

11281
45



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**ASPECTOS CELULARES Y ENDOCRINOS RELACIONADOS
CON EL DESCENSO TESTICULAR EN RATAS CON
CRIPTORQUIDIA EXPERIMENTAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A :
M en C ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

DIRECTOR DE TESIS:
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003

A



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 realizó bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y el Instituto Nacional de Pediatría.

Revisores:

Dr. Gregorio Pérez Palacios

Dr. Horacio Merchant Larios

Dra. Susana Helena Kofman Epstein

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Javier Valencia Méndez

La presente tesis fue apoyada por la beca doctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 138339).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo intelectual.

NOMBRE

V. Huéscar

Rosa María Viquevas

FECHA

23 oct - 05

FIRMA

[Firma manuscrita]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

Al Dr. Horacio Merchant Larios por el apoyo, los conocimientos transmitidos y su larga experiencia son un ejemplo a seguir.

A la Directora de Investigación la Dra. Alessandra Carnevale Cantoni y la Subdirectora de Medicina Experimental la Dra. Sara Frias Vázquez de la Torre de Investigación "Dr. Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría por todas las facilidades y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Vicente Díaz por el apoyo brindado para la realización del radioinmunoanálisis.

A la Dra. Gabriela Morali por su dedicación, paciencia, confianza e ideas aportadas a este trabajo.

Al jurado por su valiosa ayuda en la revisión y corrección de la tesis: Dr. Gregorio Pérez Palacios, Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Susana Helena Kofman Epstein, Dr. Pablo Pacheco Cabrera, Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, Dra. Margarita Martínez Gómez y Dr. Javier Valencia Méndez.

A mi mejor amiga la Dra. Norma Moreno, quién además de brindarme su amistad, enriqueció este trabajo con su valiosa colaboración y comentarios.

A mis tres hombres Julio, Dany y César quienes llenan mi vida de amor y felicidad.

A mis padres: Rogelio y Martha quienes con su amor y estímulo son un ejemplo para mí.

A mi familia: Gaby, Víctor, Dany, Angélica, Mony, Carlos, Adry, Marco, Karina, Paola, Rodrigo, Carlitos, Valeria, Samantha y Andrea.

Con mucho cariño a mis amigos y compañeros: Gabriela, Pedro, Edgar, Silvia, Luis, Isabel, Alejandro, José, Valeria, Verónica, Elizabeth, Yola, Margarita y Arturo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ASPECTOS CELULARES Y ENDÓCRINOS RELACIONADOS CON EL DESCENSO TESTICULAR EN RATAS CON CRIPTORQUIDIA EXPERIMENTAL

CONTENIDO

I. Resumen	4
II. Abstract	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. El descenso testicular	6
1.2. Teoría bifásica del descenso testicular	6
1.2.1. Factores que controlan la primera fase del descenso testicular	9
1.2.1.1 Substancia inhibidora de los conductos de Müller	9
1.2.1.2. 1 Factor asociado a la insulina 3	11
1.2.1.3. Factor esteroideogénico	11
1.2.1.4. Ligamento suspensor craneal	12
1.2.2. Factores que controlan la segunda fase del descenso testicular	13
1.2.2.1 Presión abdominal	13
1.2.2.2. Andrógenos	13
1.2.2.3. Nervio genitofemoral y el núcleo motor	15
1.2.2.4. Nervio genitofemoral y el núcleo sensitivo del ganglio espinal dorsal	15
1.2.2.5. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	16
1.3. Aspectos generales de la criptorquidia	17
1.4. Etiología	18
1.5. Criptorquidia inducida experimentalmente	20
2. OBJETIVOS	21
3. HIPÓTESIS	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS	22
4.1. Inducción de la criptorquidia	22
4.2. Radioinmunoanálisis	22
4.3. Determinación de receptores para andrógenos en el gubernáculo	23

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4. Estudio ultraestructural del gubernáculo.....	24
4.5. Marcaje retrógrado del nervio genitofemoral con <i>fast-blue</i>	24
4.6. Determinación de los receptores para andrógenos y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina en el núcleo motor y sensitivo del nervio genitofemoral	25
5. RESULTADOS	25
5.1. Radioinmunoanálisis.....	26
5.2. Receptores para andrógenos en el gubernáculo.....	26
5.3. Ultraestructura del gubernáculo.....	26
5.4. Receptor para andrógenos y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina en el núcleo motor y sensitivo del nervio genitofemoral.....	27
FIGURAS.....	30
TABLAS.....	43
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIÓN	51
8. REFERENCIAS	52

I. RESUMEN

Los bajos niveles de testosterona (T) circulante durante el momento del descenso testicular inguinoescrotal causan criptorquidia tanto en el ser humano como en la rata. El tratamiento con gonadotropina coriónica humana (hCG) induce el descenso testicular al estimular la producción de T. La T puede actuar directa o indirectamente sobre una estructura mucoproteica llamada gubernáculo para llevar al cabo el descenso testicular. Se ha propuesto que la acción directa induce cambios funcionales y morfológicos en el gubernáculo y la indirecta se lleva al cabo a través de las neuronas del nervio genitofemoral (NGF). En este estudio se determinó los niveles de T y se correlacionó con la ultraestructura e inmunocitoquímica del gubernáculo y las neuronas del núcleo motor y sensitivo del ganglio espinal dorsal (GED) del NGF durante el descenso testicular inguinoescrotal. La criptorquidia fue inducida administrándoles estradiol a las ratas prepúberes. Se compararon a las ratas con descenso testicular inducido por la administración de hCG con ratas controles que permanecieron criptorquídicas. Se determinaron los niveles de T durante el descenso testicular y se evaluó la ultraestructura del gubernáculo y la detección inmunocitoquímica de las células que expresan al receptor de andrógenos (RA). Las neuronas del núcleo motor y del núcleo sensitivo del GED fueron marcadas mediante tinción retrógrada con *fast-blue* y la expresión de los RA y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) fueron detectados empleando inmunofluorescencia. En los animales tratados con hCG se encontró, al microscopio electrónico, material amorfo electrodenso en la matriz extracelular y el RA fue principalmente localizado en el núcleo de los fibroblastos del tejido conjuntivo del gubernáculo. El número de neuronas motoras que expresan el RA fue significativamente mayor en el grupo tratado con hCG y el número que expresan el CGRP fue menor en este mismo grupo. En el GED, el número de células inmunoreactivas al CGRP fue similar en los dos grupos, pero los RA no se detectaron. Los presentes resultados apoyan la hipótesis de que la T actúa directamente en los fibroblastos probablemente induciendo la degradación de la matriz extracelular en el gubernáculo. Se sugiere que el núcleo motor del NGF es un blanco directo de la T que puede regular al CGRP en el núcleo sensitivo del GED para llevar al cabo el descenso testicular. Por lo tanto los presentes resultados sugieren que la T actúa directamente sobre el gubernáculo y en el núcleo motor pero indirectamente en el GED del NGF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. ABSTRACT

Low levels of circulating testosterone (T) during the inguinoscrotal descent of the testis cause cryptorchidism in humans and rats. Treatment with human chorionic gonadotrophin (hCG) induces testis descent by stimulating production of T. For testis descent, T may act directly or indirectly on the gubernaculum. The direct action of T has been proposed to induce functional and morphological changes in the gubernaculum, while the indirect action is carried out through the neurons of the genitofemoral nerve (GFN). In this study, levels of plasma T were measured and correlated with ultrastructural and immunocytochemical studies of the gubernaculum and neurons of the motor and sensitive nuclei of the dorsal root ganglion (DRG) of the GFN during the inguinoscrotal testicular descent. Cryptorchidism was induced administering estradiol to pre-pubescent rats. Rats with testicular descent induced by the administration of hCG were compared with control rats that remained cryptorchid. T levels were measured during testis descent and the ultrastructure of the gubernaculum was assessed, as well as the immunocytochemical detection of cells expressing the androgen receptor (AR). Neurons of the motor and sensitive nuclei of the DRG were marked by retrograde staining with fast-blue and the expression of the AR and the calcitonin gene-related peptide (CGRP) were localized using immunofluorescence.

At the electron microscope, electron-dense amorphous material was found in the extracellular matrix of those animals treated with hCG. Immunofluorescence revealed that AR was mainly located in nuclei of the fibroblastic cells in the connective tissue of the gubernaculum. The number of motor neurons that expressed AR was significantly greater in the group treated with hCG than in controls while the number that expressed CGRP was lesser. In the DRG, the number of cells immunoreactive to CGRP was similar in both groups while AR were not detected. These results support the hypothesis that T acts directly on fibroblasts probably inducing the degradation of the extracellular matrix in the gubernaculum. It is suggested that the motor nucleus of the GFN is a direct target of T which in turn regulates the CGRP in the sensitive nucleus of the DRG for testis descent. Therefore, present results suggest that T acts directly on the gubernaculum and on the motor nucleus but indirectly on the DRG of the GFN.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la evolución de los mamíferos, las gónadas masculinas han asumido una posición progresivamente baja, con relación al ovario, aun mas se localizan fuera de la cavidad abdominal (Bedford, 1978; Williams y Hutson, 1991). El sitio exacto y la estructura del escroto varía entre las especies, pero en todas, el escroto mantiene al testículo a una temperatura por debajo de la corporal (Zorgniotti, 1991).

1.1. EL DESCENSO TESTICULAR

El testículo esta ubicado en etapas embrionarias en el abdomen y posteriormente se desplaza hacia el escroto. En posición abdominal está suspendido por dos ligamentos uno que une el riñón a la gónada, llamado ligamento suspensor craneal y el otro que conecta el testículo y el epidídimo al piso del escroto denominado gubernáculo.

1.2. TEORÍA BIFÁSICA DEL DESCENSO TESTICULAR

El descenso de los testículos, en el ser humano y otras especies como la rata, es un evento complejo, mediado por factores tanto hormonales como anatómicos, que se relacionan con el desarrollo del gubernáculo, el proceso vaginal, el canal inguinal, los vasos espermáticos y el escroto (Heyns y Hutson, 1995).

Hutson y Donahoe (1986) propusieron que el descenso testicular se presenta en dos fases denominadas transabdominal e inguinoescrotal. Durante la primera el testículo se desplaza hacia la zona inguinal y en la segunda fase hacia el escroto. La primera fase del descenso testicular se presenta en el día 15.5 de la gestación en la rata. La segunda fase ocurre entre el día 19 de la gestación al día 21 a 23 postnatal (Arredondo y cols., 1991; Wensing, 1986).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha propuesto que una de las estructuras con mayor participación en el descenso de los testículos es el gubernáculo (Fig. 1). Este fue descrito por primera vez por John Hunter (1786) como una estructura fibrosa que une el testículo al escroto. Se diferencia durante los días 14 a 15 de la gestación en la rata (Fujikake 1989). La formación y diferenciación de esta estructura es crucial para el descenso exitoso del testículo. El gubernáculo en la rata se divide en dos partes una craneal y la otra caudal. La porción craneal conectada con el testículo es un cordón por lo que es llamado ligamento, es rico en células mesenquimatosas, y la parte caudal se conecta con la pared retroabdominal y se expande como bulbo gubernacular en donde predominan células de músculo estriado, mesenquimatosas, fibras de colágena y una matriz rica en glicosaminoglicanos (Radhakrishnan y cols., 1979; Fujikake 1989).

Para que el descenso testicular se lleve a cabo es necesario que el gubernáculo presente cambios morfológicos de crecimiento (fase transabdominal) y de regresión (fase inguinoescrotal). Ambos procesos parecen estar bajo diferentes mecanismos de regulación.



Figura 1. Micrografía en donde se muestra el gubernáculo, estructura que participa en el descenso testicular. Testículo (T), epidídimo (E). Tomado de Arredondo y cols., 1991.

El crecimiento gubernacular se presenta durante la fase transabdominal, justo antes del descenso testicular (Weil, 1885; Heyns y cols., 1990), y consiste en un aumento en el tamaño de esta estructura, dado por una proliferación celular, síntesis de glicosaminoglicanos y de ácido hialurónico (Heyns y cols., 1990). Este proceso es indispensable ya que inicia la dilatación del canal inguinal y del escroto, permitiendo el libre paso del testículo a través de ellos (Heyns y Hutson, 1995).

Durante el descenso testicular inguinoescrotal el gubernáculo tiene un papel importante, aunque su participación no ha sido del todo aclarada. Se ha demostrado que durante esta fase se incrementa la actividad de la fosfatasa ácida, la densidad celular y la concentración de colágena (Baumans y cols, 1981). En el gubernáculo se remueve la matriz extracelular y este culmina como un tejido fibroso que mantiene pegado el testículo con el escroto, después del descenso (Wensing, 1973 Heyns y cols., 1990). El ligamento del gubernáculo tiende a acortarse y se incorpora al bulbo (Heyns y Hutson 1995). La falla en la regresión gubernacular puede impedir el descenso normal del testículo (Wensing, 1973; Mc Mahon y cols., 1995).

