásquez, 2004; Khera y Lipshultz, 2008; Blumer y col., 2011). A su vez, el riesgo del VAR a largo plazo como se ha visto en pacientes que llegan a las clínicas debido a su incapacidad de procrear un hijo y a los que son canalizados por detección casual en la adolescencia, es la capacidad de esta enfermedad de ir evolucionando generando un mayor daño con el transcurso del tiempo. Esto lo hace una patología progresiva que si no es detectada a tiempo puede llegar a generar un mayor daño testicular que se verá reflejado en la disminución del tamaño testicular y de los parámetros seminales (Briceño, y col., 2008; Blumer y col., 2011).

Consecuencias del varicocele

Hipoxia

Como ya se sabe, el VAR provoca un reflujo sanguíneo a nivel de la vena testicular que puede ocasionar hipoxia y un aumento de la temperatura en el testículo por el estacionamiento sanguíneo en el plexo pampiniforme, siendo la hipoxia un estado de deficiencia de oxígeno en la sangre, células y tejidos, esta deficiencia detona la producción de factores de la familia inducible de hipoxia, como la HIF-1 que regula varias respuestas fisiológicas, ejemplo de ello son: la vasodilatación, angiogénesis, eritropoyesis y glucólisis (Lee y col., 2006).

Estrés oxidante

Se ha considerado que la exposición a hipoxia puede llegar a producir un gran estrés fisiológico induciendo respuestas celulares que resultan en efectos que pueden llegar a dañar ciertos tejidos, lo que se ha atribuido principalmente a la generación de radicales libres (RL), que resultan en la alteración de ciertos procesos celulares.

En determinadas circunstancias, la producción de RL puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de EO. El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de estos radicales (Venereo, 2002).

El EO ocurre en los organismos que, por mala nutrición, enfermedad u otras causas, pierden el equilibrio entre RL y antioxidantes. Es en esta situación de EO en la que se manifiestan las lesiones que producen los RL, que reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular (Venereo, 2002).

Por su parte, la membrana celular es una de las más afectadas por el daño ocasionado por el EO, esto por estar constituida por ácidos grasos insaturados que la hacen susceptible a lipoperoxidación. El daño de la membrana celular incrementa su permeabilidad permitiendo la inactivación de diversos sistemas moleculares (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN) (Bustos y col., 2010).

En el caso de la hipoxia crónica desarrollada en el VAR, existen estudios en donde se ha observado una disminución de los parámetros seminales por la presencia de especies reactivas de nitrógeno (ERN) en el eyaculado (hasta en un 77% de los pacientes) y un aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO), y ERN en la vena

testicular en comparación con las concentraciones periféricas, por lo que los daños reportados se han asociado básicamente al EO permanente ocasionado por los RL (Glezerman y col., 1976; Naughton y col., 2001; Vásquez y col., 2009; Zepeda y Farías, 2013).

Radicales libres

Los RL son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el RL ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que lo pierde se convierte a su vez en un RL por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivientes (Venereo, 2002).

Como producto de nuestro metabolismo se generan distintos tipos de RL, tales como: ERO: anión superóxido, anión peróxido, el radical perhidroxilo, radical hidroxilo y ERN: óxido nítrico, radical peroxinitrito (ONOO^-) y ácido peroxinitrito (HONOO^-). Cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica, retículo endoplásmico y macrófagos. Los RL también son generados por factores como: la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Ingrid y col., 2005; Maldonado y col., 2010; Aprioku, 2013).

Óxido nítrico

Por su parte, el óxido nítrico (ON,) es un RL pequeño e hidrofóbico capaz de pasar a través de la membrana de las células y que es sintetizado por la óxido nítrico sintetasa (NOS, por sus siglas en inglés) a partir de la L-arginina y tiene varios roles que son esenciales en los mamíferos trabajando como mensajero intracelular e

intercelular en varios sistemas biológicos (Murphy, 1999; Fujisawa y col., 2000; Huang y col., 2012).

NOS está clasificado en varias isoformas: NOS endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés), NOS neuronal (nNOS, por sus siglas en inglés), NOS inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) y NOS mitocondrial (mtNOS, por sus siglas en inglés), el cual se cree que es una modificación de nNOS, todos estos tipos de NOS se han reportado estar presentes en el órgano reproductor masculino, en donde eNOS está presente en testículo, epidídimo y conductos deferentes, mientras que nNOS ha sido identificado en CL e iNOS en CS. Tanto eNOS y nNOS son tipos constituyentes de NOS y se expresan de manera normal en todos los tejidos a diferencia de iNOS que se expresa en macrófagos, esto inducido por citosinas y endotoxinas en el caso de reacción inflamatoria y otras condiciones anormales, además, se ha encontrado que iNOS no es específica de macrófagos y que también es expresada en células como hepatocitos, musculo estriado y más recientemente en el citoplasma de las CL. Las concentraciones de NOS están reguladas por el calcio, en donde eNOS y nNOS en concentraciones normales de calcio están inactivas, en contraste con iNOS que limita su producción de ON a la cantidad de enzima o al sustrato de cofactores presentes (Murphy, 1999; Fujisawa y col., 2000; Huang y col., 2012).

A su vez los efectos del ON son dosis dependiente; en concentraciones adecuadas actúa como mediador de funciones fisiológicas, mientras que a niveles elevados puede ser dañino a través de moléculas producidas como: peroxinitrito (ONOO^-). El ONOO^- se forma cada vez que ON y el ion súper oxido (O_2^-) se producen simultáneamente y puede dañar moléculas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y también puede oxidar a las mitocondrias. El ON suele competir con la enzima súper oxido dismutasa (SOD) para reaccionar con O_2^- , otro radical que se forma es el ácido peroxinitrito HONOO^- el cual puede difundir a través de la membrana y causar daño a las células (Murphy, 1999; Fujisawa y col., 2000; Huang y col., 2012).

El ON también puede causar EO por otras vías, ejemplo de ello son los óxidos de nitrógeno que se forman principalmente en los lípidos de las membranas. El ON intensifica el EO provocado por el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), a pesar de que el ON causa daño al provocar EO también puede llegar a proteger al captar algunos RL tal como el radical hidroxil (OH), convirtiéndolas en moléculas menos dañinas (Murphy, 1999; Fujisawa y col., 2000; Huang y col., 2012).

ON y cadena respiratoria

Se ha observado que el ON afecta la cadena respiratoria y que afecta principalmente al citocromo c oxidasa (COX o complejo IV), en donde este radical se une al sitio de unión binuclear (hemo a_3/Cu_B) del oxígeno de dicho complejo. La exposición a ON por periodos cortos de tiempo y a concentraciones fisiológicas, inhibe rápidamente al complejo IV mitocondrial de una manera reversible y competitiva. Se ha propuesto que el probable significado fisiológico de esta interacción podría ser la regulación de la producción de H_2O_2 , la regulación de la liberación del citocromo c durante la apoptosis y la prevención de la hipoxia en tejidos vivos mediante la inhibición de la respiración mitocondrial, con lo cual se extienden los gradientes de difusión del O_2 provenientes de los vasos sanguíneos permitiendo que el O_2 difunda hasta células más distales (Murphy, 1999; Saavedra y col., 2004).

Por el contrario, la exposición durante tiempos prolongados al ON promueve una inhibición progresiva de la respiración que se vuelve irreversible con el transcurso del tiempo. Bajo estas condiciones, el complejo I es inhibido de manera específica y este efecto no puede ser prevenido ni por la adición de SOD o el atrapador de $ONOO^-$: metionina, lo que en último término se refleja en la inhibición de la cadena respiratoria y la respiración celular (Murphy, 1999; Saavedra y col., 2004). Por otro lado la cadena respiratoria es la principal fuente generadora de O_2^- en las mitocondrias de los mamíferos a nivel de los complejos I y III así el ON puede reaccionar fácilmente con O_2^- para formar el RL $ONOO^-$. El $ONOO^-$ puede a su vez

reaccionar con grupos tiol (SH) de residuos de cisteína (s-nitrosilación) y grupos OH de residuos de tirosina (nitración). Este hecho implica que el ON también puede actuar a nivel de las mitocondrias a través de la formación de ERN. De modo que, un aumento en la producción de O_2^- por la inhibición de la cadena respiratoria o por la disminución de la actividad de los sistemas antioxidantes (durante el EO), junto con una producción sostenida de ON por parte de nNOS, eNOS, iNOS y mtNOS o por la activación de los macrófagos, puede dar lugar a una importante formación de $ONOO^-$ (Murphy, 1999; Saavedra y col., 2004).

ON y muerte celular

Dentro de los factores que promueven la muerte celular, también podemos encontrar al ON, que como ya vimos puede causar daño del ADN (activando la vía intrínseca de la apoptosis) y una disrupción del metabolismo energético, interfiriendo con la homeostasis del calcio y la función mitocondrial, situaciones que pueden llevar a las células a la muerte, ya sea por apoptosis o por necrosis, dependiendo del daño causado por este radical. Como lo mencionamos el ON inhibe rápidamente a la citocromo c oxidasa mitocondrial, y de esta forma estimula la producción de ERO, en donde su sobreproducción provoca la expresión exagerada de la proteína p53 y de la ceramida (factores que inducen la apoptosis) (Agarwal y col., 2009; Blumer y col., 2011).

Antioxidantes

Los antioxidantes están constituidos por un grupo de sustancias, las cuales, se presentan en bajas concentraciones con respecto a los RL, retrasan o previenen significativamente la oxidación de las moléculas. Los antioxidantes impiden que las moléculas se unan al oxígeno y las ERO, al inactivar a los RL, ya que le ceden un e^- oxidándolo y transformándolo en un RL débil no tóxico y que en algunos casos, puede regresar al RL a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Obviamente, no todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a

su vez reaccionan con los RL. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios (Venereo, 2002; Ramos y col., 2006; Ingrid y col., 2005).

Existen diferentes tipos de antioxidantes. Los primarios que tienen la función de prevenir la formación de RL, los secundarios que tienen la función de atrapar a los RL y los terciarios que reparan a las biomoléculas cuando estas ya han sido dañadas por los RL:

Primarios	<ul style="list-style-type: none"> • Superóxido dismutasa (SOD). • Glutación peroxidasa (GPx), Glutación reductasa (GR), Glutación S-transferasa (GST) y glutación peroxidasa dependiente de selenio (Se-GPx). • Proteínas de unión a metales (ferritinina, ceruloplasmina, etc.) • Catalasas
Secundarios	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamina E (α-tocoferol). • Vitamina C (ascorbato). • Beta carotenos. • Ácido úrico. • Bilirrubina. • Albumina
Terciarios	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas reparadoras de ADN. • Metionina sulfóxido reductasa.

Estudio del varicocele a través del uso de modelos animales

El manejo de los modelos animales en enfermedades humanas como en el VAR ha sido de gran utilidad en distintas áreas de la investigación, constituyendo uno de los pasos fundamentales en la medicina actual. Su utilización tiene su fundamento en el hecho de considerar a otras especies animales como modelos en miniatura de los problemas humanos. Se han realizado experimentos con animales básicamente en tres campos: la docencia, la industria y la investigación. En la investigación, se han desarrollado modelos de animales para evaluar enfermedades, producir drogas

o vacunas, como fuente donante de células y órganos, así como proteínas sanguíneas o anticuerpos entre muchas otras (Rodríguez, 2007).

En el humano el VAR es una patología que es muy difícil de estudiar, debido a que, la adquisición de tejido testicular con propósitos experimentales, éticamente no está permitido, además que el control de variables no es absoluto, es por eso que se han desarrollado modelos de VAR quirúrgico, empleando ratas, conejos y perros (Joop y Cees, 1989; Turner, 2001; Saalu y col., 2009).

Uno de los principales problemas en la inducción de VAR quirúrgico en estos modelos, es la disposición de la vena testicular, la cual, no siempre presenta la misma anatomía, además de que cada especie tiene sus complicaciones (Joop y Cees, 1989; Turner, 2001; Saalu y col., 2009). La desventaja con el uso de cada especie se cita a continuación.