Se sugiere que el descenso transabdominal se lleva a cabo por la participación de la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS) (Hutson y Donahoe, 1986). Recientemente, también se ha reportado la participación del factor asociado a la insulina-3 (InsI3) (Nef y Parada, 1999; Zimmerman y cols., 1999). Los andrógenos no tienen una participación directa, aunque se dice que controlan la regresión del ligamento suspensor craneal para el desprendimiento del testículo y el riñón para su posterior desplazamiento hacia el escroto (Van der Schoot, 1996). El descenso inguinoescrotal está bajo el control de la testosterona en donde también se ha propuesto que participa la presión abdominal (Hutson y Donahoe, 1986) (Fig.2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

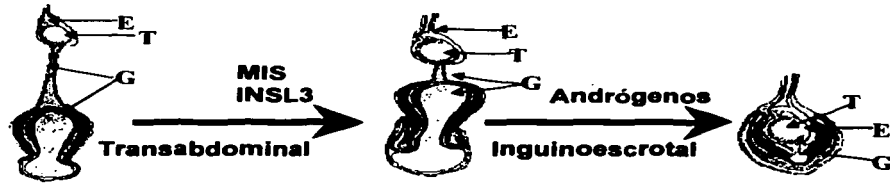


Figura 2. Fases del descenso testicular. En el esquema superior se aprecian las diferentes posiciones del testículo. En la primera columna se observa al testículo en posición abdominal, en la segunda inguinal y en la tercera escrotal. Es clara la participación del gubernáculo para este proceso. Las micrografías inferiores se correlacionan con la posición esquemática de los testículos. Epididimo (E), testículo (T), gubernáculo (G) y riñón (R). Tomado de Shono y cols., 1994.

1.2.1. FACTORES QUE CONTROLAN LA PRIMERA FASE DEL DESCENSO TESTICULAR

1.2.1.1. SUBSTANCIA INHIBIDORA DE LOS CONDUCTOS DE MÜLLER

La MIS es una glucoproteína de 140-kDa producida por la célula de Sertoli y es responsable de la regresión de los conductos de Müller durante la gestación (Josso y cols., 1993; Lee y Donahoe, 1993; Bashir, 1995). Se cree que la MIS

participa en la primera fase del descenso testicular estimulando el sobrecrecimiento gubernacular.

Los resultados de varios estudios que apoyan el papel de la MIS durante esta fase del descenso indican lo siguiente: a) los modelos animales con criptorquidismo abdominal tienen presentes los conductos de Müller (Josso y Tran, 1979; Hutson, 1987; Hutson y cols., 1990), b) en humanos con intersexo y en ratones tratados con estradiol durante la gestación, la posición de los testículos abdominales es proporcional al grado de retención de los conductos de Müller (Scott, 1987; Hutson y cols., 1990; Abe y Hutson, 1994) y c) en los seres humanos que presentan defectos en el gen de la MIS o su receptor (síndrome de persistencia de los conductos de Müller), los testículos se localizan en el abdomen y el gubernáculo no presenta la fase de sobrecrecimiento (Hutson y cols., 1994).

También hay estudios que aportan argumentos en contra del papel de la MIS en el sobrecrecimiento del gubernáculo; los resultados indican lo siguiente: a) en estudios *in vitro* la MIS de bovino no causa división mitótica de los fibroblastos gubernaculares de cerdo, lo que sugiere que la MIS no estimula el sobrecrecimiento del gubernáculo (Fentener van Vlissingen y cols., 1988); b) pacientes con persistencia de los conductos de Müller presentan testículos abdominales, causados por la persistencia de una conexión anatómica del testículo con el conducto de Müller y no por la inhibición del sobrecrecimiento del gubernáculo (Guerrier y cols., 1989; Josso y cols., 1993); c) solo en algunos pacientes con testículos abdominales persisten los conductos de Müller (Hadziselimovic, 1983) y d) recientemente Bartlett y cols. (2002) mencionan que los ratones transgénicos con deficiencia del gen que codifica para el receptor de la MIS tienen afectado el desarrollo del músculo cremaster pero esto no influye en el desarrollo del gubernáculo y en el descenso testicular del ratón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.1.2. FACTOR ASOCIADO A LA INSULINA 3

El INSL3 también es conocido como insulina asociada a Leydig (Ley I-L) y como factor asociado a la relaxina (RLF). Se ha demostrado criptorquidismo bilateral en ratones macho con ausencia del factor asociado a la insulina 3 (INSL3), debido a un mal desarrollo del gubernáculo (Nef y Parada, 1999; Zimmermann y cols., 1999). Zimmermann y cols., (1999) crearon un ratón *knockout* para el INSL3. Encontraron que las hembras mutantes eran fértiles y producían críos de tamaño normal, sin embargo todos los ratones machos *knockout* presentaban testículos criptorquídicos bilaterales, localizados en el abdomen. Los testículos y el tracto genital podían moverse libremente en la cavidad abdominal, indicando una falta de pegado caudal. Empleando técnicas de microscopía electrónica e histología, encontraron un mal desarrollo del gubernáculo en los embriones de 17 días de gestación. Estos hallazgos claramente demostraron el papel del factor INSL3 en el proceso del descenso testicular. Esta observación y el hecho de que el INSL3 no se expresa en el ovario durante los días 8 a 17 de la gestación, apoyan el papel de este factor en el sobrecrecimiento y diferenciación del primordio gubernacular en ratones macho. La completa virilización de los genitales externos y de los conductos de Wolff, así como la ausencia de los conductos derivados de Müller en los ratones, comprueban que la falla en el desarrollo del gubernáculo no se relaciona con alteración en los niveles de andrógenos y de la MIS durante el desarrollo fetal.

Recientemente se ha demostrado que el INSL3 se une y es activado por el factor esteroideogénico 1 (SF1/Ad4BP) (Zimmermann y cols., 1998).

1.2.1.3. FACTOR ESTEROIDOGENICO 1

El factor esteroideogénico 1 (SF-1/Ad4BP) fue inicialmente aislado y caracterizado como un factor de transcripción expresado en una variedad de tejidos esteroideogénicos, incluyendo el testículo y las glándulas adrenales que regula la expresión de varias enzimas esteroideogénicas (Luo y cols., 1994; Nef y Parada,

1999). Se ha encontrado una gran expresión de este factor en las células de Leydig del testículo y en las células de la teca y cuerpo lúteo en el ovario (Majdic y cols., 1997).

El papel del SF1 como un regulador clave esencial para la diferenciación de la gónada, se sugirió a partir de estudios realizados en ratones transgénicos en los que se inactivó al gen que codifica para el SF1 (*Ftz-F1*). Estos ratones al nacimiento no presentan gónadas ni glándulas adrenales (Luo y cols., 1994) y sus genitales son femeninos. El examen histológico de éstos mostró anomalías en el desarrollo de la cresta gonadal, antes de la primera expresión del RNAm para SF1 en el testículo o el ovario (Hatano y cols., 1994).

El sitio de unión del SF1 ha sido identificado en enzimas, incluyendo la P450c17, la P450scc y la aromatasa (Hutson y Donahoe, 1986; Grocock y cols., 1988; Hutson y cols., 1990). Las dos primeras enzimas son esenciales para la síntesis de andrógenos y la última para estrógenos, y en la subunidad alfa de hormonas glicoprotéicas expresadas en las células gonadotropas de la hipófisis (Visser y cols., 1998).

1.2.1.4. LIGAMENTO SUSPENSOR CRANEAL

El ligamento suspensor craneal (LSC) es un cordón muscular. Tiene un papel importante en la inervación autónoma del ovario. Durante el desarrollo temprano de los genitales, el primordio del LSC está presente en ambos sexos de la rata, cerdo, humano entre otros (Van der Schoot y Elger 1996). En la rata el dimorfismo sexual en el desarrollo del LSC ocurre a mediados de la gestación y se correlaciona con la posición sexo específica de las gónadas (Van der Schoot y Elger, 1996). Se sugiere que la regresión del LSC es importante pero no el efector primario para el descenso transabdominal (Lee y Hutson, 1999).

1.2.2. FACTORES QUE CONTROLAN LA SEGUNDA FASE DEL DESCENSO TESTICULAR

1.2.2.1. PRESION ABDOMINAL

Durante la fase inguinoescrotal la presión abdominal facilita la salida del testículo al abdomen (Gier y Marion, 1969; Hadziselimovic y cols., 1979; Elder y cols., 1982; Frey y cols., 1983; Frey y Rajfer, 1984; Quinlan y cols., 1988; Heyns y Hutson, 1995). Probablemente la presión no se ejerce directamente sobre el testículo, sino sobre la tracción del gubernáculo (Hutson y cols., 1995). No se conocen los factores que controlan la dirección de la migración.

1.2.2.2. ANDRÓGENOS

Durante el descenso testicular inguinoescrotal, que en la rata se lleva a cabo en etapas postnatales, el gubernáculo presenta involución (Baumans y cols., 1983; Wensing, 1986; Vander Schoot y Elder 1996; Cain y cols., 1995; Husmann y Levy 1995), contracción (Bramann y cols., 1884; Radhakrishnan y cols., 1979; Rajfer, 1980; Elder y cols., 1982; Yamanaka y cols., 1993; Terada y cols., 1994), proliferación (Hrabovszky y cols., 2002) o migración (Hutson y cols., 1997; Lam y cols., 1998) permitiendo en cualquiera de estos casos, el desplazamiento del testículo y eversión del bulbo gubernacular. Se ha aceptado que esta fase depende de los andrógenos (Hadziselimovic, 1983; Abney y Keel, 1989; Husmann y Levy, 1995; Heyns y Hutson, 1995) y no se presenta en animales con deficiencia experimental de esta hormona (Hutson, 1986; Grocock y cols., 1988;). En seres humanos con completa resistencia a los andrógenos, el gubernáculo permanece alargado y no ocurre este proceso (Radhakrishnan y Donahoe, 1981; Hutson y Donahoe, 1986). También se ha demostrado que la regresión del gubernáculo se bloquea al administrar, en etapas prenatales el antiandrógeno flutamida (Spencer y cols., 1991; Shono y cols., 1994; Cain y cols., 1995; McMahan y cols., 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Actualmente no se ha definido si la acción de los andrógenos es directa o indirecta sobre el gubernáculo, aunque se sabe que hay receptores para andrógenos en las células gubernaculares, tanto de la rata como del ser humano (Oprins y cols., 1988; Husmann y McPhaul, 1991a; Bentvelsen y George, 1993; Hosie y cols., 1999). La rata presenta una máxima expresión de éstos en los días 15 a 18 de la gestación con un decrecimiento posterior (George y Peterson, 1988; Husmann y McPhaul, 1991a). Se sugiere que las células mesenquimatosas presentan mayor cantidad de receptores para andrógenos, que las fibras musculares (Husmann y McPhaul, 1991a).

La posibilidad de que los andrógenos actúen vía indirecta, sobre el gubernáculo, fue considerada por Beasley y Hutson en 1987 después de cortar el nervio genitofemoral (NGF) de la rata neonata e impedir el descenso testicular (Beasley y Hutson, 1987; Beasley y Hutson, 1988) (Fig. 3). Se ha sugerido que este daño puede bloquear algún proceso que está bajo control de los andrógenos, suponiendo que éstos actúan vía el NGF (Hutson y Beasley, 1987).

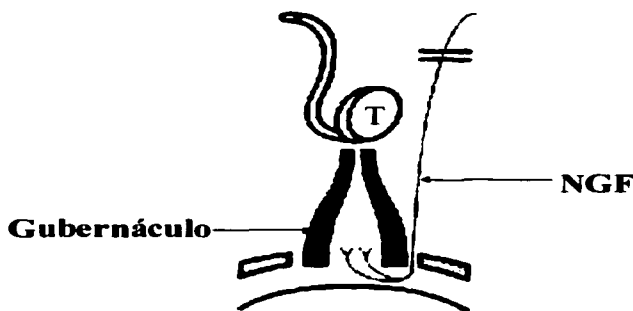


Figura 3. Esquema que muestra los estudios realizados por Beasley y Hutson en 1987. En estos se seccionó al nervio genitofemoral (NGF) que inerva el gubernáculo y se inhibió el descenso del testículo (T). Tomado de Clarnette y cols., 1996.

La hipótesis del NGF ha conducido a los investigadores a estudiar su participación en esta fase del descenso. Los estudios experimentales empleando

antiandrógenos durante la fase en que se desarrollan diversos núcleos dimórficos espinales (17 a 18 días de gestación en la rata) demostraron bloqueo de la migración inguinoescrotal (Breedlove y Arnold, 1983).

1.2.2.3. Nervio genitofemoral y el núcleo motor

Se ha demostrado en el ser humano que las lesiones en la región espinal L1 a L2, sitio donde se localiza el núcleo del NGF, se puede asociar con criptorquidia (Hutson y cols., 1988). Estudios experimentales empleando ratas con sección de la médula espinal al nacimiento, demuestran que el 39% de estas, no presentan descenso testicular (Beasley y Hutson, 1987; Hutson y cols., 1988).