- Rata. Presenta una disposición venosa muy complicada, además de que en su parte más baja de la vena testicular muestra un grupo de venas que desembocan directamente en la vena cava, permitiendo que se libere la presión venosa e impidiendo que se desarrolle el VAR (Turner, 2001; Saalu y col., 2009).
- Conejo. Presenta tres disposiciones de la vena testicular, de las cuales solo una es la adecuada para poder inducir VAR quirúrgico, haciéndolo impredecible y poco útil cuando se tiene un número limitado de animales (Turner, 2001).
- Perro. Este modelo desarrolla VAR, pero con el transcurso del tiempo el animal recupera el flujo sanguíneo normal (se desconoce porque) (Joop y Cees, 1989).

Debido a estos inconvenientes y a que no existen antecedentes de un modelo farmacológico que permita el estudio del daño al testículo por la generación de EO, se desarrolló un modelo farmacológico en individuos prepubers, utilizando como modelo experimental a la rata (Wistar), a la cual se le administró nitroprusiato (NP) vía red de *testis* para generar EO en el testículo, emulando la generación de RL presentes en el VAR. Lo anterior basado en estudios, en donde la utilización de NP como donador de ON permite la permeabilización de la membrana de las células intestinales permitiendo el aumento de la absorción por parte de estas, como vasodilatador para liberar la presión sanguínea y generador de daño por EO en el cerebro (Ballesteros y col., 2003; Prigol y col., 2009; Takizawa y col., 2013).

La elección de este modelo animal, se debió a que ha sido utilizado de manera exitosa, para realizar estudios sobre el efecto de la administración o exposición a fármacos durante la gestación, lactancia o etapas postnatales tempranas y su efecto sobre la reproducción (Arch y col., 2004).

Es aceptado que la utilización de animales juveniles, permiten obtener datos, que animales adultos no lo permiten. Por lo tanto, varios comités internacionales apoyan la utilización de animales jóvenes para valorar el efecto de diferentes fármacos en los procesos del continuo desarrollo postnatal (por ejemplo, en estudios del sistema nervioso central, aparato reproductor y sistema inmune). Por otra parte, en los mamíferos el aparato reproductor presenta una maduración lenta y alcanza su máxima funcionalidad inmediatamente antes del inicio de la edad adulta, además de compartir una estructura y una regulación hormonal afín entre las diferentes especies.

Por lo tanto, los datos obtenidos en este tipo de estudios aumentarán el conocimiento de las diferencias cinéticas y/o toxicológicas que la utilización de una droga representa entre individuos jóvenes y adultos (Baldrick, 2004; Herráez y col., 2004).

Mecanismo de acción del nitroprusiato

El NP es un potente vasodilatador utilizado ampliamente en el área clínica y de la investigación, en muchas investigaciones es utilizado como donador de ON (Figura 8) (Tinker y Michenfelder, 1976), como en el caso del estudio de la absorción de agua en la mucosa ileal, en donde el ON donado por el NP ayuda a que aumente la absorción del agua y como regulador de la energía dependiente del transporte de calcio en las mitocondrias del musculo uterino (Takizawa y col., 2013; Danylovyh y col., 2014).

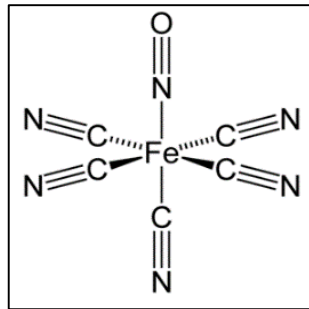


Figura 8. Estructura del nitroprusiato

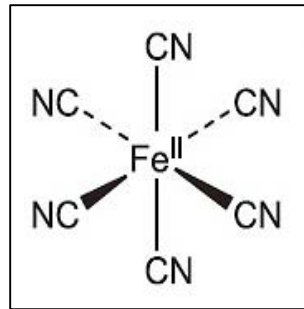


Figura 9. Estructura del ferricianuro

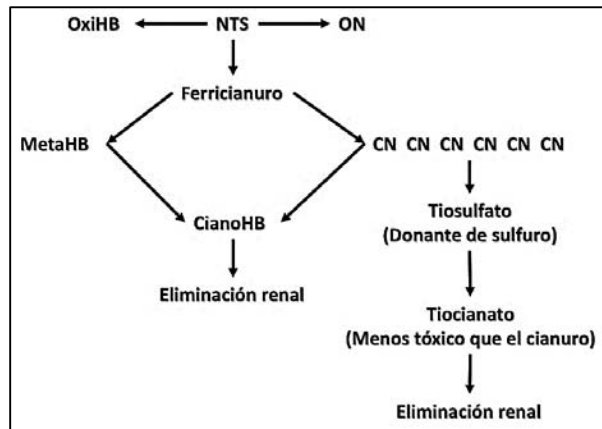


Figura 10. Síntesis de óxido nítrico a partir de nitroprusiato. Oxihemoglobina (oxiHb), Metahemoglobina (metaHb) y Cianohemoglobina (CianoHb).

A su vez, a partir del NP se genera ferricianuro (FC) (Figura 9) (Manzoni y col., 1992; Silva y col., 2014) la cual es una molécula muy activa y toxica que puede influir en algunos mecanismos celulares por la liberación de cianuro (Figura 10), que es capaz

de inducir la generación de ERO por la inhibición de la cadena respiratoria a nivel del complejo V, permitiendo de este modo la liberación de electrones de los complejos I y III permitiendo la formación de RL (Chen y col., 2003; Castro y Moreno, 2005; Leavesley y col., 2008).

JUSTIFICACIÓN

El VAR es una patología muy frecuente, crónica y progresiva que se presenta generalmente en la adolescencia, afecta la fertilidad masculina disminuyendo los parámetros seminales. Debido a que el VAR es asintomático se diagnostica regularmente hasta la etapa adulta, a excepción de algunos casos en los cuales los pacientes acuden a las clínicas para realizarse un examen general o por dolor a nivel inguinal, permitiendo un diagnóstico temprano durante la adolescencia, lo cual ha hecho suponer que éste padecimiento tiene su origen en esta etapa, periodo crítico en el cual se ha observado que se ven alterados mecanismos que afectan el desarrollo testicular.

Dentro de los riesgos del VAR se encuentra la hipotrofia testicular, los mecanismos exactos que generan la enfermedad aún se desconocen, aunque se ha propuesto al EO como la principal causa del daño. Por otro lado, existen estudios del VAR en donde se ha detectado una disminución de las concentraciones de testosterona por el daño que presentan las CL, a lo que se puede atribuir la presencia de RL, situación que nos hace pensar que posiblemente esta enfermedad realmente no tiene sus orígenes en la adolescencia, sino en la etapa pre-puber, periodo crítico en el que los diferentes tipos celulares del testículo se pueden ver alterados, debido a que estas bajas concentraciones de testosterona, nos indican que cierto porcentaje de CL siguen siendo funcionales y probablemente puedan seguir actuando induciendo la producción de factores por parte de las CS, para que se lleve a cabo la espermatogénesis, ya que como se sabe el hecho de desarrollar VAR no asegura que un paciente vaya a ser infértil.

Para conocer acerca de los orígenes y la fisiopatología del VAR en este trabajo proponemos indagar sobre los orígenes de esta patología en una etapa pre-puber, periodo que no ha sido estudiado debido a que no existen antecedentes clínicos que respalden esta teoría.

Por otra parte, hay que aclarar que el EO no actúa de forma selectiva y que puede afectar los diferentes tipos celulares del testículo y no solo a las CL, permitiendo

proponer a las CS como posible blanco y dirigir este estudio a las implicaciones que puede acarrear esta situación, debido a que las CS son las que dan sostén a las CG permitiendo que se lleve a cabo la espermatogénesis, además de que no existen estudios enfocados a las CS en esta patología.

Es por esto que el presente trabajo busca explorar el riesgo potencial del EO y las implicaciones que este supondría al afectar los diferentes procesos de las CS mediante un modelo alternativo de VAR utilizando NP, el cual fue administrando vía red de *testis* emulando la generación de RL parecido a lo que sucede en el VAR.

Sugerimos que lo anterior permitirá, en un futuro buscar posibles alternativas de tratamientos que ayuden a disminuir el daño de las CS ocasionado por el EO, para de esta manera mejorar la calidad espermática de los pacientes que presentan esta enfermedad.

HIPÓTESIS

La administración de nitroprusiato generará estrés oxidante en el testículo manteniendo a las células de Sertoli inmaduras y repercutiendo en una disminución en el número de las células germinales, en ratas prepúbers.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración de nitroprusiato, como modelo alternativo de varicocele, genera estrés oxidante afectando la maduración de las células de Sertoli.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Corroborar la generación de radicales libres por la técnica de ROS.
- Determinar la presencia de lipoperoxidación de manera indirecta midiendo las concentraciones de malondialdehído, por la técnica de TBARS.
- Evaluar el índice de apoptosis presente en las células testiculares por la técnica de TUNEL.
- Evaluar el daño testicular utilizando el índice histopatológico.
- Determinar si las células de Sertoli se mantienen inmaduras a través de la inmunoreactividad a inhibina α .
- Evaluar la funcionalidad de las células de Sertoli a través de la inmunoreactividad al receptor de andrógenos.
- Evaluar el índice de proliferación de las células germinales a través de la inmunoreactividad al antígeno nuclear de proliferación celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de un modelo alternativo se utilizaron 36 ratas macho Wistar de 14 días de edad, se mantuvieron en condiciones de luz oscuridad de 12h x 12h con libre acceso a comida y agua, se distribuyeron de manera aleatoria en 4 grupos experimentales con una N=9 cada uno: grupo Nitroprusiato [NP (12mg/kg de nitroprusiato)], grupo control ferricianuro [Ctrl FC (12mg/kg de ferricianuro)], grupo Vehículo (solución salina) y el grupo control. A los grupos NP, Ctrl FC y vehículo se les administró las diferentes soluciones de forma retrograda por medio de inyección intra red de *testis*, utilizando una jeringa HAMILTON de 10 µl y sustituyendo la aguja por un capilar de vidrio (D.A. 1.5-1.6mm) el cual fue calentado para darle una menor circunferencia a la punta.

Para la aplicación de la solución, las ratas fueron anestesiadas con hidrocloreto de xilazina (5mg/kg) y ketamina (80mg/g), ambas por vía intramuscular. Como analgésico se utilizó dipirona (5mg/kg), cada 24h, vía intramuscular.

Una vez anestesiadas y previa antisepsia de la región abdominal se efectuó una incisión en la región inguinal izquierda para exponer el testículo ipsilateral y aplicar el NP, Ctrl FC o vehículo dependiendo del grupo experimental. Posteriormente se suturaron por capas en un plano con prolene 6-0.

Cinco horas más tarde se seleccionaron de manera aleatoria 3 animales de cada grupo y se les practicó la eutanasia mediante sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/kg) y se extirpó el testículo izquierdo para realizar las técnicas de ROS, TBARS y TUNEL (Figura 11).

A los 20 días de edad, a los animales restantes se les practicó la eutanasia y de igual forma se extirpó el testículo izquierdo para realizar la evaluación del índice histopatológico, el área epitelial y la determinación de la expresión de Inhibina- α , RA y PCNA (Figura 12).

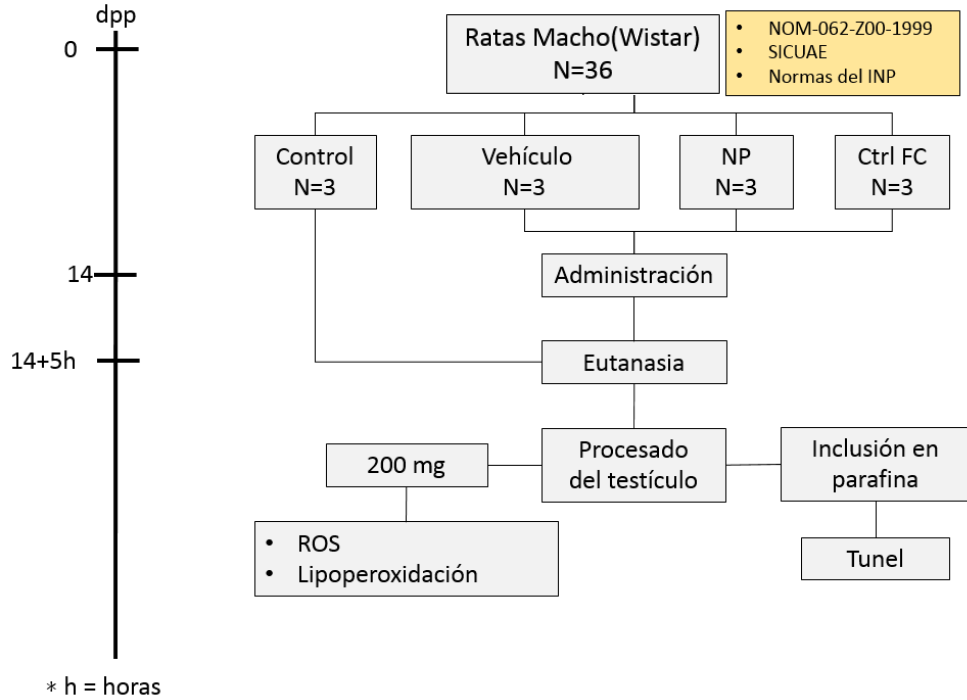


Figura 11. Flujograma de actividades a desarrollar en la fase experimental (Eutanasia a las 5h después de la medicación). dpp: días post-parto.