Utilizando técnicas de inmunocitoquímica se han identificado receptores para andrógenos en las células que componen al núcleo motor del NGF desde los 15 días de la gestación en la rata (Cain y cols., 1994) o en etapas postnatales (Won y cols., 1998) sin embargo estos autores no trazaron la vía del NGF por lo que no se tiene la certeza de que este núcleo realmente pertenezca al del NGF u otro núcleo dimórfico. Por lo tanto, se sugiere que el efecto de los andrógenos sobre el gubernáculo puede ser mediado por la médula espinal y que el NGF puede inducir su contracción.

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) se ha identificado en las terminaciones nerviosas de uniones neuromusculares y se sabe que aumenta la contracción del músculo estriado (Tukami y cols., 1986) y gubernacular (Park y Hutson, 1991; Momose y cols., 1992; Shono y cols., 1995). También se han demostrado la existencia de los receptores para este péptido en el gubernáculo de rata neonata (Yamanaka y cols., 1991; Terada y cols., 1994).

1.2.2.4. Nervio genitofemoral y el núcleo sensitivo del ganglio espinal dorsal

Recientemente los estudios realizados por Schwindt y cols., (1999) mencionan que la cantidad de células inmunoreactivas al CGRP en el núcleo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

motor es mínima comparado con el núcleo sensitivo del ganglio espinal dorsal (GED) del mismo NGF. Por lo tanto este autor propone al núcleo sensitivo del GED como el responsable de la producción y liberación del CGRP y con ello la respuesta del músculo gubernacular para producir el descenso (Fig. 4).

Se ha comprobado que los andrógenos tienen un efecto masculinizante en el núcleo sensitivo del GED del NGF ubicado en la porción espinal L1 a L2, mas que en el núcleo motor como había sido reportado (Schwindt y cols., 1999; Hrabovszky y cols., 2000). Se ha demostrado en ratas Sprague-Dawley un dimorfismo sexual en este núcleo sensitivo del NGF, en cuanto al número de cuerpos celulares e inmunoreactividad al CGRP (Hrabovszky y cols., 2000). La administración prenatal del antiandrógeno flutamida, causa una disminución significativa en el número e inmunoreactividad al CGRP de células que conforman al núcleo sensitivo del GED en ratas macho (Hrabovszky y cols., 2000).

1.2.2.5. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

Se ha identificado al CGRP en el NGF de roedores neonatos (Larkins y cols., 1991; Goh y cols., 1994). Este es un neuropéptido con estrecha homología con la calcitonina y se produce por un *splicing* alternativo de la transcripción de su RNA (Rosenfeld y cols., 1983).

Se han demostrado diferentes funciones de este péptido en el sistema nervioso (Tache y cols., 1992). En nervios motores está involucrado en la regulación de la síntesis de receptores de acetilcolina en el músculo esquelético (New y Mudge, 1986). En el sistema autónomo tiene diferentes efectos como la vasodilatación periférica (Sigrist y cols., 1986; Manton y cols., 1988; Santicioli y cols., 1998).

Se propone que la liberación del CGRP por parte del NGF puede ser un proceso semejante a lo reportado para el núcleo del músculo bulbocavernoso. Este núcleo es sexualmente dimórfico y la liberación del CGRP es regulada por el

transporte retrógrado de un factor soluble no identificado, proveniente del propio músculo (Popper y cols., 1992).

Otros autores reportan receptores a CGRP localizados en el músculo cremaster de la rata en desarrollo (Yamanaka y cols., 1993) y probablemente este péptido actúa como un neurotransmisor neuromuscular (Popper y Micevych, 1989).

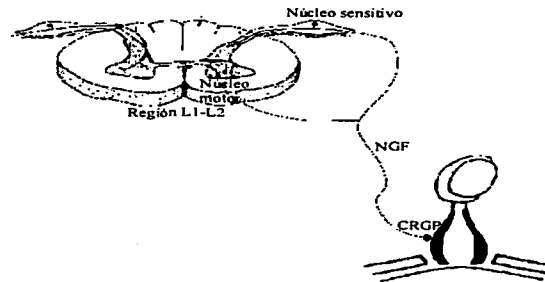


Figura 4. Representación esquemática de la inervación proveniente de los núcleos motor y sensitivo del nervio genitofemoral (NGF) a nivel espinal L1 a L2. Algunos autores ubican al péptido relacionado con el gen de la calcitonina en la terminación nerviosa.

1.3. ASPECTOS GENERALES DE LA CRIPTORQUIDIA

La criptorquidia, o testículo no descendido, es una patología que consiste en una falla en el descenso testicular hacia el escroto. Esta patología es común y de gran trascendencia en urología pediátrica, debido a su frecuencia y a las consecuencias que sobre la fertilidad se derivan de esta enfermedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La incidencia en niños es del 2.6% al nacimiento, cifra que se incrementa en niños prematuros hasta el 30%. La criptorquidia en gran medida desaparece espontáneamente en ambas poblaciones, al 0.8% al año de edad (Husmann y Levy, 1995).

La temperatura en la que se encuentra el testículo en posición escrotal es de 1.5 a 2.0°C menor que la temperatura corporal. Esta localización es esencial para que se desarrolle una espermatogénesis normal así como una función epididimal óptima (Campbell, 1959).

Con base a donde se localiza el testículo, la criptorquidia se puede clasificar de la siguiente manera: 1) abdominal, cuando el testículo se localiza dentro del canal inguinal interno; 2) canalicular, cuando esta en el canal inguinal, entre el anillo inguinal interno y externo y 3) ectópico, si se ubica fuera de la vía normal del descenso, usualmente superficial a la fascia oblicua externa (Elder, 1988).

Los testículos criptorquídicos tienen mucho más riesgo de malignidad que los normalmente descendidos. La probabilidad de que un paciente criptorquídico desarrolle tumor testicular es de 7.3 a 9.7 veces mayor que la población masculina normal (Farrer y col., 1985; Whitaker, 1988; Hinman, 1993).

1.4. ETIOLOGÍA.

El criptorquidismo puede ser causado por alguna anomalía que interrumpa el descenso normal de los testículos (Hutson y Beasley, 1987). Para que el descenso se lleve a cabo es indispensable la participación de factores hormonales y anatómicos por lo que su etiología es multifactorial.

Los testículos abdominales comprenden solo del 5 al 10% de los casos de criptorquidia. El testículo no descendido es comúnmente localizado cerca del anillo inguinal. La causa más común es por defecto en la secreción de andrógenos

prenatales secundarios a la deficiencia de la estimulación de gonadotropinas hipofisarias o baja producción de gonadotropinas por la placenta (Hadziselimovic, 1983; Abney y Keel, 1989; Husmann y Levy, 1995). Las pruebas endocrinas de los bebés recién nacidos con testículo no descendido han mostrado anomalías (Gendrel y cols., 1980; Job y cols., 1988; Yamanaka y cols., 1991). Solo durante los primeros meses postnatales se presenta deficiencia en la producción de andrógenos (2 a 4 meses) o en la producción de la MIS (4 a 12 meses) (Baker y cols., 1990; Baker y Hutson, 1993; Josso y cols., 1993; Lee y Donahoe 1993). Sin embargo la endocrinopatología postnatal del testículo no descendido es por defecto primario en el testículo o es producto de una degeneración dependiente de la temperatura.

Las patologías endocrinas como defecto en la síntesis de testosterona o función de sus receptores, pueden causar criptorquidia (Hutson, 1986; Hutson y Beasley, 1987; Guerrier y cols., 1989). El testículo no descendido está presente en muchos síndromes. La microcefalia es un factor común el cual se asocia a una mala función hipotalámica o hipofisaria (Hadziselimovic y cols., 1987). Las anomalías mecánicas periféricas son también comunes y muchas tienden a una compresión externa de la región inguinoescrotal (Cook y Stephens, 1988; Luthra y cols., 1989; Fallat y cols., 1992). Las patologías urológicas como el síndrome de *Prune-belly* y válvulas uretrales posteriores tienen alta frecuencia de criptorquidismo (Nunn y Stephens, 1961; Anderson y cols., 1979; Pagon y cols., 1979; Moerman y cols., 1984; Beasley y cols., 1988;). Un mecanismo posible incluye una masiva obstrucción del tracto urinario prenatal o defecto mesodérmico. Se han propuesto tres causas probables: alteración en la presión abdominal (Attah y Hutson, 1993), daño traumático al gubernáculo y defecto hipotalámico (Kropp y Voeller, 1981; Hutson y cols., 1988).

Por otro lado, altos niveles de estrógenos maternos durante la gestación están involucrados en la etiología del criptorquidismo en humanos (Crosgrave y cols., 1977; Depue y cols., 1983; Hadziselimovic y cols., 2000). Se ha considerado que este esteroide inhiben la producción de andrógenos por actuar directamente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en las células de Leydig (Hadziselimovic y cols., 1986; Abney, 1999). Sin embargo se ha sugerido que el criptorquidismo inducido por la administración de estradiol es provocado por un bloqueo de la testosterona vía el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Nef y Parada, 1999). Recientemente se ha reportado un incremento en la incidencia del criptorquidismo y se ha asociado a la exposición de fetos varones a niveles supranormales de estradiol ya que algunos contaminantes medioambientales y productos naturales poseen actividad estrogénica (Toppari y cols., 1996).

1.5. CRIPTORQUIDIA INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE

Considerando que la producción de andrógenos se puede alterar por una acción directa o indirecta del estradiol sobre las células de Leydig, es lógico pensar que un incremento en los niveles de estrógenos maternos puede interrumpir la función testicular y alterar la producción de andrógenos que están involucrados en la fase inguinoescrotal del descenso testicular. Se han reportado altos niveles de estradiol maternos durante la gestación de niños criptorquídicos e incremento en la concentración de esta hormona en el testículo con criptorquidia (Damber y Bergh, 1980; Hadziselimovic y cols., 2000).

Se conoce que la administración de estradiol produce disminución del peso testicular, alteración en la esteroidogénesis, en las células de Leydig, Sertoli y disminución en el número de receptores a LH (Samuels y cols., 1964; Bartke y cols., 1977; Saez y cols., 1978; Murono y Payne, 1976; Sairam y Berman, 1979; Brinkmann y cols., 1980; Kalla y cols., 1980; Melner y Abney, 1980; Perez y cols., 1996; Perez y cols., 1997; Sharpe y cols., 1998; Atanassova y cols., 1999; Fisher y cols., 1999) lo cual coincide con las alteraciones reportadas para la criptorquidia (Lewis, 1948; Damber y cols., 1980; Bergh y cols., 1984a; Bergh y cols., 1984b; Hovatta y cols., 1986). Basándonos en estos hallazgos nos preguntamos lo siguiente: ¿Qué eventos endócrinos y celulares se presentan al administrar hCG para inducir el descenso testicular en un modelo de criptorquidia experimental? y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

por ello en el presente trabajo se propuso un modelo de criptorquidia por la administración postnatal de estradiol (Rajfer y Walsh en 1977; Lein y cols., 1996).

3. HIPÓTESIS

La administración de hCG a ratas con criptorquidia induce un aumento en los niveles de testosterona sérica. A su vez, la testosterona tiene un blanco directo sobre los receptores para andrógenos en el gubernáculo e indirecto a través de los núcleos motor y sensitivo del ganglio espinal dorsal del nervio genitofemoral para inducir el descenso testicular .

2. OBJETIVO GENERAL

Estudiar algunos mecanismos celulares y endócrinos que participan en el descenso testicular inducido por la Gonadotropina Coriónica humana en un modelo de criptorquidia experimental en la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-** Cuantificar la testosterona circulante y correlacionar con el descenso testicular.
- 2.-** Determinar la presencia de receptores para andrógenos (RA) en el gubernáculo e identificar las células que los presentan.
- 3.-** Estudiar los cambios morfológicos y ultraestructurales que se presentan en el gubernáculo durante el descenso.
- 4.-** Identificar la presencia de RA y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina en los núcleos motor y sensitivo del nervio genitofemoral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 INDUCCIÓN DE LA CRIPTORQUIDIA

Se emplearon 100 ratas macho de la cepa Wistar de 3 días postparto (DPP) con libre acceso al alimento y agua. La criptorquidia se les indujo de acuerdo a lo reportado por Lein y cols., (1996) y consistió en lo siguiente: se les administró diariamente y durante 30 días, inyecciones subcutáneas de $1\mu\text{g}$ de 17β estradiol disuelto en $50\mu\text{l}$ de propilenglicol. Un total de 8 ratas tratadas con el estradiol fueron sacrificadas a los 33 dpp y 500 : l de plasma sanguíneo se tomó para la determinación de testosterona empleando el método de radioinmunoanálisis de fase sólida. El resto de los animales con criptorquidia fueron divididos en dos grupos de 46 animales en cada uno. El grupo llamado criptorquidico-hCG fue tratado diariamente desde los 33 a los 43 dpp con inyecciones subcutáneas de 25 UI/Kg de peso corporal de hCG (Sigma) en agua como vehículo. El otro grupo fue el criptorquidico-control, al cual se le administró únicamente agua.