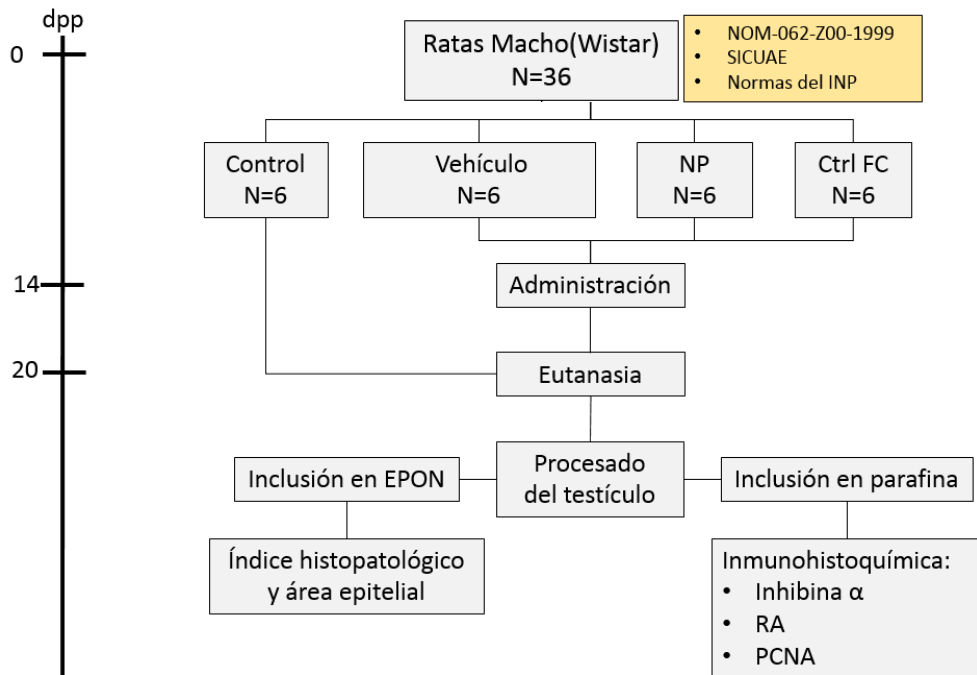


Figura 12. Flujograma de actividades a desarrollar en la fase experimental (Eutanasia a los 6 días después de la medicación). dpp: días post-parto.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las ERO fueron determinados por el método basado en la formación de 2´7´-diclorofluoresceína (DCF) en el tejido testicular, adaptado para experimentos *in vivo*. Los resultados fueron expresados como mg/DCF/mg de proteína/ml. Para la determinación de ERN se utilizó la siguiente fórmula: ERN=concentración de RL del grupo NP-concentración de RL del grupo Ctrl FC, lo que nos permitió descartar las ERO producidas por el cianuro.

DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN MEDIANTE SUBSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TBARS.

La lipoperoxidación se evaluó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico de acuerdo a la técnica modificada, previamente descrita para estudios *in vitro* (Ríos y Santamaría A., 1991). Alícuotas de 1 ml conteniendo el homogenizado del epidídimo fue mezclado con 2ml del reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0.375g de TBA + 15g de ácido tricloroacético + 2.5ml de ácido clorhídrico concentrado en 100ml de agua) y la solución final fue calentada en baño maría durante 30min. Después de que las muestras fueron colocadas en hielo, fueron centrifugadas a 3000 g durante 15min., en el sobrenadante se midió la absorbancia por espectrofotometría a 532nm. Las concentraciones de TBARS fueron calculadas por interpolación en la curva estándar de oxidación periódica de 2-deoxy-D-ribosa. Los resultados finales fueron expresados como nmoles de TBARS/mg de proteína.

MUERTE CELULAR

Las muestras de testículo fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 18h. Posteriormente se procesaron para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 4µm de grosor, colocándose en portaobjetos previamente

cubiertos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Las laminillas se desparafinaron e hidrataron en alcoholes graduales. Para lograr la identificación de las CG, en primer lugar se contrastaron con DAPI de la siguiente forma: se lavaron con solución balanceada de Hanks y se incubaron con DAPI (SIGMA, México) en una concentración de 1µg/ml, posteriormente se incubaron en proteinasa K durante 30m, y se les colocó una solución de bloqueo de H₂O₂ al 0.3% en metanol. Se lavaron con PBS y se incubaron en una solución permeabilizadora de tween-20. Se lavaron con PBS y una laminilla, que sirvió como control positivo, se incubó con DNasa y se lavó en PBS incubándose posteriormente en la solución de TUNEL (Roche Diagnostic Corporation, USA). Se lavaron con PBS y se montaron para su observación al microscopio de fluorescencia. Se determinó el índice apoptótico (IA) en cortes transversales considerando el número de células apoptóticas en relación a la población total de las células por tubo y se contaron al menos 50 tubos seminíferos por animal.

ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO Y ÁREA EPITELIAL

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

El análisis histológico se realizó por un observador auxiliándose del microscopio óptico. Por cada animal se observaron 30 secciones transversales de tubos seminíferos. Se evaluó el testículo mediante una escala de cuantificación otorgando un valor según el daño. El índice histopatológico (IH) fue evaluado mediante la sumatoria del puntaje asignado por daño histopatológico (Anexo I).

La determinación del área del epitelio seminífero se realizó evaluando un mínimo de 30 secciones transversales, mediante el sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 5.1).

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE INHIBINA- α , RA Y PCNA, POR INMUNOHISTOQUIMICA

La expresión de inhibina- α , RA Y PCNA se determinó por inmunohistoquímica del antígeno correspondiente. Para ello las muestras testiculares tomadas en el momento de la eutanasia fueron fijadas en paraformaldehído al 4% por 18h y procesadas para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 4 μ m de grosor, colocándose en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Las laminillas se rehidrataron y fueron incubadas por 10min. en peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear las peroxidasa exógenas, inmediatamente se le realizó un lavado con agua destilada de 5min. seguido por un tratamiento de citrato de Na al 0.01M por 15min. para el desenmascaramiento del factor a analizar. Después de este tiempo se lavaron en PBS 0.01M y se procedió a permeabilizar con solución PBS/tween 20 al 0.1% por 10min., luego se incubaron con el anticuerpo primario (1:50) para cada una de las proteínas propuestas (Inhibina- α : Anticuerpo Monoclonal purificado de ratón, Dako, clone R1; RA: Anticuerpo policlonal purificado de conejo, Santa Cruz, Biotechnology, CA USA, sc-816; PCNA: Anticuerpo policlonal purificado de cabra, Santa Cruz, Biotechnology, CA USA, sc-7907), por toda la noche (una laminilla por marcador analizado). Se lavaron para retirar excedentes con PBS/tween 20 al 0.1%. El bloqueo inespecífico se efectuó con BSA/PBS/tween 20 al 5% por 2h. Posteriormente se incubó con anticuerpo biotilado (1:200) durante 2h (Biotinylated, anti-goat IgG, Santa Cruz, Biotechnology, CA USA). Pasado este tiempo se lavó con PBS/tween 20 al 0.1% y se procedió a incubar por 1h en el Complejo Avidina-Biotina. Se lavó con PBS/tween 20 al 0.1%. El revelado de las muestras se llevó a cabo con diaminobenzidina (DAB) de 15 a 30s, y se contrastaron con hematoxilina durante 5s. Posteriormente se deshidrataron y se aclararon en xilol un tiempo de 10min. e inmediatamente se montaron con entelan (MERCK). Se evaluaron al microscopio óptico un mínimo de 30 túbulos transversales por animal para cuantificar la cantidad de gránulos de inhibina- α , la cual se cuantificó por el número de gránulos de inhibina- α por cada 10000 μ m². A su vez la cuantificación de RA y PCNA se evaluó contando un mínimo

de 30 cortes transversales, utilizando la siguiente formula: % de cel. positivas x túbulo seminífero = (número de cel. Positivas/total de cel.) x 100.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados no paramétricos se procesaron con una prueba de U de Mann-Whitney y los paramétricos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de “Tukey”, considerando una $p < 0.05$ como diferencia significativa.

RESULTADOS

Morfología del testículo

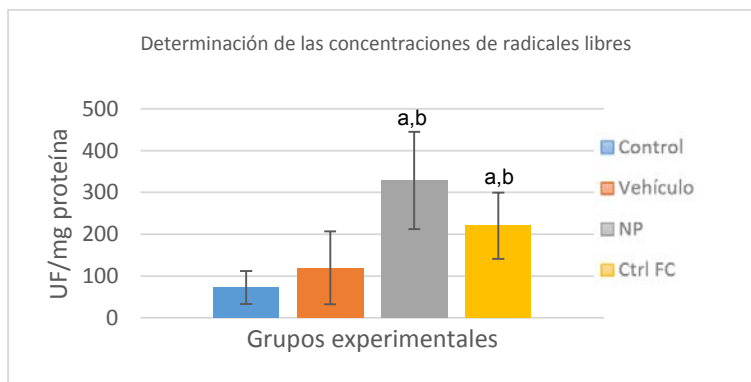
Durante la exploración no se encontró diferencia anatómica evidente entre los grupos. El peso testicular no mostró diferencia significativa entre los diferentes grupos experimentales ($p > 0.05$), gráfica 1.



Gráfica 1. Peso testicular, $\bar{X} \pm ES$. NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

ROS en el testículo

El análisis de ROS, mostró diferencia significativa del grupo NP al compararlo con el grupo control ($p < 0.05$). Observándose que el grupo NP presenta una mayor concentración de ROS (Gráfica 2).



Gráfica 2. Concentraciones de radicales libres, $\bar{X} \pm ES$.

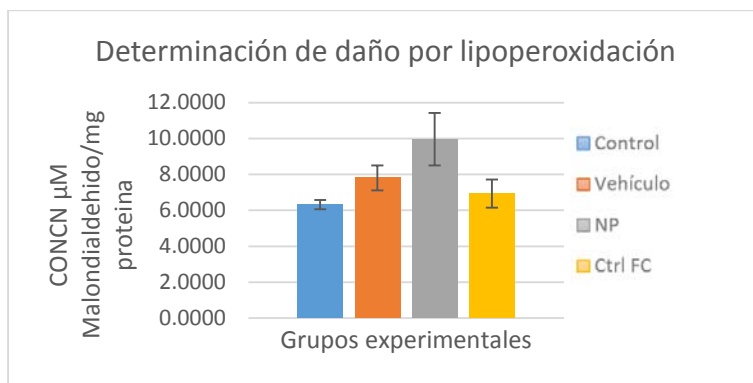
NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

^aDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar vehículo, NP y Ctrl FC vs control.

^bDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs vehículo.

Lipoperoxidación en testículo

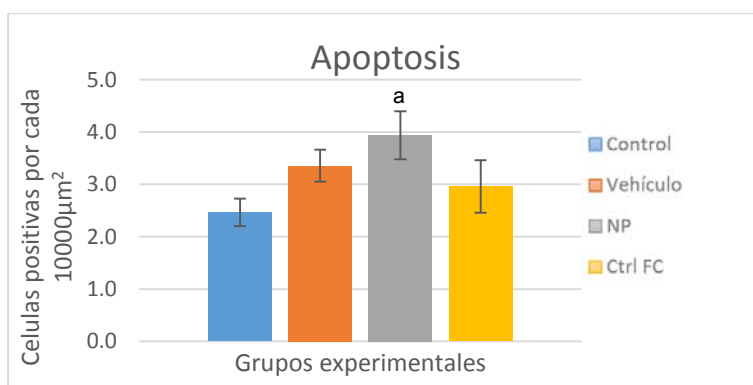
El grupo NP no presentó diferencia estadística significativa al compararlo con los diferentes grupos experimentales, pero aparentemente existe una tendencia por parte de este grupo a ser mayor que los demás grupos experimentales numéricamente (grafica 3).



Grafica 3. Determinación de daño por lipoperoxidación, $\bar{X} \pm \text{ES}$.
NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.
No hay #

Muerte celular en testículo

El grupo NP presento un mayor número de células en apoptosis en comparación con el grupo control con una significancia de $p < 0.05$ (Grafica 4, Figura 13).



Grafica 4. Células en apoptosis, $\bar{X} \pm \text{ES}$.
NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.
^aDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar vehículo, NP y Ctrl FC vs control.

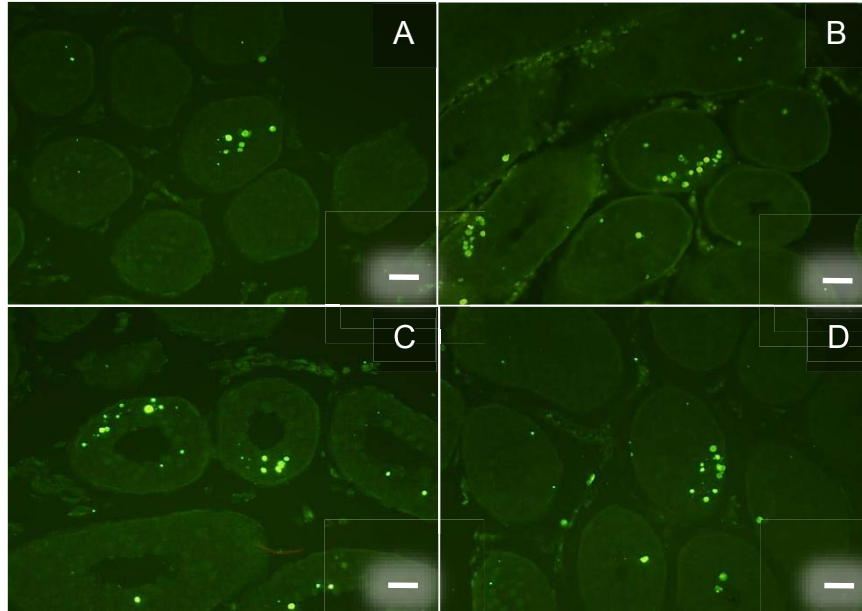


Figura 13. Apoptosis. Tubos seminíferos de ratas de 14 días postparto. A) Control, B) vehículo, C) NP, D) Ctrl FC. Micrografías a 20x. — 10µm. NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

Histopatología testicular

En el grupo control y vehículo se observó inicio de la espermatogénesis, los núcleos de las CS se encontraron en la periferia y las espermatogonias en la lámina basal como era de esperarse, además hubo presencia de espermatocitos primarios, en algunos cordones se comenzó a formar la luz y también hubo mucha proliferación de las espermatogonias (Figura 14A y B).

En el grupo NP se observó muerte de las CS que se dirigieron a la parte central de los tubos seminíferos, espermatocitos picnóticos los cuales mostraron una severa degeneración, plegamiento de algunos tubos seminíferos derivado de la muerte celular que disminuyó su circunferencia, paralelamente se observó que no hay presencia de CS en algunos túbulos seminíferos pero sí de espermatogonias (figura 14C).

El grupo Ctrl FC, presentó mucha proliferación, poca muerte de las CS (en comparación con el grupo NP) y de espermatocitos, además de generar alteraciones principalmente de CG y hubo presencia de espermatogénesis en la mayoría de los tubos seminíferos (Figura 14D).

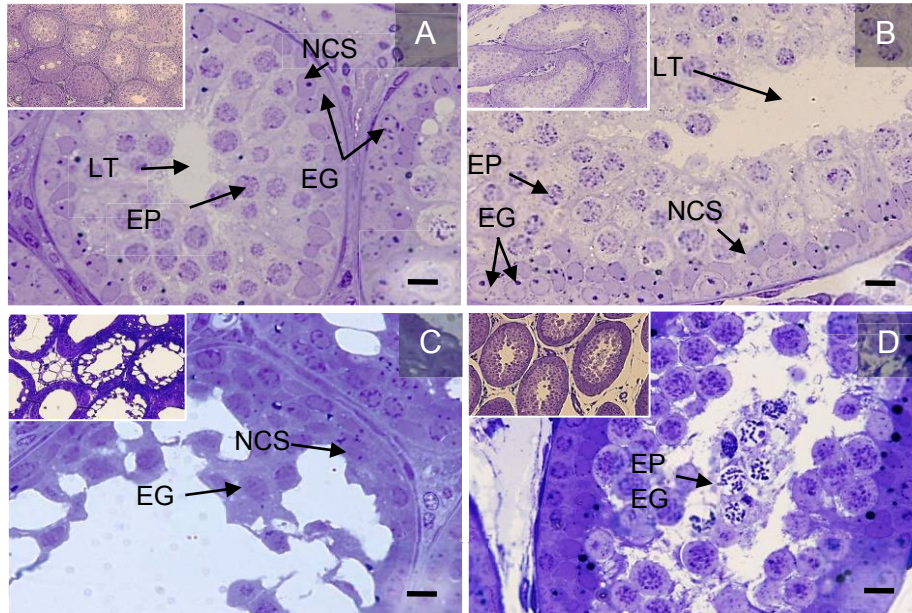
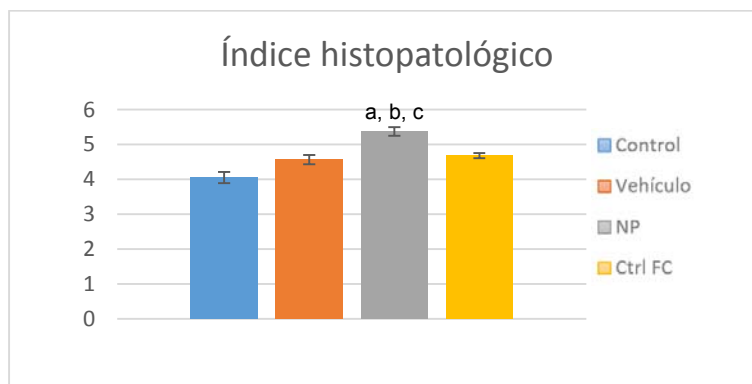


Figura 14. Tubos seminíferos de ratas de 20 días postparto. A) Control, B) vehículo, C) NP y D) Ctrl FC. Espermatogonias (EG), Espermatocito primario (EP), núcleo de células de Sertoli (NCS) y luz tubular (LT). Micrografías 60x. —10μm. Insertos 20x. NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

El grupo NP mostró una diferencia significativa en el índice histopatológico al compararlo con el grupo control, vehículo y Ctrl FC ($p < 0.05$). Lo que indica que los túbulos seminíferos del grupo NP tienen un mayor daño como lo muestra la grafica 5.



Grafica 5. Daño de túbulo seminífero, $\bar{X} \pm ES$.

NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

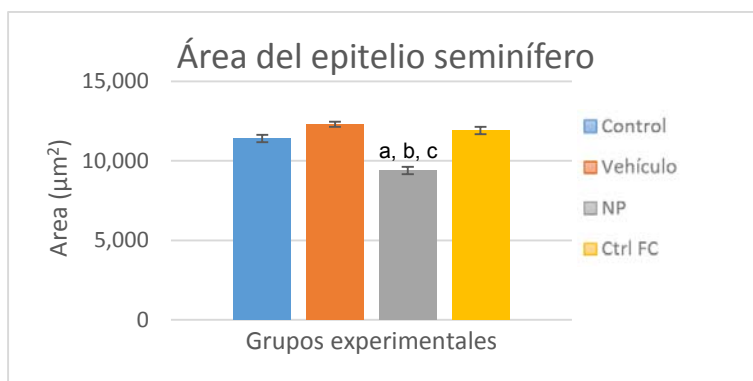
^aDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar vehículo, NP y Ctrl FC vs control.

^bDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs vehículo.

^cDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs Ctrl FC.

Área de túbulos seminíferos

El grupo NP mostró diferencia significativa del área de los túbulos seminíferos al compararlo con el resto de los grupos experimentales ($p < 0.05$). Observándose menor área de los túbulos del grupo NP (Grafica 6).



Grafica 6. Área del epitelio seminífero, $\bar{X} \pm ES$.

NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

^aDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar vehículo, NP y Ctrl FC vs control.

^bDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs vehículo.

^cDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs Ctrl FC.

Inmadurez de las células de Sertoli

El número de células positivas a inhibina- α del grupo NP (Figura 15C), mostró diferencia significativa al compararlo con el grupo control ($p < 0.05$), grupo vehículo ($p < 0.05$) y el grupo Ctrl FC ($p < 0.05$) (Grafica 7). Observándose que el grupo NP presenta mayor número inmunoreactivos a cuerpos de inhibina- α . Por su parte, el grupo control mostró diferencia significativa al ser comparado con el grupo vehículo ($p < 0.05$) y el grupo Ctrl FC ($p < 0.05$) (Grafica 7), ya que presentó un menor número de cuerpos de inhibina- α .

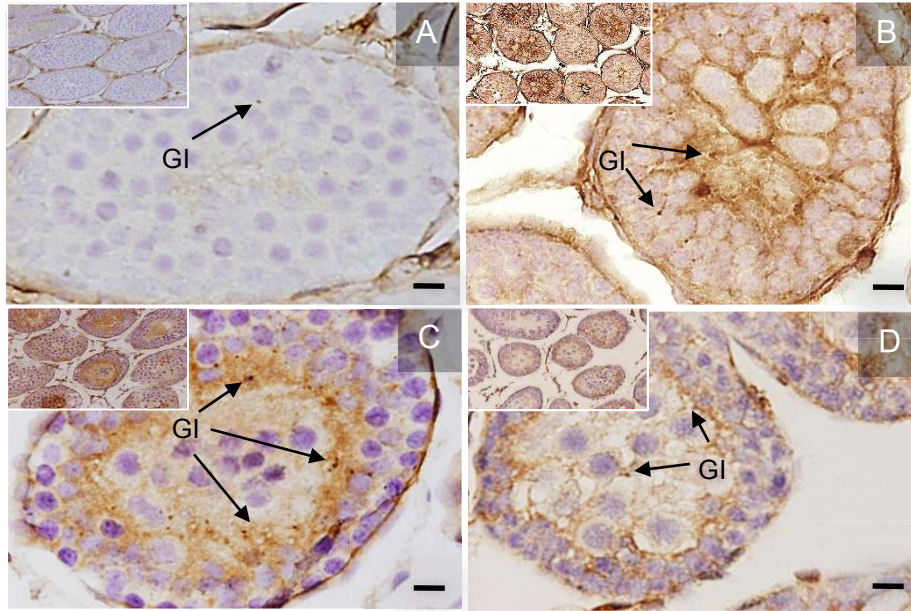
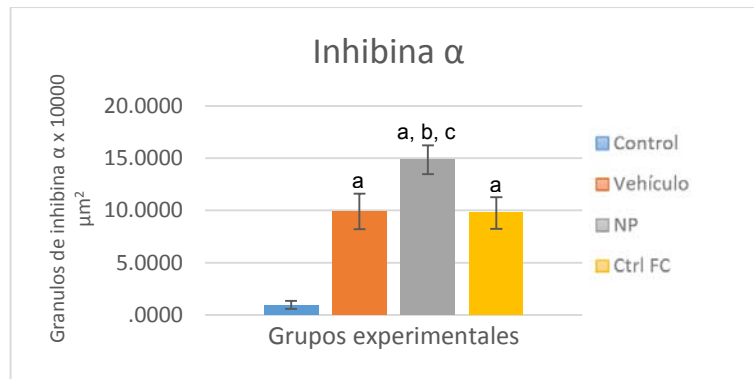


Figura 15. Inmunohistoquímica para detectar inhibina- α . Tubos seminíferos de ratas de 20 días postparto. A) Control, B) vehículo, C) NP y D) Ctrl FC. Gránulos de inhibina- α (GI). Micrografías 60x. — 10 μ m. Insertos 20x. NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.