Los animales se sacrificaron a los 5 y 10 días después de la primera administración tanto de la hCG como del vehículo; es decir a los 38 y 43 dpp. Se obtuvo sangre para determinar los niveles de testosterona circulante. Los gubernáculos se procesaron para estudiar los cambios ultraestructurales durante el descenso y la determinación inmunocitoquímica de los receptores para andrógenos (RA). A otro grupo de animales se les determinó los RA y el CGRP en el núcleo motor y sensitivo del ganglio espinal dorsal (GED) del NGF empleando la técnica de inmunocitoquímica.

4.2. RADIOINMUNOANÁLISIS

Se colectó 1ml de sangre directamente del ventrículo izquierdo y se almacenó en tubos Eppendorf de 1.5ml colocándose en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 minutos para separar el plasma. Este fue almacenado a -80°C hasta su análisis. Los

anticuerpos empleados fueron altamente específicos a la testosterona (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles CA, USA) y se empleó la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida (Matsumoto y Prins, 1998) (detección mínima de 0.04 ng testosterona/ml de plasma). El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 6.5 y 10% respectivamente. La reacción cruzada con la dihidrotestosterona fue de menos del 5%. El porcentaje de radioactividad se interpoló en una curva estándar y se correlacionó con el trazador recobrado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de "t" para grupos independientes a una $p < 0.05$.

4.3. DETERMINACIÓN DE LOS RECEPTORES PARA ANDRÓGENOS EN EL GUBERNÁCULO

El gubernáculo completo y la próstata de un animal adulto que se empleó como control positivo de la técnica, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron en PBS durante 15 minutos y se colocaron en sacarosa al 30% durante 24hrs. Las muestras se congelaron y se realizaron cortes longitudinales de 14 μm de grosor. Los tejidos de los animales criptorquídicos-hCG, criptorquídico-control y próstata se colocaron en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisina. Las laminillas fueron secadas en una cámara al vacío durante 1hr. Se realizó una técnica de contraste con DAPI, por lo que las laminillas se lavaron con la solución de Hanks durante 10 minutos y se incubaron con DAPI por el mismo tiempo. Finalmente se lavaron en agua destilada. Se continuó con la técnica de inmunocitoquímica y los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con tritón X-100 al 1% durante 10 minutos. Después se enjuagaron con PBS y se les colocaron albúmina bovina (BSA) al 1% en PBS durante 2 hr, se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo contra el RA (Santa Cruz, Biotechnology, INC) en una dilución de 1:1000 en BSA durante 24hrs. Posteriormente se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anticonejo conjugado con rodamina (SIGMA) en una dilución de 1:250 durante 1hr en BSA. Finalmente se lavaron y montaron con un medio para fluorescencia (DAKO, Corporation) para su análisis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL GUBERNÁCULO

El gubernáculo *in situ* se fijó con la solución de Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965) y se almacenó en la misma solución durante 2 hrs. Posteriormente se lavó con la solución amortiguadora de cacodilatos 0.1 M, se posfijó con tetróxido de osmio al 1% en buffer de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956) y se procesó para su inclusión en EPON.

Se realizaron cortes longitudinales de 1 μ m de grosor, abarcando tanto el ligamento como el bulbo en un ultramicrotomo, mismos que fueron teñidos por flotación en azul de toluidina al 0.5%. El tejido se montó en portaobjetos y se determinó el área a evaluar al microscopio electrónico que abarcara tanto el bulbo como el ligamento. Posteriormente se realizaron cortes finos, los cuales se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y nitrato de plomo y se evaluaron al microscopio electrónico.

4.5. MARCAJE RETRÓGRADO DEL NERVI0 GENITOFEMORAL CON FAST-BLUE

Las ratas de 36 y 41 dpp de los grupos criptorquídico-hCG y criptorquídico-control fueron anestesiados con Ketamina (35mg/Kg de peso, Imalgen 1000, Merial, México). El peritoneo fue abierto por debajo de los vasos renales y el NGF derecho e izquierdo fue identificado en el músculo *psaos* y seccionado dejando el músculo intacto. Se colocó *fast-blue* (Sigma) en la terminación final seccionada del nervio. Posteriormente los intestinos fueron cuidadosamente colocados en su lugar y el animal fue suturado. Después de 48 horas, tiempo requerido para el transporte retrógrado del trazador, las ratas fueron anestesiadas y se realizó la perfusión intracardiaca con 50ml de PBS, continuando con 200ml de paraformaldehído al 4%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.6. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES PARA ANDRÓGENOS Y EL PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA EN EL NÚCLEO MOTOR Y SENSITIVO DEL NERVIU GENITOFEMORAL

El cordón espinal y el ganglio espinal dorsal (núcleo sensitivo) de las regiones L1 a L2 fueron seccionados y fijados durante 30 minutos en paraformaldehido al 4%. Posteriormente fueron lavados en PBS y almacenados durante dos días en la misma solución conteniendo sacarosa al 30% a 4°C. Se incluyeron en OCT (Tissue Tek) y se congelaron. Se realizaron cortes seriados de 14 µm de grosor y se colocaron en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L lisina. Se les practicó la técnica de inmunocitoquímica para determinar RA y CGRP tal y como se describió para el gubernáculo. El anticuerpo primario contra CGRP fue policlonal de cabra (Santa Cruz, Biotechnology, INC) y se empleó en una dilución de 1:500 durante 24hrs y el anticuerpo secundario anticabra conjugado con fluoresceína (SIGMA) se diluyó 1:200 incubándose durante 1hr. Se lavaron y montaron los cortes. Las neuronas del NGF que expresaron RA y CGRP fueron identificadas por colocación de rojo, verde y azul. Las células azules con o sin RA y CGRP fueron contadas y analizadas estadísticamente empleando la prueba de "t" para grupos independientes a una $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

El criptorquidismo fue exitosamente inducido en todos los animales después de 30 días de tratamiento con el estradiol (Fig. 1 A). En las ratas tratadas con hCG, el descenso testicular se completó en un máximo de 10 días (Fig. 1 B); mientras que en los animales criptorquídicos-control no se presentó el descenso ni el desarrollo de las bolsas escrotales (Fig. 1 C). Ambos grupos mostraron una similar tasa de crecimiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1. RADIOINMUNOANÁLISIS

Con respecto a la determinación de la testosterona plasmática, esta hormona no se detectó en los animales criptorquídicos de 33 dpp. En las ratas con hCG los niveles de testosterona se elevaron en proporción al tiempo de tratamiento, mientras que permanecieron no detectables en las ratas criptorquídicas-controles (Fig.2).

5.2. RECEPTORES DE ANDRÓGENOS EN EL GUBERNÁCULO

Se observaron muchas células positivas al receptor de andrógenos (RA) en el gubernáculo de ratas tratadas con la hCG comparado con el grupo criptorquídico-control tanto a los 5 (38 dpp) como a los 10 días (43 dpp) de iniciado el tratamiento (Fig. 3 A, B). Algunas células positivas al RA fueron distribuidas en el ligamento, pero principalmente estuvieron concentradas en el bulbo. Aunque no se llevó a cabo un análisis cuantitativo, el número de células positivas al RA en el gubernáculo se observó mayor a los 38 dpp comparado con los 43 dpp. Los RA se localizaron en el núcleo de las células gubernaculares, así como en las células epiteliales de la próstata empleada como control positivo en este estudio.

Al contrateñir todos los núcleos de las células del gubernáculo con DAPI, se encontró que las células positivas al RA se localizaron, principalmente, en el tejido conjuntivo entre las fibras musculares (Fig. 3 C).

5.3. ULTRAESTRUCTURA DEL GUBERNÁCULO

El estudio ultraestructural del gubernáculo mostró células similares a los 38 y 43 dpp en ambos grupos. En el ligamento se observaron fibras de colágena y abundante músculo liso con algunos fibroblastos (Fig. 4 A). El escaso número de células positivas al RA vistas al microscopio de luz probablemente corresponda a fibroblastos dado que el tipo celular predominante en el ligamento son las células de músculo liso. Por otro lado, en el bulbo se observaron muchos fibroblastos y

fibras de músculo estriado (Fig. 4 B y 5 A). Los fibroblastos se encontraron en regiones en donde predominó el tejido conjuntivo estrechamente unidos al músculo estriado (Fig. 5 A). Considerando la cantidad y distribución de núcleos positivos al RA en el bulbo, parece probable que estas correspondan a fibroblastos mas que a núcleos de músculo estriado.

Las células apoptóticas fueron escasas en el gubernáculo en regresión de las ratas tratadas con hCG durante el descenso testicular. Únicamente en los animales tratados con hCG de 38 dpp se observó un depósito de material electrodensito en la matriz extracelular (5 B), distribuido al azar en el tejido conjuntivo, entre fibras de colágena y se localizaron cerca de elongados procesos citoplásmicos de los fibroblastos (Fig. 6 A).

5.4. RECEPTOR PARA ANDRÓGENOS Y EL PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA EN EL NÚCLEO MOTOR Y SENSITIVO DEL NERVIIO GENITOFEMORAL

La técnica de marcaje retrógrado a través del NGF con el *fast-blue* nos permitió ubicar a las neuronas en color azul fluorescente en el núcleo motor y sensitivo del ganglio espinal dorsal (GED). Las motoneuronas marcadas fueron localizadas en la lámina VIII de las astas ventrales del cordón espinal a nivel L1 a L2 (Fig. 6 B). El RA se detectó en el núcleo de las motoneuronas (Fig. 7 A, B) y en el núcleo de las células secretoras de la próstata de las secciones adyacentes empleadas como controles positivos. La tabla 1 resume los resultados cuantitativos de las neuronas marcadas con azul que mostraron positividad a los RA. A los 38 dpp el promedio de las neuronas marcadas con *fast-blue* tratadas con hCG fue de 280 ± 9.7 de estas neuronas, 238 ± 4.8 fueron positivas a la inmunotinción con RA. Al día 43 pp, las neuronas marcadas con azul mostraron un promedio de 272 ± 5.0 con 214 ± 5.9 positivas al RA. El grupo criptorquídico-control mostró un promedio de 266 ± 6.9 células azules con 50 ± 3.8 neuronas inmunoreactivas contra el RA a los 38 dpp. A los 43 dpp, las neuronas marcadas

con azul presentaron un promedio de 281 ± 8.6 con 68 ± 5.7 positivas al RA. El número total de motoneuronas que conforman al núcleo del NGF no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos estudiados. Pero el número de neuronas RA positivas fue significativamente mayor en el grupo criptorquídico-hCG comparado con el control ($p < 0.05$).

Finalmente, mientras varias neuronas fueron positivas al marcaje retrógrado con el *fast-blue* en el núcleo sensitivo estas fueron negativas a la inmunotinción para el RA.

Por otro lado, algunas neuronas marcadas con *fast-blue* del núcleo motor mostraron colocalización con el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Fig. 7 C, D). Los resultados cuantitativos son resumidos en la tabla 2. En el núcleo motor la media de neuronas marcadas con *fast-blue* en el grupo criptorquídico-hCG fue de 252 ± 7.8 de estas neuronas 10 ± 2.7 mostró inmunoreactividad al CGRP a los 38 dpp. A los 43 dpp el promedio de neuronas teñidas de azul fue 241 ± 5.5 con 9 ± 1.7 de neuronas positivas al CGRP. En el grupo criptorquídico-control un promedio de 246 ± 7.0 neuronas marcadas con *fast-blue* con 44 ± 4.1 de neuronas positivas al CGRP a los 38 dpp fueron observadas. A los 43 dpp las neuronas marcadas con *fast-blue* fueron de 264 ± 9.6 de estas 39 ± 3.3 fueron positivas al CGRP. Comparando el número de neuronas marcadas con CGRP en el grupo criptorquídico-hCG con el grupo criptorquídico-control, se encontró que el número de neuronas positivas fue significativamente mayor en el grupo control ($p < 0.05$).

El promedio de las neuronas positivas al *fast-blue* en el núcleo sensitivo del GED del NGF fue de 1449 ± 88.7 . Entre estas neuronas, 114 ± 12.8 fueron positivas al CGRP en el grupo criptorquídico-hCG a los 38 dpp. A los 43 dpp la media de neuronas marcadas con CGRP fue de 1630 ± 51.4 , de estas, 213 ± 20.0 fueron positivas a la inmunoreactividad al CGRP. Ninguna diferencia significativa fue detectada entre los dos grupos (Fig. 7 E, F; Tabla 3). En el grupo criptorquídico-control un promedio de 1523 ± 35.4 neuronas fueron positivas al *fast-blue* con

147±13.6 células con CGRP a los 38 dpp. A los 43 dpp un promedio de 1599±29.4 se marcaron con el *fast-blue* y de estas 196±24.6 células fueron positivas al CGRP. Al comparar ambos grupos no se encontró diferencia significativa.

En resumen encontramos en los animales con la administración de la hCG, a diferencia de los controles lo siguiente: a) colágena semidigerida y mucha inmunoreactividad al RA en el gubernáculo; b) en el núcleo motor se encontró un número significativamente mayor de neuronas positivas al RA y disminución en la cantidad de neuronas positivas al CGRP. Finalmente en el núcleo sensitivo del GED se observaron neuronas CGRP positivas y no se observó inmunoreactividad al RA en los dos grupos estudiados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1.

- A.** Imagen en donde se compara la ubicación de los testículos en diferentes animales. La primera imagen del lado izquierdo pertenece a una rata sana, en donde es clara la presencia de los testículos escrotados. En la siguiente rata del grupo criptorquídico-hCG los testículos se observan en posición escrotal. La última rata pertenece al grupo criptorquídico-control y no presentó el descenso de los testículos.
- B.** Amplificación de la imagen de la rata tratada con hCG en donde se observa la posición escrotal de los testículos y el desarrollo del escroto.
- C.** Imagen amplificada de la rata perteneciente al grupo criptorquídico-control, es clara la ausencia de los testículos escrotados así como falta del desarrollo de la bolsa escrotal.

**A****B****C**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

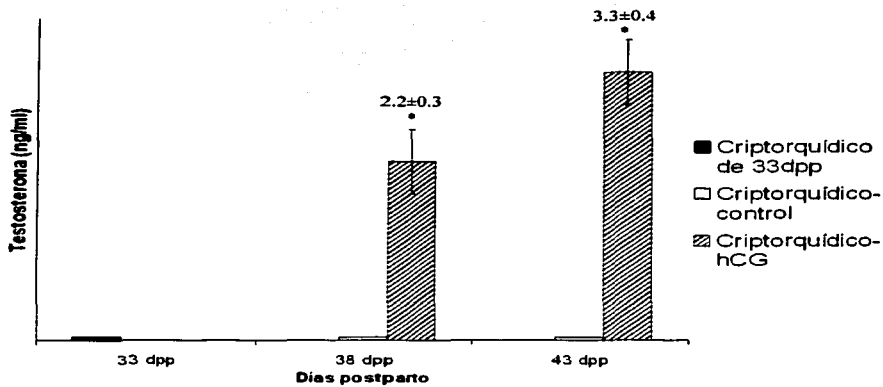


Figura 2. Niveles de testosterona plasmática en los animales criptorquídicos con y sin administración de hCG a los 38 y 43 dpp. La hCG incrementó la producción de testosterona. Se gráfica el promedio \pm el E.E. El análisis estadístico demostró diferencia significativa entre los dos grupos estudiados de cada edad (* $p < 0.05$).

Figura 3.

- A. Inmunofluorescencia que detectó al receptor de andrógenos en el grupo control. Se observan pocas células positivas (flecha) al compararse con la imagen siguiente (B). Aumento 20X.**

- B. Detección del receptor de andrógenos por inmunofluorescencia en el grupo tratado con la hCG en donde se muestran muchas células positivas (flecha). Aumento 20X.**

- C. Las células en color rojo pálido demuestran la colocación del DAPI con la inmunofluorescencia para el receptor de andrógenos (flecha abierta) y los núcleos en azul pertenecen a las células marcadas con DAPI que no tienen al receptor de andrógenos (flecha cerrada). Es claro que los núcleos rojos se ubican por afuera de las fibras de músculo estriado. Aumento 20X.**



A



B



C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4

- A. Empleando la técnica de microscopía electrónica se pudo observar en el ligamento del gubernáculo los componentes tisulares de esta estructura. Células de músculo liso (ML) y fibras de colágena (C). Aumento 2500 X. $\overline{2\mu}$
- B. En el bulbo del gubernáculo observamos muchas fibras de colágena (C), fibras de músculo estriado (ME) con sus características bandas claras y oscuras y fibroblastos estrechamente pegados a las fibras musculares (F). Aumento 2500 X. $\overline{2\mu}$

37



A



B

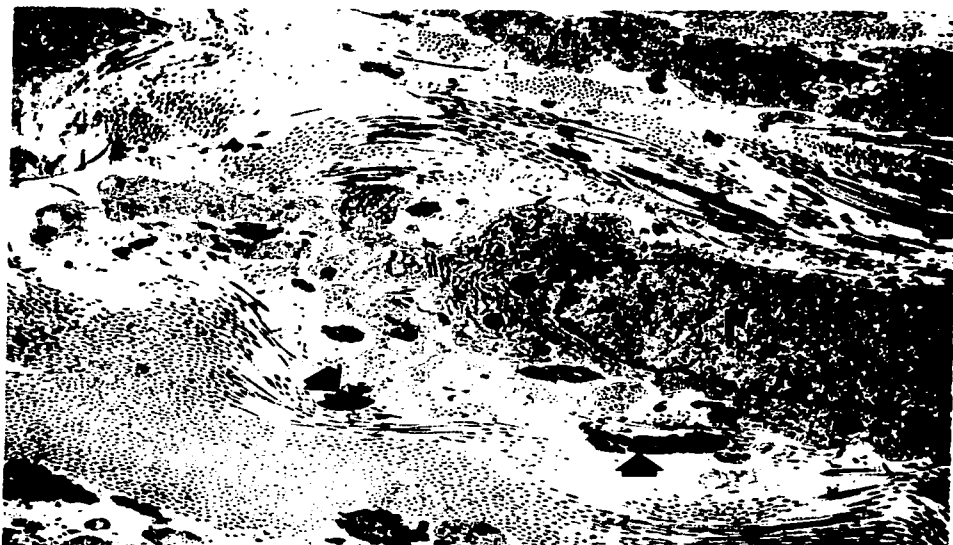
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5

- A. Micrografía electrónica en donde se observa en el bulbo del gubernáculo a fibroblastos (F) en el tejido conjuntivo que rodea a las fibras de músculo estriado (ME). Es probable que los receptores de andrógenos se ubiquen en estos fibroblastos. Se aprecia claramente la estrecha asociación entre fibroblastos y las células musculares. Aumento 1000 X. $\overline{5\mu}$**
- B. Micrografía del bulbo gubernacular de un animal del grupo criptorquídico con hCG en donde se observa material electrodensó (flecha) distribuido en la matriz extracelular y cercano a un fibroblasto (F). Aumento 6000 X. $\overline{1\mu}$**



A



B

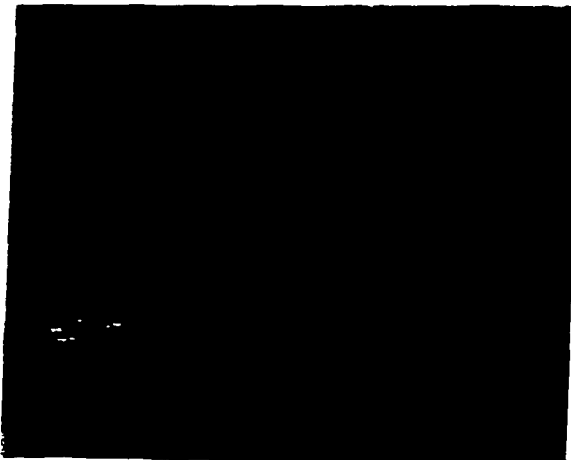
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6

- A. Micrografía electrónica de un animal del grupo criptorquídico-hCG en donde se observa un fibroblasto (F) con elongados procesos citoplásmicos (flecha) asociados al material electrodensso (punta de flecha). Aumento 12000 X. 500nm.**
- B. Corte de médula espinal a nivel L1 a L2 en donde se aprecia un conjunto de neuronas marcadas con el *fast-blue* (color azul) y ubicadas en la lámina VIII de las astas ventrales. Aumento 2.5 X.**



A

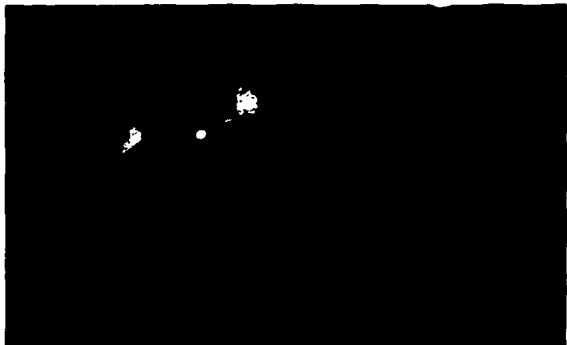
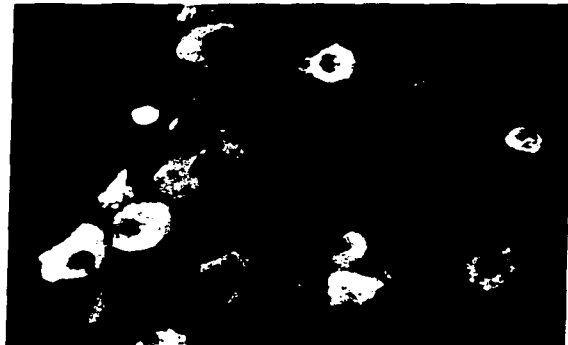


B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7

- A. Núcleo motor del NGF de un animal del grupo criptorquídico-hCG. Se observan neuronas teñidas por el *fast-blue* empleando como trazador retrógrado. Aumento 20 X.**
- B. Las mismas neuronas de la figura A en donde se observa la inmunofluorescencia para el receptor de andrógenos. Aumento 20X.**
- C. Neuronas del núcleo motor de un animal del grupo criptorquídico-control teñidas con el *fast-blue* mediante marcaje retrógrado. Aumento 20 X.**
- D. Se observan a las mismas neuronas de la imagen C con positividad al CGRP. Algunas neuronas no marcadas con el *fast-blue*, es decir, no pertenecientes al núcleo del NGF, fueron positivas al CGRP (flecha). Aumento 20 X.**
- E. Neuronas del núcleo sensitivo del ganglio espinal dorsal del NGF teñidas con *fast-blue* mediante transporte retrógrado. Aumento 20 X.**
- F. Las mismas células de la figura A en donde se observan algunas neuronas positivas a la inmunofluorescencia para CGRP. Aumento 20 X.**

**A****B****C****D****E****F**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 1. Número de células del núcleo motor doblemente marcadas con *fast-blue* y el anticuerpo contra el receptor de andrógenos

	Criptorquídico-hCG	Criptorquídico-control
	38 dpp	
<i>Fast-blue</i>	280±9.7	266±6.9
Receptor de andrógenos	238±4.8*	50±3.8
	43 dpp	
<i>Fast-blue</i>	272±5.0	281±8.6
Receptor de andrógenos	214±5.9*	68±5.7

Los valores se muestran como media ± EE para seis animales en cada edad

* Diferencia significativa comparando con el grupo criptorquídico-control en cada edad ($p < 0.05$).

TABLA 2. Número de células del núcleo motor doblemente marcadas con *fast-blue* y el anticuerpo contra el CGRP

	Criptorquídico-hCG	Criptorquídico-control
	38dpp	
<i>Fast-blue</i>	252±7.8	246±7.0
CGRP	10±2.7*	44±4.1
	43dpp	
<i>Fast-blue</i>	241±5.5	264±9.6
CGRP	9±1.7*	39±3.3

Los valores son mostrados como media ± EE por seis animales en cada edad.

* Diferencia significativa comparando con el grupo criptorquídico-control en cada edad ($p < 0.05$).

TABLA 3. Número de células del núcleo sensorial del ganglio espinal dorsal doblemente marcadas con *fast-blue* y el anticuerpo contra CGRP

	Criptorquídico-hCG	Criptorquídico-control
	38 dpp	
<i>Fast-blue</i>	1449±88.7	1523±35.4
CGRP	114±12.8	147±13.6
	43 dpp	
<i>Fast-blue</i>	1630±51.4	1599±29.4
CGRP	213±20.0	196±24.6

Los valores se muestran como media ±EE por seis animales en cada edad.

6. DISCUSIÓN

Estos resultados confirman y extienden datos previos que indican que el tratamiento con hCG aumenta los niveles de testosterona plasmática e inducen el descenso testicular de ratas con criptorquidia provocada por la administración de estradiol (Rajfer y Walsh, 1977; Spencer y cols., 1993; Viguera y cols., 1999). Se consideraba a la dihidrotestosterona (DHT), más que a la testosterona, como la responsable de inducir el descenso testicular (Hutson y Donahoe, 1986; Rajfer y Walsh, 1977). Sin embargo, recientemente se demostró que la administración de un inhibidor de la 5 α -reductasa (enzima responsable de la conversión de testosterona a DHT) a ratas neonatas no impide el descenso de los testículos (Ngyuen et al., 1991). La participación de la DHT es importante para el desarrollo de la bolsa escrotal.