Grafica 7. Madurez celular, $\bar{X} \pm ES$.

NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

^aDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar vehículo, NP y Ctrl FC vs control.

^bDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs vehículo.

^cDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs Ctrl FC.

Funcionalidad de las células de Sertoli

El número de células positivas a RA, mostró una disminución significativa en el grupo NP (Figura 16C) al compararlo con el resto de los grupos experimentales ($p < 0.05$) (Grafica 8).

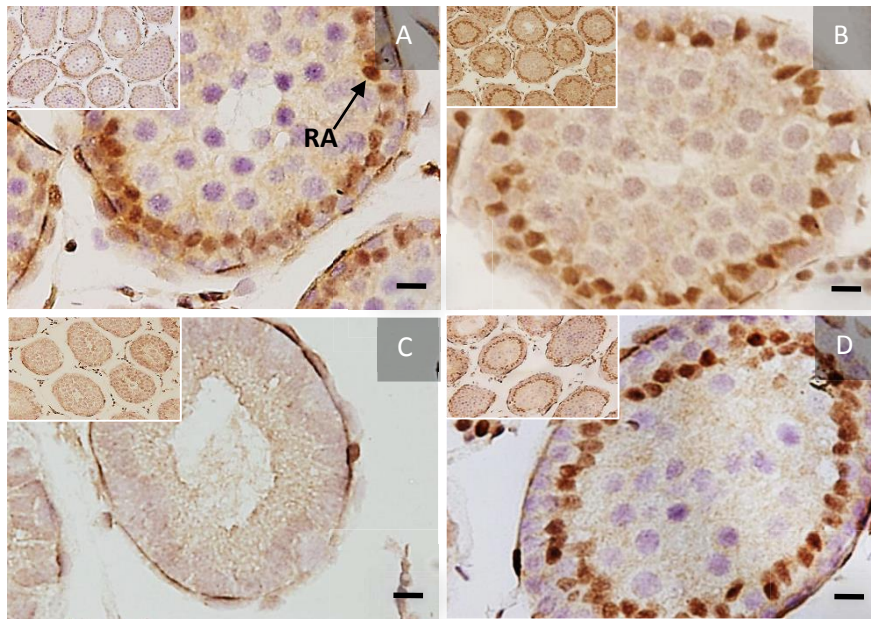
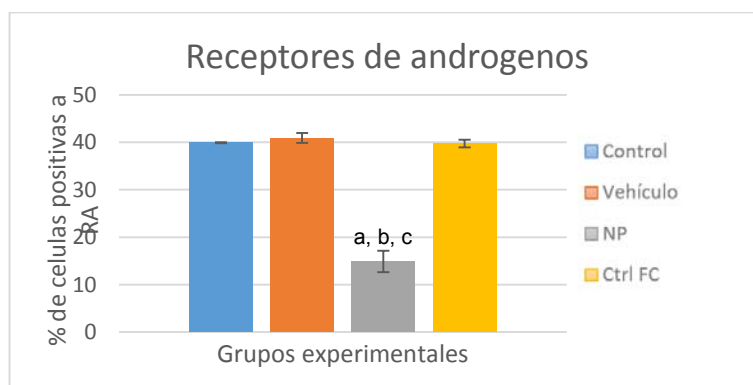


Figura 16. Inmunohistoquímica dirigida a receptor de andrógenos. Tubos seminíferos de ratas de 20 días postparto. A) Control, B) vehículo, C) NP, D) Ctrl FC. Micrografías 60x. Insertos 20x. —10 μ m. NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.



Grafica 8. Funcionalidad celular, $\bar{X} \pm ES$.

NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

^aDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar vehículo, NP y Ctrl FC vs control.

^bDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs vehículo.

^cDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs Ctrl FC.

Proliferación de las células germinales

La inmunohistoquímica dirigida a PCNA, mostró diferencia significativa del grupo NP (Figura 17C) al compararlo con el grupo control, vehículo y Ctrl FC ($p < 0.05$). Observándose que el grupo NP presenta una menor expresión de PCNA (Grafica 9).

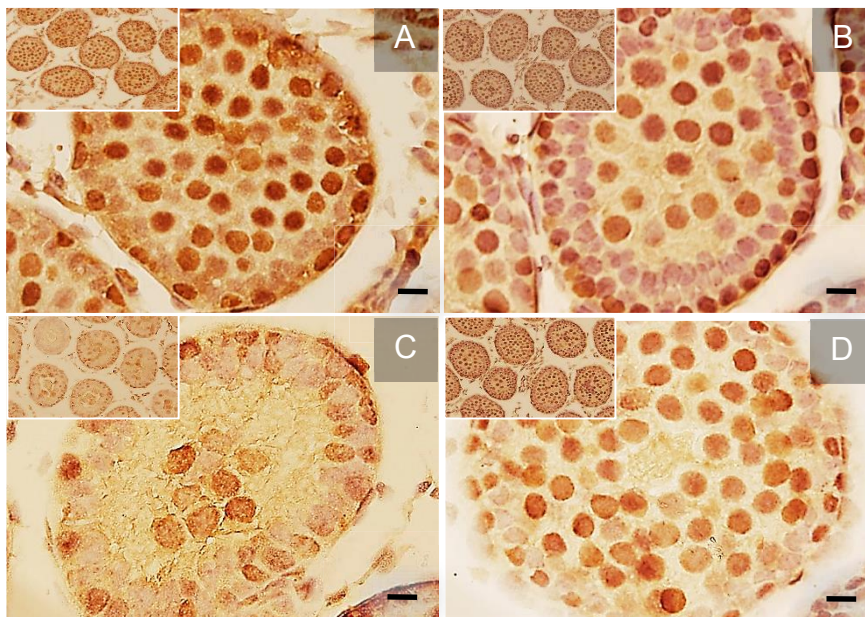
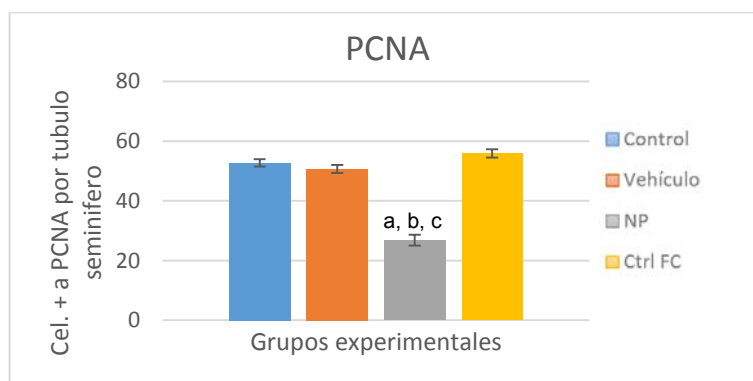


Figura 17. Inmunohistoquímica dirigida al antígeno nuclear de proliferación celular. Tubos seminíferos de ratas de 20 días postparto. A) Control, B) vehículo, C) NP, D) Ctrl FC. Micrografías 60x. Insertos 20x. — 10 μ m. NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.



Grafica 9. Proliferación celular, $\bar{X} \pm ES$.

NP: Nitroprusiato; Ctrl FC: Control ferricianuro.

^aDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar vehículo, NP y Ctrl FC vs control.

^bDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs vehículo.

^cDiferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar NP vs Ctrl FC.

DISCUSIÓN

El VAR es una de las causas más comunes de infertilidad masculina asociada a una disminución de la cuenta espermática (Turek y Lipshultz, 1995; Cueva y Echevarría, 2001; Miyaoka y Esteves, 2012).

Dentro de los riesgos del VAR se encuentra la hipotrofia testicular. Los mecanismos exactos que generan esta condición aún se desconocen, aunque se propone al EO generado a partir del aumento de ON en la vena testicular como posible causa de ciertos aspectos de la enfermedad (Glezerman y col., 1976; Naughton y col., 2001; Vásquez, 2004; Khera y Lipshultz, 2008; Blumer y col., 2011).

El VAR se diagnostica principalmente entre los 10 y 19 años de edad, cuando la patología es evidente (Waalkes y col., 2012). La dilatación varicosa es un proceso lento que hace pensar que se inicia desde una etapa prepúber, previa a la maduración de las CS, proceso indispensable para el establecimiento de una fertilidad futura. Su y Tae (2014), han reportado que la corrección quirúrgica del VAR no restaura en su totalidad la fertilidad, solo aumenta la concentración espermática de 9×10^6 a 12×10^6 /mL, la motilidad entre el 9 y 12% y la capacidad de fertilidad entre el 27 y 42%. Esto sugiere que el VAR provoca un daño permanente en células que aportan los factores y proteínas necesarias para una adecuada espermatogénesis, es decir en las CS.

En el humano, el VAR es una patología compleja de estudiar por su naturaleza y lo complicado de obtención de muestras, se ha estudiado utilizando el semen y en algunos casos la toma de biopsia (Glezerman y col., 1976; Naughton y col., 2001; Vásquez y col., 2009; Zepeda y Farías, 2013). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos etiológicos, fisiológicos y patológicos durante el desarrollo de esta enfermedad aún no se conocen en su totalidad. Por esta razón, se han desarrollado modelos animales de VAR quirúrgico en donde han utilizado ratas, conejos y perros, teniendo como principal problema la complejidad de la cirugía para inducir la patología, debido a que la disposición venosa en algunas ocasiones no es apta para la inducción del VAR (Joop y Cees, 1989; Turner, 2001; Saalu y col., 2009), por

tanto, en este trabajo se diseñó un modelo alternativo farmacológico de VAR, empleando NP como generador de ERN, tal y como se presenta en el VAR (Ballesteros y col., 2003; Prigol y col., 2009; Takizawa y col., 2013) .

Se ha mostrado que el ON tiene efectos negativos sobre la función testicular como se observa en patologías como torsión testicular y VAR que comparten como factor común, la generación de ON. En estas se ha demostrado una inhibición de la esteroidogénesis al afectar a las CL y disminuir los parámetros seminales.

Un marcador biológico de daño inducido por ON es la nitrotirosina, la cual ha sido encontrada considerablemente elevada en las venas testiculares de pacientes con VAR, en comparación con los niveles periféricos (Agarwal y col., 2009; Blumer y col., 2011).

Se sabe que el testículo cuenta con mecanismos antioxidantes, como lo describe Bauché y col., (1994), que describen la presencia de SOD, GPx, Se-GPx, GST y GR, además, identifican que los espermatozoides en paquiteno y las espermátides redondas son capaces de transformar O_2^- en H_2O_2 , sin tener la capacidad de metabolizar este último. En estudios más recientes, se ha identificado que las CG presentan bajas concentraciones de GST y las CS bajas concentraciones de SOD (Aguilar y col., 2001). Adicionalmente, Aprioku, 2013, menciona la presencia de SOD, GPx/GR, catalasa, ascorbato, α -tocoferol, piruvato, glutatión, taurina e hipotaurina en el plasma seminal, lo que indica que no todas las células testiculares son afectadas de igual forma por el EO.

En este modelo, se observó un aumento de las concentraciones de ERO en el grupo NP, generado por la descomposición del NP que se fragmenta en ON, el cual es un radical por sí mismo (Saavedra y col., 2004), y en cianuro que inhibe la cadena respiratoria a nivel del complejo IV, permitiendo la generación de RL por parte del complejo I, II y III, como lo observaron, Indo y col., (2007) y Zhang, (2008). Este aumento de RL por la administración de NP es mayor al que se presenta cuando se administra FC, debido a que esta molécula se descompone solo en cianuro, produciendo una menor cantidad de RL (Indo y col., 2007; Zhang, 2008), deduciendo a partir de esto la concentración de ERN por la donación de ON del

grupo NP y al eliminar las ERO generadas por el cianuro en el grupo Ctrl FC del grupo NP.

A su vez las CG son susceptibles de presentar lipoperoxidación a causa de la composición de su membrana. Está documentado que las membranas de las CG están constituidas por diferentes tipos de lípidos entre los que podemos encontrar a los ácidos grasos insaturados, presentándose en diferentes concentraciones dependiendo del tipo de célula testicular (Grogan y col., 1981; Furland y col., 2007; Zanetti y col., 2007; Renée y col., 2013). En un estudio realizado por Grogan y col., (1981), se observó que las concentraciones de ácidos grasos insaturados (ácido linoleico y linolénico) en testículos de murinos se incrementan con el transcurso de la diferenciación de las CG y disminuyen sus concentraciones al diferenciarse en espermatozoides maduros. Por su parte, Furland y col., (2007), identificaron que las CG presentan glicerofosfolípidos.