Por otro lado la formación, diferenciación y los cambios morfológicos que presenta el gubernáculo son cruciales para un exitoso descenso testicular (Wensing, 1986; Hrabovszky y cols., 2002). Su papel durante la fase inguinoescrotal se ha

explicado, principalmente, por su capacidad de contracción (Bramann y cols., 1884; Radhakrishnan y cols., 1979; Rajfer, 1980; Elder y cols., 1982; Yamanaka, 1993; Terada y cols., 1994), involución (Baumans y cols., 1983; Wensing, 1986; Cain y cols., 1995; Husmann y Levy, 1995; Vander Schoot y Elder, 1996), proliferación (Hrabovszky y cols., 2002) o migración (Hutson y cols., 1997; Lam y cols., 1998) provocados por los andrógenos (Elder y cols., 1982; Han y Choi, 1995). Inclusive se ha demostrado que se puede inducir, experimentalmente criptorquidia en la rata, al administrar antiandrógenos prenatales y esta se corrige con los andrógenos (Rajfer y Walsh, 1977; Habenicht y Newmann, 1983).

Se han demostrado receptores de andrógenos (RA) en el gubernáculo, principalmente en etapas embrionarias, y escasos después del nacimiento (George y Peterson, 1988; Heyns y Pape, 1991; Husmann y McPhaul, 1991a). Por el contrario, en el presente estudio se observaron muchas células positivas al RA en el gubernáculo postnatal durante el descenso testicular inguinoescrotal inducido por la hCG en las ratas criptorquídicas. La diferencia en el momento en que se detectan los RA puede deberse a que, en el presente trabajo, aceleramos el proceso del descenso testicular con la gonadotropina. Mientras que en el presente estudio el descenso testicular inguinoescrotal tomó únicamente 10 días, en ratas normales se lleva 21 días. Por lo tanto, un gran número de células con RA fueron estimuladas durante el tratamiento con la hCG. Si esta interpretación es correcta, los presentes resultados sugieren que se requieren de más células positivas al RA para llevar al cabo el mismo proceso en un período de tiempo mas corto. En el grupo control se observaron pocas células positivas al RA a pesar de que no se detectó testosterona plasmática. Esto puede explicarse por los trabajos realizados en útero de rata en donde demuestran que la administración de estradiol induce una ligera expresión de los RA (Weihua y cols., 2002).

Husmann y Mc Phaul (1991a) mencionan a las células mesenquimatosas del gubernáculo como las portadoras de los RA, pero sus resultados fueron ambiguos debido a la poca resolución de su técnica de inmunocitoquímica. En el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presente trabajo al contrateñir con DAPI, que tiñe indistintamente el núcleo de todas las células, determinamos que las células inmunoreactivas al RA en el gubernáculo se ubicaron entre las fibras musculares, correspondiendo, principalmente, a fibroblastos; tal y como lo observamos al microscopio electrónico. Aunque no se descarta la posibilidad de que la testosterona induzca la contracción del músculo gubernacular a través de un mecanismo no genómico (Estrada y cols., 2000).

En el presente trabajo, el gubernáculo mostró abundantes fibras de músculo estriado y liso en el bulbo y ligamento, respectivamente. La presencia de este tejido sugiere su probable participación en la contracción muscular durante el descenso testicular. Sin embargo, el efecto de los andrógenos para inducir los cambios morfológico y/o funcionales en el gubernáculo, parece ser mediado a través de las células del tejido conjuntivo.

Los estudios hechos con otras especies sugieren que el descenso testicular ocurre por un proceso de regresión del tejido conjuntivo del gubernáculo (Baumans y cols., 1983; Wensing, 1986; Cain y cols., 1995; Husmann y Levy, 1995). Los resultados del presente trabajo demuestran que el descenso testicular tiene lugar sin muerte celular masiva, ya que las células apoptóticas fueron escasas durante el descenso testicular inducido por la hCG.

Se sabe que los fibroblastos secretan metaloproteasas para digerir las macromoléculas de la matriz extracelular (Could y cols., 1999; Okada y cols., 1990), por lo que es posible especular que el material amorfo de la matriz intercelular que observamos con el microscopio electrónico corresponda a colágena y mucopolisacáridos en proceso de digestión por enzimas secretadas por fibroblastos RA positivos. Esta posibilidad es apoyada por otros trabajos que demuestran una alta actividad de la fosfatasa ácida en el gubernáculo durante el descenso testicular (Baumans y cols., 1981). Husmann y Levy (1995) proponen a los andrógenos como los responsables de alterar la viscoelasticidad del

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

gubernáculo, reduciendo su turgencia y jalando al testículo hacia el escroto. En ausencia de andrógenos, el gubernáculo se hace rígido, evitando el descenso. Finalmente, el hecho de encontrar a los RA en el núcleo de las células del tejido conjuntivo y no en las fibras musculares nos permite proponer que la acción de la testosterona es mediada por los fibroblastos RA positivos para cambiar las condiciones de la matriz intercelular favoreciendo la contracción del músculo gubernacular.

Aunque se han reportado gran cantidad de células mesenquimatosas en el gubernáculo de la rata durante la gestación (Fujikake y cols., 1989), nosotros solo ocasionalmente observamos este tipo celular después del nacimiento. Este hallazgo sugiere que las células mesenquimatosas presentes en el gubernáculo fetal se diferencian a fibroblastos, músculo liso o estriado al finalizar la gestación o después del nacimiento. Hrabovszky y cols., (2002) proponen que durante el descenso testicular inguinoescrotal el mesenquima del bulbo se diferencia en células de músculo estriado promoviendo la elongación del saco cremastérico y la disminución en la cantidad del tejido mesenquimatoso causa la involución del gubernáculo.

Por otro lado Beasley y Hutson (1987) al estudiar ratas recién nacidas y seccionarles el nervio genitofemoral (NGF), observaron que el descenso testicular no se llevó a cabo, por lo que propusieron que los andrógenos podían estar actuando vía nerviosa. El NGF inerva al músculo cremaster y al gubernáculo en vida fetal y perinatal. Las neuronas del NGF se localizan a nivel espinal de la L1 a la L 2. El número y tamaño de las células que conforman a estos núcleos es dimórfica (Kojima y Sano, 1984; Nagy y Senba, 1985; Han y Choi, 1995). En ratas macho el número de motoneuronas se altera por la administración de antiandrógenos (Han y Choi, 1995).

Aunque Beasley y Hutson (1988) sugieren que las motoneuronas del NGF pueden responder directamente a la testosterona e inducir el descenso testicular,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

por la liberación de algún neuropéptido, la identidad y la localización de las células que presentan RA en este núcleo es aun controvertido. Nuestros resultados demostraron que la cantidad total de células que conforman al núcleo motor del NGF en los dos grupos estudiados no presenta diferencia significativa; por lo que los andrógenos no influyen en el tamaño de este núcleo. Barthold y cols. (1994) demostraron que los andrógenos no tienen efecto sobre el tamaño del núcleo del NGF ya que al estudiar ratas macho insensibles a los andrógenos y compararlas con ratas sanas no mostraron diferencias en el tamaño. También Spencer y cols., (1996) no encontraron diferencias significativas en el número de neuronas que conforman a este mismo núcleo en animales sanos y tratados prenatalmente con el antiandrógeno flutamida.

La cantidad de células inmunoreactivas al RA en el núcleo motor del NGF durante el descenso testicular inguinoescrotal fue significativamente mayor en el grupo criptorquídicos-hCG comparado con su control y esto probablemente contribuyó en el descenso de los testículos en los animales tratados con la gonadotropina. Se ha reportado que el número de motoneuronas que expresan los RA en el núcleo del NGF incrementa desde el día 15 de la gestación y hasta el nacimiento (Cain y cols., 1994). Además otro grupo de investigadores al estudiar el mismo núcleo, concluyeron que la cantidad de neuronas positivas a los RA se mantiene desde el nacimiento hasta el día 30 postnatal (Won y cols., 1998). Desafortunadamente ninguno de estos autores trazó la vía del NGF y no tenemos la certeza de que los núcleos evaluados correspondan al del núcleo del NGF.

Los presentes resultados muestran una correlación entre altos niveles de testosterona y el incremento en número de motoneuronas del NGF que expresan RA en los animales criptorquídicos-hCG durante el descenso testicular. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el núcleo motor del NGF juega un papel importante en el descenso testicular.

Por otro lado existe bastante evidencia que apoya el papel del CGRP para

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inducir el descenso testicular, ya que se sabe que este péptido aumenta la contracción del músculo estriado (Tukami y cols., 1986) y gubernacular (Park y Hutson, 1991; Momose y cols., 1992; Terada y cols., 1994; Shono y cols., 1995; Spencer y cols., 1996). También se han demostrado los receptores para este péptido en el gubernáculo de rata neonata (Yamanaka y cols., 1991; Yamanaka y cols., 1993; Terada y cols., 1994; Lam y cols., 1998). Pero la cantidad de motoneuronas CGRP positivas no sobrepasa un 2% del total de neuronas del núcleo motor en ratas durante el descenso inguinoescrotal (Newton y cols., 1990; Schwindt y cols., 1999). Por tal motivo Schwindt y cols., (1999) estudiaron el núcleo sensitivo del ganglio espinal dorsal (GED) del NGF y encontraron que este presenta una gran cantidad de células positivas al CGRP. Posteriormente Hrabovszky y cols., (2001) ampliaron el estudio y determinaron un dimorfismo sexual con respecto al número de neuronas CGRP positivas. También encontraron que al administrar un antiandrógeno a ratas macho se reduce el número de neuronas inmunoreactivas al CGRP en el núcleo sensitivo del GED a valores similares a las hembras (Hrabovszky y cols., 2000).

En este estudio confirmamos que las neuronas del núcleo motor que expresan el CGRP son escasas como había sido reportado por otros autores (Newton y cols., 1990; Barthold y cols., 1994; Schwindt y cols., 1999). Las neuronas del NGF teñidas con el anticuerpo contra el CGRP fueron encontradas principalmente en el núcleo sensitivo del GED, aunque en este núcleo no encontramos células RA positivas.

Es interesante mencionar que, las ratas tratadas con hCG tuvieron un número significativamente bajo de motoneuronas CGRP positivas comparadas con los controles no tratados. Contrario a esto Goh y cols. (1994) han propuesto que la testosterona estimula la producción de CGRP en motoneuronas del NGF. Este grupo de investigadores al administrar flutamida a ratas gestantes y examinarlas a los 7 dpp, encontraron una disminución significativa en el número de neuronas motoras positivas al CGRP. Los resultados de Goh y cols. también

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

se contradicen con el alto número de células CGRP positivas encontradas en núcleos motores sexualmente dimórficos de ratas castradas o con administración de flutamida (Popper y Micevych, 1989; Shono y cols., 1995). Una explicación para estos resultados, aparentemente contradictorios, pudiera ser que existe una diferente regulación de la testosterona en las motoneuronas dependiente de la edad.

Por otra parte, nosotros no encontramos una disminución en el número de neuronas del núcleo sensitivo positivas al CGRP en los animales controles comparados con los tratados con la hCG. Aunque se tienen reportes de una disminución en el número de células con CGRP en el núcleo sensitivo de animales con administración de antiandrógenos (Hrabovsky y cols., 2000). Esta diferencia pudo deberse a que los antiandrógenos empleados por Hrabovsky y cols. fueron administrados en etapas prenatales cuando ocurre el proceso de masculinización de núcleos dimórficos. En cambio el modelo de criptorquidia por administración postnatal de estradiol de nuestro estudio, permitió la masculinización prenatal de los núcleos dimórficos, incluyendo probablemente los del NGF.

Es probable que el CGRP liberado por el NGF regule sus propios receptores en el gubernáculo (Yamanaka y cols., 1993). Esta hipótesis se apoya en los estudios hechos en ratas con criptorquidia congénita, las cuales se caracterizan por un reducido número de receptores a CGRP y poca respuesta al estímulo con CGRP en el gubernáculo (Goh y cols., 1993; Terada y cols., 1995) y al seccionarles el NGF se incrementan los receptores a CGRP en el gubernáculo. (Terada y cols., 1995).

Considerando que el núcleo sensitivo no posee los RA, pero si el núcleo motor, sugerimos que las motoneuronas regulan la secreción del CGRP por parte del núcleo sensitivo y/o los receptores para el CGRP en el propio gubernáculo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por lo tanto se propone que los niveles elevados de testosterona inducen el descenso testicular por actuar tanto directa como indirectamente sobre el gubernáculo:

Directa: la presencia de fibroblastos inmunoreactivos al RA en el gubernáculo sugiere su participación en la involución del tejido conjuntivo y la contracción del músculo gubernacular.

Indirecta: la testosterona actúa sobre las motoneuronas del NGF. Estas células a su vez, posiblemente, modulan la liberación de CGRP de las neuronas del núcleo sensitivo o regulan el número de receptores a CGRP en el gubernáculo.

7. CONCLUSIÓN

Los niveles elevados de testosterona inducen el descenso testicular por actuar tanto directamente a través de los fibroblastos inmunoreactivos al RA en el gubernáculo como indirectamente mediante las motoneuronas positivas al RA en el núcleo motor del NGF. La positividad al CGRP en el núcleo sensitivo confirma su participación durante el descenso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. REFERENCIAS

- Abe T., Hutson J.M. (1994) Gonadal migration in ambiguous genitalia. **Pediatr Surg Int** 9:547.
- Abney T.O. (1999) The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. **Steroids** 64:610.
- Abney T.O., Keel B.A. (eds) 1989 The criptorchid testis. CRC Press, Boca Raton FL pp1-176.
- Anderson J.C., Fauler K.G., Mpor J.E. (1979). Prune Belly syndrome **Med J Aust** 1:314.
- Arredondo G., Arreola S.M.A., Lierse W. (1991) Morphogenesis of the gubernaculum testis in Sprague-Dawley rat. Preliminary Report . **Arch Invest Med** 22:151.
- Atanassova N., McKinnell C., Walker M., Turner K.J., Fisher J.S., Morley M., Millar M:R., Roome N.P., Sharpe R.M. (1999) Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. **Endocrinology** 140:5364.
- Attah A.A., Hutson J.M. (1993) The role of intra-abdominal pressure in cryptorchidism. **J Urol** 150:994-996.
- Baker M.L., Metcalfe S.A., Hutson J.M. (1990). Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years at determined by enzyme immunoassay. **J Clin Endocrinol Metab** 70:11-18.
- Baker M.L., Hutson J.M. (1993). Serum levels of Müllerian inhibiting substance in

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

boys throughout puberty and in the first 2 years of life. **J Clin Endocrinol Metab** 76:245-247.

- Barthold J.S., Mahler H.R., Newton B.W. (1994) Lack of feminization of the cremaster nucleus in cryptorchid androgen insensitive rats. **J Urol** part 2, 152:2280.

- Bartke A., Williams K.I.H., Balterio S. (1977) Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro. **Biol. Reprod** 17:645.

- Bartlett J.E., Lee S.M.Y., Mishina Y., Behringer R.R., Yang N., Wolf J. (2002) Gubernacular development in Müllerin inhibiting substance receptor-deficient mice **BJU international** 89:113.

- Bashir M.S., Wells M. (1995) Editorial. Müllerian inhibiting substance. **J Pathol** 176:109.

- Baumans V., Dijkstra G., Wensing C.J.G. (1981) Testicular descent in the dog. **Zbl Anat Histol Embryol** 10: 97.

- Baumans V., Dijkstra G., Wensing C.J. (1983) The role of a non-androgenic testicular factor in the process of testicular descent in the dog. **Int J Androl** 6:541.

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

- Beasley S.W., Hutson J.M. (1988) The role of the gubernaculum in testicular descent. **J Urol** 140:1191.

- Bedford J.M. (1978) Anatomical evidence for the epididymis as the prime mover in the evolution of the scrotum. **Am J Anat** 152:438.

- Bentvelsen F.M., George F.W. (1993) The fetal rat gubernaculum contains higher levels of androgen receptor than does the postnatal gubernaculum. **J Urol** 150:

1564.

- Bergh A., Ason-berg A., Damber J.E., Hammar M., Selstam G., (1984a). Steroid biosynthesis and Leydig cell morphology in adult unilaterally cryptorchid rats **Acta Endocrinol (Copenh)** 107:556.
- Bergh A., Damber J.E., Ritzen M. (1984b) Early signs of Sertoli and Leydig cell dysfunction in the abdominal testes of immature unilaterally cryptorchid rats. **Int J Androl** 7:398.
- Bergh A., Helander H.F., Wahlquist L. (1978) Studies on factors governing testicular descent in the rat: particularly the role of gubernaculum testis. **Int J Androl** 1:342.
- Bramann F., Beitrag zur Lehre von dem. (1884) Descensus testiculorum und dem gubernaculum Hunteri des Menschen. **Arch Anat Entwicklungsgesch** 310.
- Breedlove S.M., Arnold A.P. (1983) Hormonal control of a developing neuromuscular system. II Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. **J Neurosci** 3:424.
- Brinkmann A.O., Leemborg F.G., Roodnat E.M., de Jong F.H., Van der Molen H.J. (1980) A specific action of estradiol on enzymes involved in testicular steroidogenesis. **Biol Reprod** 23:801.
- Cain P.M., Kramer A.S., Tindall J.D., Husmann A.D. (1994) Expression of androgen receptor protein within the lumbar spinal cord during ontologic development and following antiandrogen induced cryptorchidism. **J Urol** 152:766.
- Cain P.M., Kramer A.S., Tindall J.D., Husmann A.D. (1995) Flutamide-induced cryptorchidism in the rat is associated with altered gubernacular morphology.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Urology 46: 553.

- Campbell H.E. (1959) The incidence of malignant growth of the undescended testicle: a reply and reevaluation. **J Urol** 81:664.
- Cook W.A., Stephens F.D. (1988) Pathoembryology of the urinary. In: King LR (ed) **Urological Surgery in neonates and infants** WB Sauder, Philadelphia, pp 1-22.
- Clarnette D.T., Hutson M.J., Beasley W.S. (1996) Factors affecting the development of the processus vaginalis in the rat. **J Urol** 156:1463.
- Crosgrove M.D., Benton B., Henderson B.E. (1977) Male genitourinary abnormalities and maternal diethylstilbestrol. **J Urol** 117:220.
- Damber J.E., Bergh A. (1980) Decreased testicular response to acute LH stimulation. and increased intratesticular concentrations of oestradiol-17 β in the abdominal testes in cryptorchid rats. **Acta Endocrinol** 95:416.
- Depue R.H., Pike M.C., Henderson B.E. (1983) Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. **J Natl Cancer Inst** 71:1151.
- Elder J.S, Isaacs J.T, Walsh P.C. (1982) Androgenic sensitivity of the gubernaculum testis: evidence for hormonal/mechanical interactions in testicular descent. **J Urol** 127:170.
- Elder J.S. (1988) The undescended testis: hormonal and surgical management. **Surg Clin North Am** 68:983.
- Estrada M., Liberona J.L., Miranda M., Jaimovich E. (2000) Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 279:E132.
- Fallat M.E., Williams M.P.L., Farmer P.J., Hutson J.M. (1992) Histologic

evaluation of inguinoscrotal migration of the gubernaculum in rodents during testicular descent and its relationship to the genitofemoral nerve. **Pediatr Surg Int** 7:265.

- Farrer J.H., Walker A.H., Rajfer J. (1985) Management of the post pubertal cryptorchid testis: A statistical review **J Urol** 134:1071.

- Fentener van Vlissinger J.M, van Zoelen E.J.J., Ursem P.J.F., Wesing C.J.G. (1988) *In vitro* model of the first phase of testicular decent identification of a low-molecular weight factor from fetal testis involved in proliferation of gubernaculum testis cells and distinct from specified polypeptide growth factors and fetal gonadal hormones. **Endocrinology** 123:2868.

- Fisher J.S., Turner K.J., Brown D., Sharpe R.M. (1999) Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. **Environ Health Perspect** 107:397.

- Frey H.L., Peng S., Rafier J. (1983) Synergy of abdominal pressure an androgens in testicular descent. **Biol Reprod** 29:1233.

- Frey H.L., Rafier J. (1984) Role of gubernaculum and intraabdominal pressure in the process of testicular descent. **J Urol** 131:574.

- Fujikake N., Togashi H., Yamamoto M., Arishima K., Veda Y., Eguchi Y. (1989) Relationship between the development of the rat fetos: macroscopic and light and electron microscopic observation **Jpn J Vet Sci** 51:416.

- Gendrel D., Roger M., Job J.C. (1980) Plasma gonadotrophin and testosterone values in infants with cryptorchidism. **J Pediatr** 97, 217.

- George F.W., Peterson K.G. (1988) Partial characterization of the androgen receptor of the newborn rat gubernaculum. **Biol. Reprod** 39: 536.

- Gier H.M., Marion G.B. (1969) Development of mammalian testes and genital ducts. **Biol Reprod** 1:1-23.
- Goh D.W., Middlesworth W., Farmer P.J., Hutson J.M. (1994) Prenatal androgen blockade with flutamide inhibits masculinization of the genitofemoral nerve and testicular descent. **J Pediatr Surg** 29:836.
- Goh D.W., Momose Y., Middlesworth W. (1993) The relationship a many calcitonin gene-related peptide androgens and gubernacular development in 3 animal models of cryptorchidism. **J Urol** 150:574.
- Gould L.J., Yager D.R., McGeehan C.M., Diegelmann R.F. (1999) Method to analyze callagenase and gelatinase activity by fibroblasts in culture. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** 35:75.
- Grocock C.A., Charlton H.M., Pike M.C. (1988) Role of the fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogen during pregnancy in mice. **J Reprod Fertil** 83:295.
- Guerrier D., Tran D., Vanderwinden J.M., Hideux S., van Oustrive L., Legeai L., Bouchard M., Van Vliet G., De laet M.H., Picard J.Y., Kahn A., Josso N. (1989) The persistent Müllerian duct syndrome in molecular approach. **J Clin Endocrinol Metab** 68:46.
- Habenicht U.F., Newmann F. (1983) Hormonal regulation of testicular descent. **Adv Anat Embryol Cell Biol** 81: 1.
- Hadziselimovic F. (1983) Embryology of testicular descent and mal-descent. In: Hadziselimovic F (ed) **Cryptorchidism: Management and Implications**. Springer-Verlag, Berlin, PP 11-34.
- Hadziselimovic F., Duckett J.W., Snyder H.M., Schnauffer L., Huff D. (1987) Om

- pha locele, cryptorchidism and brain malformations. **J Pediatr Surg. Int** 4:40.
- Hadziselimovic F., Geneto R., Emmons L.R. (2000) Elevated placental estradiol: a possible etiological factor of human cryptorchidism. **J Urol** 164:1694.
 - Hadziselimovic F., Herzog B., Kruslin E. (1979) Morphological background of oestrogen-induced cryptorchidism in the mouse. **Pediatr Adolesc Endocrinol** 6:79.
 - Hadziselimovic F., Thommen L., Girard J., Herzog B. (1986) The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes **J Urol** 136:274-276.
 - Han S.W., Choi S.K. (1995) Effects of neonatal androgen on the genitofemoral mononucleus Korean **J Urol** 36:471.
 - Happ J., Weber T., Callense W. (1978) Treatment of cryptorchidism with a potent analog of gonadotropin-releasing hormone. **Fertil Steril** 29:552-556.
 - Hatano O., Takayama K., Imai T., Eaterman MR., Takakusu A., Omura T., Morohashi K. (1994) Sex-dependent expression of a transcription factor Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. **Development** 120: 2787.
 - Heyns C.F., Hutson J.M (1995) Historical review of theories in testicular descent. **J Urol** 153:754-767
 - Heyns C.F., Human H.J., Werely C.J., Deklerk D.P. (1990) The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus. **J Urol** 143: 612.
 - Heyns, C.F., Pape V.C. (1991) Presence of a low capacity androgen receptor in the gubernaculum of the pig fetus. **J Urol** 145: 161.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Hinman F., Jr. (1993) Opening remarks: Cryptorchidism. **Eur J Pediatr.** 152 (Suppl 2): 53.
- Hosie S., Wessel L., Waag K.L. (1999) Could testicular descent in human be promoted by direct androgen stimulation of the gubernaculum testis? **Eur J Pediatr Surg** 9:37.
- Hovatta O., Huhtaniemi I., Wahlstrom T. (1986) Testicular gonadotrophins and their receptors in human cryptorchidism as revealed by immunohistochemistry and radioreceptor assay **Acta Endocrinol** (Copenh.), 111:128.
- Hrabovszky Z., Di Pilla N., Yap T., Farmer J.P., Hutson M.J., Carlin B.J. (2002) Role of the gubernacular bulb in cremaster muscle development of the rat. **Anat. Rec.** 267:159.
- Hrabovszky Z., Farmer J.P., Hutson M.J. (2000). Does the sensory nucleus of the genitofemoral nerve have a role in testicular descen? **J Pediatr Surg** 35:96.
- Hrabovszky Z., Farmer J.P., Hutson M.J. (2001) Undescended testis is accompanied by calcitonin gene related peptide accumulation with in the sensory nucleus of the genitofemoral nerve in trans-scrotal rats. **J Urol** 165:1015.
- Hunter J. A description of the situation of the testis in the foetus with its descent into the scrotum. In Hunter J (ed) *Observations certain parts of the animal occonany.* 13 castle St. London, PP, 1-26 1786.
- Husmann D.A., McPhaul M.J. (1991a) Localization of the androgen receptor in the developing rat gubernaculum. **Endocrinology** 128: 383.
- Husmann D.A. McPhaul M.J. (1991b) Time-specific androgen blockade with flutamide inhibits testicular descent in the rat. **Endocrinology** 129:1409.
- Husmann D.A., Levy J.B. (1995) Current concepts in the pathophysiology of

testicular descent. **Urology** 46:267.