En el presente trabajo se observó que la lipoperoxidación mostró una tendencia a aumentar con la administración de NP, lo que se asoció a un mayor daño de las células testiculares (Matheus y López, 2004).

Por otro lado, se pudo demostrar que los RL no sólo afectan a las membranas celulares, también pueden inducir apoptosis, tal como lo muestran nuestros resultados en donde el grupo NP presenta un mayor número de células en apoptosis en comparación a los demás grupos experimentales. Esto probablemente por el aumento de la concentraciones de ON que son capaces de dañar a las mitocondrias, permitiendo la liberación del citocromo c y la activación de caspasas o por daño del ADN por la generación de ERO al inhibir la cadena respiratoria por la acción del ON, activando de esta forma la vía intrínseca de la apoptosis (Agarwal y col., 2009; Blumer y col., 2011).

Además en este modelo observamos que el peso testicular no se disminuyó, a diferencia de lo reportado por Vásquez y col., (2009) y Waalkes y col., (2012), quienes observaron en pacientes con VAR una disminución de tamaño y peso del testículo ipsilateral. Esto puede explicarse debido a que en nuestro modelo la aplicación de NP fue de forma aguda, induciendo daño transitorio a diferencia del

daño crónico por el VAR, en donde el testículo está expuesto de forma constante a la generación de EO llevado a la hipotrofia testicular (Agarwal y col., 2012; Hamada y col 2013).

La presencia de espermatoцитos a los 20 días de edad en nuestras ratas de los diferentes grupos experimentales, indican inicio de la espermatogénesis (Hess, 1999; Maeda y col., 2000; Guyton, 2011). Aunque el grupo NP presentó alteraciones histopatológicas que coincide a lo reportado por Abdel, (2009), y Soares y col., (2013), en ratas adultas con inducción de VAR quirúrgico, quienes observaron túbulos seminíferos irregulares, degeneración del epitelio seminífero y descamación de CG hacia el centro de los tubos seminíferos. Cabe mencionar que estas alteraciones coinciden con las reportadas para humanos con VAR, principalmente con los pacientes con azoospermia (Saleh y col., 2010).

Se observó también que las CS fueron susceptibles al daño por NP, esto probablemente debido a que los RL superaron la producción de antioxidantes, además de que las CS presentan un sistema antioxidante deficiente para SOD, como lo mostraron Aguilar y col., (2001). Las alteraciones en las CG presentadas en el grupo Ctrl FC, se pueden atribuir a la producción de ERO a partir de la donación de cianuro, por parte, del FC (Indo y col., 2007; Zhang, 2008).

La reducción en el área de los túbulos seminíferos en el grupo NP fue el resultado de todas las alteraciones histológicas a causa de la generación de RL, siendo las CS las más susceptibles al ON. Como se ha demostrado, las CS son indispensables para la producción de factores que mantienen la espermatogénesis, dar soporte a las CG, proveer de nutrientes, entre muchas otras funciones (Hai y col., 2014), por lo que cualquier daño a este tipo celular repercute en la sobrevivencia y diferenciación de las CG.

El aumento de los gránulos de inhibina- α en las CS del grupo NP en comparación con los demás grupos experimentales se puede atribuir a la falta de madurez, tal y como lo demuestran Nistal y col., (2011). Estos autores observaron en las CS de tejido fetal, neonato e infantil de humanos sanos la presencia de gránulos de inhibina- α , a diferencia de los tejidos de pacientes sanos de un periodo puberal y

adulto los cuales no presentaron gránulos de inhibina- α . Yujin y col., (2008), por su parte, observaron que en ratones entre los días 1 a 6 días es muy baja la expresión de inhibina- α , β A y β B, comenzando a elevar sus niveles a partir del día 18 postparto hasta el día 120, teniendo su pico en el día 48, concluyendo que los gránulos de inhibina α son un buen marcador de inmadurez de las CS, ya que en una etapa de inmadurez se presentan gránulos de inhibina- α , la cual es liberada aumentando los niveles de esta hasta llegar a su pico en CS maduras (Yujin y col., 2008; Nistal y col., 2011). Deduciendo de esta forma la falta de madurez de las CS.

No solo la inhibina- α se vio alterada, también la cantidad de células inmunoreactivas a los RA, lo que se atribuye a la falta de maduración de las CS al no ser capaces de sintetizar estos receptores. En contraste, Soares y col., (2013), atribuyen la disminución de RA en ratas con VAR quirúrgico a la disminución de los niveles de proteína y no a la deficiencia de la expresión de ARNm. Esto hace pensar que esta disminución podría también ser el resultado del daño directo ocasionado por el ON sobre los receptores y no por inhibición de la transcripción.

La inmunoreactividad a PCNA disminuyó drásticamente a los 21 días de edad indicándonos que la proliferación de las CG se ve afectada por la acción de los RL, alterando la espermatogénesis. Lo anterior puede ser debido a un daño en las CS lo que genero un bloqueo o disminución en la producción de factores de crecimiento inductores de la mitosis o meiosis [Factor de crecimiento α y β (GF- α y β), factor de crecimiento del fibroblasto (FGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)] (Lerner y Urbina, 2009). El adecuado funcionamiento en las CS es mediado en parte por los RA (Ruey y col., 2009), que como ya se mencionó, se observó una disminución en el número de células inmunoreactivas a receptores de andrógenos en el grupo NP. Aunque no descartamos la acción directa de los RL sobre las CG (Tanaka y col., 1996).

Ninguno de los grupos experimentales presentó proliferación de las CS, debido a que, desde el día 12, hasta el día 30 de edad el número de estas células permanece constante, tal y como lo menciona Sharpe y col., (2003).

Por todo lo anterior, se propone que en el VAR, el reflujo sanguíneo disminuye las concentraciones de oxígeno en la vena testicular, plexo pampiniforme y testículo, lo que se conoce como hipoxia. Esto iniciara la generación de RL incitado por el factor HIF-1, en donde, HIF-1 estimula la producción de ON al actuar sobre eNOS. Los daños generados coinciden con lo encontrado en este modelo alternativo de VAR con la administración de NP

Por su parte, el ON puede difundir a través de la membrana de los diferentes tipos celulares del testículo hasta llegar a la mitocondria e inhibir la cadena respiratoria (complejo IV) y de este modo provocar la formación de O_2^- , que reaccionara con el ON que se está generando por la hipoxia, iniciando la formación de $ONOO^-$, el cual causara daño por lipoperoxidación de la membrana de las células, iniciándose de este modo la entrada continua de $ONOO^-$ a las células modificando la estructuras de los lípidos, proteínas y ADN, además, de inhibir la cadena respiratoria a nivel de los complejos I y III.

Continuando con lo anterior, el daño ocasionado al tejido del testículo y al epitelio de la vena testicular por la acumulación de ERO y de ERN puede estimular el reclutamiento de macrófagos elevando así aún más los niveles de ERN. Por último, esta acumulación de RL, iniciará una reacción en cadena en donde se verán superados los mecanismos de protección (antioxidantes) de las células testiculares, impidiendo de este modo la maduración de las CS (Figura 18).

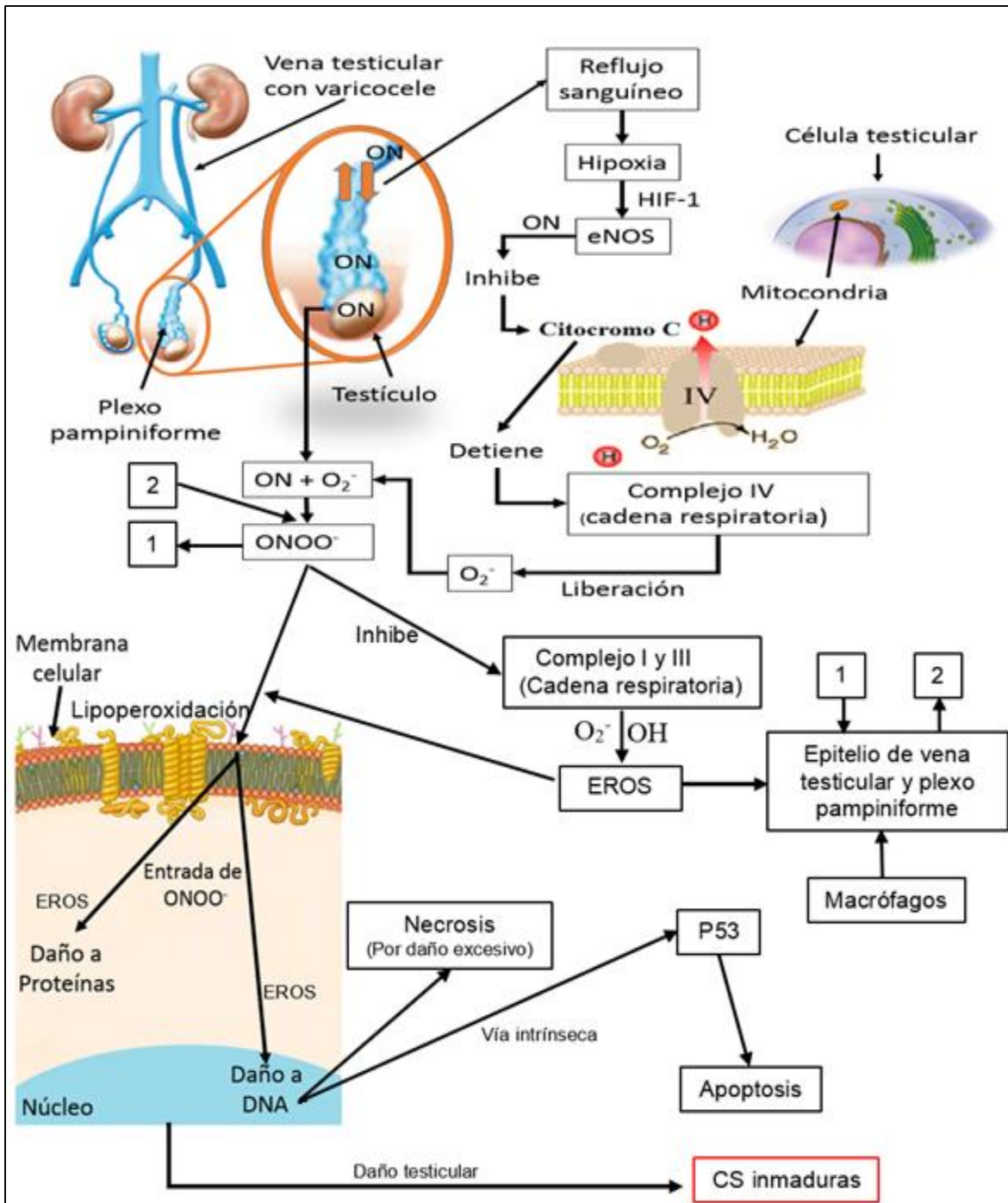


Figura 18. Diagrama que muestra el mecanismo de acción propuesto para la generación de óxido nítrico en el varicocele y su papel en la generación de daño testicular.

CONCLUSIONES

La administración de nitroprusiato como modelo alternativo de varicocele genera un aumento de radicales libres en el testículo manteniendo la inmadurez de las células de Sertoli, lo que se refleja en la disminución del número de células germinales.

El modelo experimental propuesto permite observar cambios que se presentan durante el desarrollo del varicocele al generar radicales libres por lo que puede ser utilizado para el estudio de la etiología, fisiopatología y tratamiento de esta patología.

REFERENCIAS

- Abdel M, **HISTOLOGICAL AND IMMUNOCHEMICAL CHANGES IN THE ADULT RAT TESTES AFTER LEFT EXPERIMENTAL VARICOCELE AND POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF RESVERATROL**, *Egyptian Journal of Histology*, 2009: 32(1): 81-90.
- Agarwal A, Sharama R., Desa N., Pabrakaran S, Tavares A., Sabanegh E., **ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN PATHOGENESIS OF VARICOCELE AND FERTILITY**, *Urology*, 2009: 73: 461-9.
- Agarwal A, Hamada A, Esteves S, **INSIGHT INTO OXIDATIVE STRESS IN VARICOCELE-ASSOCIATED MALE INFERTILITY: PART 1**, *Nature Reviews Urology*, 2012: 9(12): 678-90.
- Aguilar A, Hales B., Robaire B., **EXPRESSION OF STRESS RESPONSE GENES IN GERM CELL DURING SPERMATOGENESIS**, *Biology of Reproduction*, 2001: 65: 119-127.
- Alvarez E, (1989) **ANDROLOGÍA: TEORÍA Y PRÁCTICA**, Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, pp: 76.
- Aprioku J, **PHARMACOLOGY OF FREE RADICALS AND THE IMPACT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON THE TESTIS**, *Department of Pharmacology, Faculty of Basic Medical Sciences, University of Port Harcourt, Port Harcourt, Nigeria*, 2014: 4:158-172.
- Arch E, Collado M, Verduzco A, **PRODUCCIÓN Y USO DE MODELOS ANIMALES EN EL CAMPO DE LA AUDIOLOGÍA**. Cirugía y Cirujanos, 2004: 72: 427-433.
- Audesirk T, Audesirk G, Byers B, (2004), **BIOLOGÍA: CIENCIA Y NATURALEZA**, Editorial Pearson Educación de México, pp: 189-200.
- Baldrick P, **DEVELOPING DRUGS FOR PEDIATRIC USE: ROLE FOR JUVENILE ANIMAL STUDIES?** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004: 39: 381-389.
- Ballesteros M, Fernández F, Casanueva L, Ramos V, Mar F, **INTOXICACIÓN POR NITROPUSIATO**, *Anales de Pediatría*, 2003: 58(1): 77-88.
- Bauché F., Fouchard M., Jégou B., **ANTIOXIDANT SYSTEM IN RAT TESTICULAR CELLS**, *FEBS Letters*, 1994: 349: 392-396.
- Blumer G, Restelli A, Giudece P, Soler T, Fraietta R, Nichi M, Bertolla R, Cedenho A, **EFFECT OF VARICOCELE ON SPERM FUNCTION AND**

SEMEN OSIDATIVE STRESS, *British Journal of Urology International*, 2011: 109: 259-65.

- Briceño T, Díaz L, Gómez I, **VARICOCELE E INFERTILIDAD MASCULINA**, *Urología colombiana*, 2008: 17(1): 2008.
- Brugo S, Chillik C, Kopelman S, **DEFINICIÓN Y CAUSAS DE LA INFERTILIDAD**. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 2003: 54(4): 227-248.
- Bustos E, Castro R, Ramos B, Torres L, **RAT SPERMATOGENESIS DAMAGE IN INTERMITTENT HYPOBARIC HYPOXIA AND THE PROTECTIVE ROLE OF MELATONIN. II: TESTICULAR PARAMETERS**, *International Journal of Morphology*, 2010: 28(2): 539-547.
- Buzzard J, Wreford N, Morrison J, **MARKED EXTENSION OF PROLIFERATION OF RAT SERTOLI CELLS IN CULTURE USING RECOMBINANT HUMAN FSH**, *Reproduction*, 2002: 124: 633-641.
- Castro N, Moreno R, **PROBLEMA BIOQUÍMICO: BIOENERGÉTICA. CADENAS RESPIRATORIAS RAMIFICADAS**, *Revista de Educación Bioquímica*, 2005: 24(3,4): 104-105.
- Chen Q, Vazquez E, Moghaddas S, Hoppel C, Lesnfsky E, **PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY MITOCHONDRIA**, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003: 278(38): 36027-36031.
- Cueva P, Echevarria S, **FISIOPATOLOGÍA DE LAS ALTERACIONES DE LOS PARÁMETROS SEMINALES EN EL VARICOCELE**, *Revista del Instituto Nacional de Perinatología*, Diciembre 2001.
- Danylovyh I, Kolomiiets O, Danylovyh H, Kosterin S, **NITRIC OXIDE AS A POSSIBLE REGULATOR OF ENERGY-DEPENDENT CA²⁺ TRANSPORT IN MITOCHONDRIA OF UTERINE SMOOTH MUSCLE**, *Fiziol Zh*, 2014: 60(2):12-7.
- Franca L, Avelar G, Almeida F, **SPERMATOGENESIS AND SPERM TRANSIT THROUGH THE EPIDIDYMIS IN MAMMALS WITH EMPHASIS ON PIGS**. *Theriogenology*, 2005: 63: 300-318.
- Fujisawa M, Tatsumi N, Fujioka H, Kanzaki M, Okuda Y, Arakawa S, Kamidono S, **NITRIC OXIDE PRODUCTION OF RAT LEYDIG AND SERTOLI CELL IS SIMULATED BY ROUND SPERMATID FACTORS**, *Molecular and Endocrinology*, 2000: 160: 99-105.
- Furland N, Maldonado E, Aresti P, Aveldaño M, **CHANGES IN LIPIDS CONTAINING LONG- AND VERY LONG-CHAIN POLYUNSATURATED**

FATTY ACIDS IN CRYPTORCHID RAT TESTES, *Biology of Reproduction*, 2007: 77: 181-188.

- Glasberg K, **THE ADOLESCENT VARICOCELE: CURRENT ISSUES**, *Current Urology Reports*, 2007: 8: 100-3.
- Glezerman M, Rakowszczyk M, Lunenfeld B, Been R, Goldman B, **VARICOCELE IN OLIGOSPERMIC PATIENT; PATHOPHYSIOLOGY AND RESULTS AFTER LIGATION AND DIVISION OF INTERNAL SPERMATIC VEIN**, *Journal Urology* 1976: 115: 563-565.
- Góngora A, Sánchez S, Cubillos S, Cuneo S, **FRAGMENTACIÓN DEL ADN DEL ESPERMATOZOIDE Y SU INFLUENCIA EN LA FERTILIDAD DE LA PAREJA**, *Revista mexicana de Medicina de la Reproducción*, 2011: 3(3): 105-111.
- Greenfield S, Seville P, Wan J, **EXPERIENCE WITH VARICOCELES IN CHILDREN AND YOUNG ADULTS**, *Journal Urology*, 2002: 168: 1684-1688.
- Grogan W, Farnham W, Szopiak B, **LONG CHAIN POLYENOIC ACID LEVELS IN VIABLY SORTED, HIGHLY ENRICHED MOUSE TESTIS CELLS**, *Lipids*, 1981: 16(6):401-410.
- Guyton C, (2011), **TRATADO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA**, 12º Edición, Editorial Mc Graw-Hill, México, pp. 973-986.
- Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, He Z, **THE ROLES AND REGULATION OF SERTOLI CELLS IN FATE DETERMINATIONS OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS AND SPERMATOGENESIS**, **SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY**, 2014: 29: 66-75.
- Hamada A, Esteves S, Agarwal A, **INSIGHT INTO OXIDATIVE STRESS IN VARICOCELE-ASSOCIATED MALE INFERTILITY: PART 2**, *Nature Reviews Urology*, 2013: 10(1): 26-37.
- Herráez V, Herranz R, López M. **¿QUÉ ES UN MODELO ANIMAL?** *Gaceta Óptica*, 2004: 382: 20-24.
- Hess R, **SPERMATOGENESIS, OVERVIEW**. *Encyclopedia of Reproduction*, 1999: 4: 539-545.
- Huang X, Zhou Y, Ma J, Wang N, Zhang Z, Ji J, Ding Q., Chen G, **NITRIC OXIDE MEDIATED EFFECTS ON REPRODUCTIVE TOXICITY CAUSED BY CARBON DISULFIDE IN MALE RATS**, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012: 34: 679-687.

- Indo H, Davidson M, Yen H, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima H, **EVIDENCE OF ROS GENERATION BY MITOCHONDRIA IN CELLS WITH IMPAIRED ELECTRON TRANSPORT CHAIN AND MITOCHONDRIAL DNA DAMAGE**, *Mitochondrion*, 2007: 7(1-2):106-118.
- Ingrid T, Arata G, Osuna J, Gómez R, Regadera J, **ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ESPERMÁTICA**, *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 2005: 3 (3): 12-19.
- Johnson L, Varner D, Roberts V, Smith T, Keillor G, Scrutchfield W. **EFFICIENCY OF SPERMATOGENESIS: A COMPARATIVE APPROACH**, *Animal Reproduction Science*, 2000: 60(61): 471-480.
- Joop S, Cees J, **INDUCTION OF VARICOCELE IN DOG: I. PARTIAL LIGATION OF THE LEFT RENAL VEIN DOES NOT A VARICOCELE IN DOG**, *Journal of andrology*, 1989: 10(1): 9-16.
- Khera M, Lipshultz L, **ABORDAJE ACTUAL DEL VARICOCELE**, *Urologic Clinics of North America*, 2008: 35: 183-189.
- Leavesley H, Li L, Prabhakaran K, Borowitz J, Isom G, **INTERACTION OF CYANIDE AND NITRIC OXIDE WITH CYTOCHROME C OXIDASE: IMPLICATIONS FOR ACUTE CYANIDE TOXICITY**, *Toxicological Sciences*, 2008: 101(1): 101–111.
- Lee J, Jeng S, Lee T, **INCREASED EXPRESSION OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1 IN THE INTERNAL SPERMATIC VEIN OF PATIENTS WITH VARICOCELE**, *The Journal of Urology*, 2006: 175: 1045-1048.
- Lerner J, Urbina T, (2008), **FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA**, Editorial Médica Panamericana, Venezuela, pp. 107-108.
- Maeda K, Satoshi O, Hiroko T, (2000), **PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION; IN THE HANDBOOK OF LABORATORY ANIMALS: THE LABORATORY RAT**, By Krinke GJ editor. American Press, USA, pp. 150-151.
- Maga G, Hübscher U, **PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA): A DANCER WITH MANY PARTNERS**, *Journal of Cell Science*, 2003: 116 (15): 3051-3060.
- Málaga Y, Ortiz D, Hernández I, Tovar J, Ayala A, **DETENCIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS**, *Ginecología y Obstetricia de México*, 2005: 73: 500-508.

- Maldonado O, Jiménez E, Guapillo M, Ceballos G, Méndez E, **RADICALES LIBRES Y SU PAPEL EN LAS ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS**, *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 2010: 32-39.
- Manzoni O, Prezeau L, Desagher S, Sahuquet A, Sladeczek F, Bockaert J, Fagni L, **SODIUM NITROPRUSSIDE BLOCKS NMDA RECEPTORS VIA FORMATION OF FERROCYANIDE IONS**, *Neuroreport*, 1992: 3(1): 77-80.
- Matheus N, López A, **GRADO DE LIPOPEROXIDACIÓN EN TESTÍCULO DE RATONES NMRI DEACUERDO A LA EDAD**, 2004: 10(1): 82-86.
- Mendis S, Siril H, **DIFFERENTIATION OF THE ADULT LEYDIG CELL POPULATION IN THE POSTNATAL TESTIS**, *Biology of Reproduction*, 2001: 65: 660-671.
- Miyaoka R, Esteves S, **A CRITICAL APPRAISAL ON THE ROLE OF VARICOCELE IN MALE INFERTILITY**, *Hindawi Publishing Corporation Advances in Urology*, 2012: 28: 1-9.
- Mori M, Bertolla R, Fraletto R, Ortiz V, Cedheno A, **DOES VARICOCELE GRADE DETERMINE EXTENT OF ALTERATION TO SPERMATOGENESIS IN ADOLESCENTS?**, *Fertility and Sterility*, 2008: 90: 1769-73.
- Murphy M, **NITRIC OXIDE AND CELL DEATH**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999: 1411: 401-414.
- Naughton C, Nangia A, Agarwal A, **VARICOCELE AND MALE INFERTILITY: PART II, PATHOPHYSIOLOGY OF VARICOCELES IN MALE INFERTILITY**, *Human Reproduction Update*, 2001: 7(5): 473-481.
- Nistal M, Pastroán L, González P, De Miguel D, De Miguel M, **INHIBIN BODIES: A NEW MARKER FOR IMMATURE SERTOLI CELLS**, *Histopathology*, 2011: 58(7): 1-23.
- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C, **EL ESPERMATOZOIDE, DESDE LA EYACULACIÓN HASTA LA FERTILIZACIÓN**, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2006: 19: 426-436.
- Paduch D, Skoog S., **DIAGNOSIS, EVALUACIÓN AND TREATMENT OF ADOLESCENT VARICOCELE**, *Medical Science monitor*, 1999: 5(6): 1255-1267.
- Palacios A, (2008), **FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA**, Editorial Medica Panamericana, Compilación de: Lerner J, Urbina M, pp. 101-108.

- Parthasarathy C, Balasubramanian K, **ASSESSMENT OF *IN VITRO* EFFECTS OF METYRAPONE ON LEYDIG CELL STEROIDOGENESIS**, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008a: 7(3): 328-338.
- Pfeiffer D, Berger J, Schoop C, Tauber R, **DOPPLER-BASED STUDY ON THE PREVALENCE OF VARICOCELE IN GERMAN CHILDREN AND ADOLESCENTS**, *Andrología*, 2006: 38 (1): 9-13.
- Prigol M, Augusto C, Zeni G, Nogueira C, **PROTECTIVE EFFECT OF DISUBSTITUTED DIARYL DISELENIDES ON CEREBRAL OXIDATIVE DAMAGE CAUSED BY SODIUM NITROPRUSSIDE**, *Biochemical Engineering Journal*, 2009: 45: 94-99.
- Rafaela M, **INFERTILIDAD FEMENINA**, *Ámbito Farmacéutico*, 2008: 27: 90-98.
- Ramos M, Batista C, Gómez B, Zamora A, **DIABETES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES**, *Investigación en salud*, 2006: 8(1): 7-15.
- Renée E, Pellon M, Gonzalez M, **ROL DE LA ISOFORMA 2 DE LA GLICEROL-3-FOSFATOACILTRANSFERASA EN EL METABOLISMO LIPÍDICO TESTICULAR**, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2013: 47(2): 315-25.
- Ríos C, Santamaría A, **QUINOLINIC ACID IS A POTENT LIPID PEROXIDATION IN RAT BRAIN HOMOGENATES**, *Neurochemical Ressearch*, 1991: 16: 1139-1143.
- Rodríguez E, **ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES HUMANAS**, *Acta Bioethica*, 2007: 13(1): 25-40.
- Ross M, Pawlina W, (2007), **HISTOLOGÍA: TEXTO Y ATLAS COLOR CON BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**, 3° Edición, Editorial Panamericana, Argentina, pp. 789-816.
- Royere D, Guérif F, Laurent V, Hochereau de Reviers M., **APOPTOSIS IN TESTICULAR GERM CELLS**, *International Congress Series*, 2004: 1266: 170-176.
- Ruey W, Shuyuan Y, Chii T, Chawnshang C, **ANDROGEN RECEPTOR ROLES IN SPERMATOGENESIS AND FERTILITY: LESSONS FROM TESTICULAR CELL-SPECIFIC ANDROGEN RECEPTOR KNOCKOUT MICE**, *Endocrine Reviews*, 2009: 30(2):119-132.
- Saalu L, Oguntola J, Bbalola O, Oyewopo A, **RESERVAL OF EXPERIMENTAL VARICOCELE-INDUCED TESTICULAR TOXICITY BY L-**

ASCORBATE IN RATS, *African Journal of Biotechnology*, 2009: 8(6): 965-970.

- Saavedra A, Calderón E, Sierra E, Cortés C, Gaona F, Clemente M, **PAPEL PATOFISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL**, *Mensaje Bioquímico*, 2004: 28: 27-43.
- Saleh R, Mahfouz R, Agarwal A, Farouk H, **HITOPATOLOGIC PATTERNS OF TESTICULAR BIOPSIES IN INFERTILE AZOOSPERMIC MEN WITH VARICOCELE**, *American Society for Reproductive Medicine*, 2010: 94: 2482-2485.
- Samuel S, Yen S, Jaffe R, Barbieri R, (2001), **ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**, 4^o Edición, Editorial Médica Panamericana, España, pp. 664-670.
- Sharpe M, McKinnell C, Kivlin C, Fisher S, **PROLIFERATION AND FUNCTIONAL MATURATION OF SERTOLI CELLS, AND THEIR RELEVANCE TO DISORDERS OF TESTIS FUNCTION IN ADULTHOOD**, *Society for Reproduction and Fertility*, 2003: 125: 769–784.
- Silva M, Cedraz P, Varanda W, **EFFECTS OF NITRIC OXIDE ON MAGNOCELLULAR NEURONS OF THE SUPRAOPTIC NUCLEUS INVOLVE MULTIPLE MECHANISMS**, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2014: 47(2): 90-100.
- Soares T, Fernandes A, Lima L, Stumpp, Schoorlemmer G, Lazari F, Porto S, **EXPERIMENTAL VARICOCELE IN RATS AFFECTS MECHANISMS THAT CONTROL EXPRESSION AND FUNCTION OF THE ANDROGEN RECEPTOR**, *Andrology*, 2013: 1: 670-681.
- Solrari AJ., (2007), **GENÉTICA HUMANA: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES DE MEDICINA**, 3^{ra} Edición, Editorial medica panamericana, Argentina, pp: 206.
- Su K, Tae J, **EFFECT OF VARICOCELECTOMY ON MALE INFERTILITY**, *Korean Journal Urology*, 2014: 55: 703-709.
- Takizawa Y, Kishimoto H, Kitazato T, Ishizaka H, Kamiya N, Ito Y, Tomita M, Hayashi M, **CHARACTERISTICS OF REVERSIBLE ABSORPTION-ENHANCING EFFECT OF SODIUM NITROPRUSSIDE IN RAT SMALL INTESTINE**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013: 49: 664-670.

- Tanaka H, Fujisawa M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S, **DNA SYNTHESIS IN THE TESTES OF INFERTILE MEN WITH VARICOCELE**, *The Japanese Urological Association*, 1996: 87(6): 885-891.
- Tinker J, Michenfelder J, **SODIUM NITROPRUSSIDE: PHARMACOLOGY, TOXICOLOGY AND THERAPEUTICS**, *Anesthesiology*, 1976: 3: 340-354.
- Turek P, Lipshultz L, **THE VARICOCELE CONTROVERSIES ETIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY**. Lesson 13. Vol. XIV. *AUA Updates*; 1995.
- Turner T, **THE STUDY OF VARICOCELE THROUGH THE USE OF ANIMAL MODELS**, *Human Reproduction Update*, 2001: 7(1): 78-84.
- Urbina MT, Lerner J, (2008), **FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA**, Editorial Médica Panamericana, Venezuela, pp: 103.
- Vásquez D, Díaz C, Carmona Z, Vásquez F, **VARICOCELE TESTICULAR EN ADOLESCENTES**, *Salud Uninorte*, 2009: 25 (2): 245-257.
- Vásquez J, **CARACTERÍSTICAS DEL ESPERMOGRAMA Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE GONADOTROPINAS AL INICIO DE LA ESPERMATOGÉNESIS HUMANA EN UNA POBLACIÓN DE ADOLESCENTES DE LA CIUDAD DE BARRANQUILLA**, Tesis doctoral - Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, 2004.
- Venereo J, **DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES**, *Revista Cubana Medicina Militar*, 2002: 31(2): 126-133.
- Vigueras R, Montelongo P, Dolores M, Gutiérrez O, Rojas J, **POSTNATAL TESTICULAR DEVELOPMENT IN THE CHINCHILLA RABBIT**, *Acta Histochemica*, 2013: 115 (7): 677-685.
- Vite J, Ortiz D, Hernández I, Tovar J, Ayala A, **ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFERTILIDAD EN UNA POBLACIÓN MEXICANA**, *Ginecología Obstetricia de México*, 2005: 73: 360-364.
- Waalkes R, Manea I, Nijman J, **VARICOCELE EN ADOLESCENTES: REVISION Y GUIAS PARA LA PRACTICA DIARIA**, *Archivos Españoles de Urología*, 2012: 65 (10): 859-871.
- Walker H, Cheng J, **FSH AND TESTOSTERONE SIGNALING IN SERTOLI CELLS**, *Reproduction*, 2005; 130: 15-28.
- Welsch U, (2010), **SOBOTTA LEHRBUCH HISTOLOGIE 2**, Editorial Medica Panamericana, España.

- Yujin K, Joong-Sun K, Myoung-Sub S, Heung-Sik S, Jong Choon K, Chun-Sik B, Seungjoon K, Taekyun S, Sung-Ho K, Changjong M, **THE EXPRESSION AND LOCALIZATION OF INHIBIN ISOTYPES IN MOUSE TESTIS DURING POSTNATAL DEVELOPMENT**, *Journal of Veterinary Science*, 2008: 9(4): 345-349.
- Zanetti S, Maldonado E, Aveldaño M, **DOXORUBICIN AFFECTS TESTICULAR LIPIDS WITH LONG-CHAIN (C18-C22) AND VERY LONG-CHAIN (C24-C32) POLYUNSATURATED FATTY ACIDS**, *Cancer Research*, 2007: 67(14): 6973-6980.
- Zepeda B, Farías G, **ANTIOXIDANTES FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR HIPOXIA HIPOBÁRICA EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO**, *Revista Farmacológica*, 2013: 6(1): 31.
- Zhang L, (2008), **THE INVOLVEMENT OF BNIP3 IN CYANIDE-INDUCED NEUROTOXICITY**, PURDUE UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL (Thesis/ dissertation acceptance), pp: 1-2.

GLOSARIO

Antisepsia: Empleo de medicamentos o sustancias químicas (antisépticos) para inhibir el crecimiento, destruir, o disminuir el número de microorganismos de la piel, mucosas y todos los tejidos vivos.

Dartos: Lámina de tejido muscular liso contráctil que forma una túnica por debajo del escroto y está íntimamente unida a él. Se prolonga por el pene hasta el abdomen, donde da lugar al ligamento suspensorio del pene. Su contracción (por el frío) o su dilatación (por el calor) da el aspecto rugoso o habitual de las bolsas del escroto.

Ecografía doppler: Es una técnica de imagen médica que emplea los sonidos (vibraciones en el sentido de propagación de la onda) de alta frecuencia para obtener imágenes del interior del cuerpo.

Hipotrofia testicular: Disminución del tamaño del testículo.

Ipsilateral: Que se encuentra o tiene lugar en el mismo lado.

Maniobras de valsalva: Persona en decúbito supino, para que puje y halla una dilatación de la vena testicular y del plexo pampiniforme.

Mesénquima: Tejido conjuntivo embrionario que forma la mayor parte del mesodermo. Está formado por células estrelladas y separadas entre sí por una matriz gelatinosa. Durante su desarrollo da lugar a los tejidos óseo, conjuntivo y cartilaginoso

Plexo pampiniforme: Es un grupo de venas dentro del cordón espermático que se encargan del retorno sanguíneo de los testículos. Se cree que éste plexo tiene un papel importante en la regulación de la temperatura testicular para mantenerla en los rangos propicios para la producción de espermatozoides.

ABREVIATURAS Y SIGLAS EMPLEADAS

ARMm: Ácido ribonucleico mensajero.

CG: Células germinales.

CL: Células de Leydig.

CS: Células de Sertoli.

DFC: Diclorofluoresceína.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

eNOS: Óxido nítrico sintetasa endotelial.

EO: Estrés oxidante.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FC: Ferricianuro.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

FSH: hormona foliculoestimulante.

GF- α : Factor de crecimiento alfa.

GF- β : Factor de crecimiento beta.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina.

GPx: Glutación peroxidasa.

GS: Glutación reductasa.

GST: Glutación S- Transferasa.

H₂O₂: peróxido de hidrogeno.

HIF-1: Factor de hipoxia 1.

HONOO \cdot : Ácido peroxinitrito.

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina.

IH: Índice Histopatológico.

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible.

LH: Hormona luteinizante.

mNOS: Óxido nítrico sintetasa mitocondrial.
nNOS: Óxido nítrico sintetasa neuronal.
NOS: Óxido nítrico sintetasa.
NP: Nitroprusiato.
O₂⁻: Súper oxido.
OH⁻: Radical hidroxilo.
ON: Óxido nítrico.
ONOO⁻: Peroxinitrito.
PBS: buffer fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.
RA: Receptor de andrógenos.
RL: Radicales libres.
Se-GPx: Glutación peroxidasa dependiente de selenio.
SH: Grupo tiol.
SOD: Súper oxido dismutasa.
TBA: Ácido tiobarbitúrico.
VAR: Varicocele.

ANEXO

Anexo 1. Índice Histopatológico.

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