- Hutson J.M. (1986) Testicular feminization: a model for testicular descent in mice and men. **J Pediatr Surg** 21:195.
- Hutson J.M., Beasley S.W. (1987) Annotation. The mechanisms of testicular descent. **Aust Paediatr J** 23:215.
- Hutson J.M., Beasley S.W., Bryan A.D. (1988) Cryptorchidism in spina bifida and spinal cord transection: a clue to the mechanism of transinguinal descent of the testis. **J Pediatr Surg** 23:275.
- Hutson J.M., Davidson P.M., Reece L.A., Baker M.L., Zhou B. (1994) Failure of gubernacular development in the persistent Müllerian duct Syndrome allows herniation of the testes. **Pediatr Surg Int** 9:544.
- Hutson J.M., Donahoe P.K. (1986) The hormonal control of testicular descent. **Endocr Rev** 7:270.
- Hutson J.M., Terada M., Zhou B., Williams M.P.L. (1995) Normal testicular descent and the aetiology of cryptorchidism. **Adv Anat Embryol Cell Biol** 132:1.
- Hutson J.M., Watts L.M., Montalto J., Greco S. (1990) Both gonadotropin and testosterone fail to reverse estrogen-induced cryptorchidism in fetal mice: evidence for non-androgenic control of testicular descent in the fetus. **Pediatr Surg Int** 5:13.
- Hutson M.J.; Hasthorpe S.; Heyns C. (1997) Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism **Endocr Rev** 18:259.
- Job J.C., Gendrel D. (1982) Endocrine aspects of cryptorchidism **Urol Clin North Am** 9:353.
- Josso N, Cate RL. Picard J-Y, Vigier B, Di Clemente N, Wilson C, Imbreaud S,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L, Lageai L, Carre-Eusebe D (1993) Anti Müllerian hormone: the host factor. **Recent Prog Horm Res.** 49:1-59.
- Josso N., Tran D. Biochemical aspects of prenatal testicular development: relationship to testicular descent. In cryptorchidism diagnosis and treatment. Edited by J.C. Job New York; S. Karger pp 37-46 1979.
 - Kalla N.R., Nisula B.C., Minard R., Loriaux D.L. (1980) The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis. **Endocrinology** 106:35.
 - Karnovsky M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell Biol** 27,137^a 1965.
 - Kropp KA, Voeller KKA (1981) Cryptorchidism in meningomye locale. **J Pediatr** 99:110.
 - Lam L.K.S., Clarnette D.T., Hutson M.J. (1998) Does the gubernaculum migrate during inguinoscrotal testicular descent in the rat? **Anat Rec** 250:159-163.
 - Larkins S.L., Williams M.P.L., Hutson J.M. (1991) Localization of calcitonin gene-related peptide within the spinal nucleus of the genitofemoral nerve. **Pediatr Surg Int** 6:176.
 - Lee M.M., Donahoe P.K. (1993) Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. **Endocr Rev** 14.152.
 - Lee M.Y.S., Hutson M.J.(1999) Effect of androgens on the cranial suspensory ligament and ovarian position **Anat. Rec.** 255:306.
 - Lein M., Tahlenkamp D., Schönberger B., Prollius S., Loenings. (1996) The pharmacological effect of the gonadotrophin-releasing hormone on experimental cryptorchidism in rats. **Scand J Urol Nephrol** 30:185.
 - Lewis L.G. (1948) Cryptorchidism. **J Urol** 60:345.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Luthra M, Hutson J JM, Stephens FD. (1989) Effects of external inguinoscrotal compression in descent of the testis in rats. **Pediatr Surg Int** 4:403.
- Luo X., Ikeda Y., Parker K.L. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell** 77, 481.
- Majdic G., Sharpe R.M., Saunders P.T. (1997) Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the fetal rat testis. **Mol Cell Endocrinol** 127:91.
- Manton P.N., Sutcliffe V.E., Xhou Z.C., Collins S.M., Gardner J.D., Jensen R.T. (1988) Characterization of receptors of calcitonin gene-related peptide on gastric smooth muscle cells. **Am J physiol** 254:G789.
- Matsumoto A., Prins SG. (1998) Age-dependent changes in androgen receptor immunoreactivity in neurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus of male rats. **Neuroscience Letters** 243:29-32.
- McMahon D.R., Kramer S.A., Tindall D.J., Husmann D.A.(1995) Antiandrogen induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididimal malformations. **J Urol** 154:553.
- Melner M.H., Abney T.O. (1980) The direct effect of β -estradiol on LH-stimulated testosterone production in hypophysectomized rats. **J. Steroid Biochem.** 13:203.
- Moerman P, Fryns JP, Goddeeris P, Lauwryns JM (1984) pathogenesis of the prune belly syndrome: a functional urethral obstruction caused by prostatic hypoplasia. **Pediatrics** 73:470.
- Momose Y., Griffiths A.L., Hutson J.M. (1992) Testicular descent III. The neonatal mouse gubernaculum shows rhythmic contraction in organ culture in response to calcitonin gene-related peptide. **Endocrinology** 131: 2881.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Muroño E:P., Payne A:H. (1976). Distinct testicular 17-ketosteroids reductases, one in interstitial tissue and one in seminiferous tubules differential modulation by testosterone and metabolites of testosterone. **Biochem Biophys Acta** 450:89.
- Nagy J.I., Senba E. (1985) Neural relation of cremaster motoneurons, spinal cord systems and the genitofemoral nerve in the rat. **Brain Res Bull** 15:609.
- Nef S., Parada L.F. (1999) Cryptorchidism in mice mutant for *Ins13*. **Nat Genet** 22:295.
- New H.V., Mudge A.W. (1986) Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. **Nature** 323:609.
- Newton B.W., Unger J., Hamill R.W. (1990) Calcitonin gene-related peptide and somatostatin immunoreactivities in the rat lumbar spinal cord sexually dimorphic aspects. **Neuroscience** 37: 471.
- Ngyuen M.M., Lemmi C.A.E., Rajfer J. (1991) Effect of 5-alpha-reductase inhibitor, 4-MAPC on testicular descent in male rat. **J Urol** 145: 1096.
- Nunn I.N., Stephens F.D. (1961) The triad syndrome: a composite anomaly of the abdominal wall, urinary system and testes. **J. Urol** 86:782.
- Okada Y., Morodomi T, Enghild J.J., Suzuki K, Yasui A., Nakanishi I., Salvensen G., Nagase H. (1990) Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. **Eur J Biochem** 194:721.
- Oprins A.C., Frentener van Vlissingen J.M., Blankenstein MA. (1988) Testicular descent: androgen receptors in cultured porcine gubernaculum cells. **J Steroid Biochem** 31: 387.
- Pagon RA, Smith DW, Shepherd TH. (1979) Urethral obstruction and the prune

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

belly. **J Pediatr** 94:900.

- Park W.H., Hutson J.M. (1991) The gubernaculum shown rhythmic contractility and active movement during testicular descent. **J Pediatr Surg** 26: 615.
- Perez M.C., Ferreraas E.M.C., Garcia I.M.J., Bravo M.A.M., Espinoza A.J., Escudero D. A.(1997) Effects of in utero exposure to nonsteroidal estrogens on mose testis. **Can J Vet Res** 61:94.
- Perez M.C., Garcia I.M.J., Ferreras E.M.C. (1996) Effects of in utero exposure exposure to zeranol or diethylstilbestrol on morphological development on the fetal testis in mice. **J Comp Path** 114:407.
- Popper P., Micevych P.E. (1989) Localization of calcitonin gene-related peptide and its receptor in a striated muscle. **Brain Res** 496:180.
- Popper P., Ulibarri C., Micevych P.E. (1992) The role of target muscles in the expression of calcitonin gene-related peptide in RNA in the spinal nucleus of the bulbocavernosus. **Mol Brain Res** 12:43.
- Quinlan D.M., Gearhart J.P., Jeffs R.D. (1988) Abdominal wall defects and cryptorchidism: an animal model. **J Urol** 140:1141.
- Radhakrishnan J., Donahoe P.K. (1981) The gubernaculum and testicular descent. In: Fonkalsrud EW, Menguel W (eds) *The Undescent Testis*. Year Book Medical Publishers, Chicago, PP 30-41.
- Radhakrishnan J., Morikawa Y., Donahoe P.K., Hendre W.H. (1979) Observations on the gubernaculum during descent of the testis. **J. Urol.** 16:365.
- Rajfer J., Walsh P.C. (1977) Hormonal regulation of testicular descent: experimental and clinical observations. **J. Urol** 118:985.
- Rajfer J. (1980) Morphological study of testicular descent in the rabbit **Invest Urol**

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

18: 293.

- Rosenfeld M.G., Mermod J.J., Amara S.G., Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W., Evans M. (1983) Production of a novel neuropeptide encoded in the calcitonin gene via tissue-specific processing. **Nature** 304:129.
- Saez J.M., Haour F., Loras B., Sanchez P., Cathiard A.M.(1978) Oestrogen induced Leydig cell refractoriness to gonadotrophin stimulation. **Acta Endocrinol.** 89:379.
- Sairam M.R., Berman M.I. (1979) Direct inhibitory effect of estrogens on rat Leydig cells in vitro. **Steroids**;33:233.
- Samuels L.T., Short J.G., Huseby R.A. (1964) The effects of diethylstilbrestol on testicular 17-desmolase activities in Balb/c mice.. **Acta Endocrinol** 45:487.
- Santicoli P., Maggi C.A., Geppetti P., Del Bianco E., Theodorsson E. (1998) Release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity (CGRP-LI) from organs of the genitourinary tract in rats. **Neurosci Lett** 92:197.
- Scott J.E.S. (1987) The Hutson hipótesis: a clinical study. **Br J Urol** 60:74.
- Sharpe R.M., Atanassova N., McKinnell C., Parte P., Turner K.J., Sisher J.S., Kerr J.B., Groome N.P., Macpherson S., Millar M.R., Saunders P.T.K. (1998) Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbretol: a possible role of estrogens in Sertoli cell development. **Biol Reprod** 59:1084.
- Shono T., Anderson R.S., Goh W.D., Hutson J.M. (1994) The effect of flutamide on testicular descent in rats examined by scanning electron microscopy. **J Pediatr Surg** 29: 839.
- Shono T., Goh D.W., Momose Y. (1995) Physiological effects in vitro of calcitonin

gene-related peptide (CGRP) on gubernacular contractility with or without denervation. **J Pediatr Surg**, 30: 591.

- Sigrist S., Franco-Cereceda A., Muff R., Henke H., Lundberg J.M., Fischer J.A. (1986) Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide. **Endocrinology** 119:381.

- Spencer B.J., Mhaler H., Sziszak T., Newton W.B. (1996) Lack of feminization on the cremaster nucleus by prenatal flutamide administration in the rat and pig. **J Urol** 156: 767.

- Spencer J.R., Vaughan E.D., Imperato-McGinley J. (1993) Studies of the hormonal control of postnatal testicular descent in the rat. **J Urol** 149:618.

- Spenser J.R., Torrado T., Sanchez R.S., Vaughan Jr. E.D., Imperato-Mcginley J. (1991) Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. **Endocrinology** 129:741.

- Schwindt B., Farmer J.P., Watts M.L. Hrabovszky Z., Hutson M.J. (1999) Localization of calcitonin gene-related peptide within the genitofemoral nerve in immature rats. **J Pediatr Surg** 34:986.

- Tache Y, Holzer P, Rosenfeld MG (eds) (1992) Calcitonin gene-related peptide. The first decade of a novel pleiotropic neuropeptide. **NY Acad Sci** 657:1.

- Terada M., Goh W.D., Farmer J.P., Hutson M.J. (1994) Calcitonin gene-related peptide receptors in the gubernaculum of normal rat and 2 models of cryptorchidism. **J Urol** 152: 759.

- Terada M., Hutson M.J., Watts L.M. (1995) Characterization of the gubernacular contractile response of calcitonin gene-related peptide receptors in the mouse. **J Pediatr Surg** 30: 730.

- Toppari J; Larsen CJ; Christiansen P; Giwercman A; Grandjean P; Guillette JL; Jégou B; Jensen KT; Jouannet P; Keiding N; Leffers H; McLachlan AJ; Meyer O; Müller J; De Meys RE; Scheike T; Sharpe R; Sumpter J; Skakkebaek EN: (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens **Environ Health Perspect** 104:Suppl 4 741.
- Tukami K., Hashimoto K., Uchida T.M., Yoshida H. (1986) Effect of calcitonin gene-related peptide on the cyclic AMP level of isolated mouse diaphragm. **Jap J Pharm** 42: 345.
- Van der Schoot P., Elger W. (1996) Development, structure and function of the cranial suspensory ligament of the mammalian gonads in a Cross-Speciesperspective: their possible role in affecting disturbed testicular descent. **Hum Reprod Update** 2: 339.
- Viguera V.R.M., Reyes T.G., Cuevas O.J., Rojas C.J.C., Merchant L.H. (1999) The histological effect of the human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone-releasing hormone on experimental cryptorchidism in rats. **Proc West Pharmacol Soc** 42:71.
- Visser J.A., McLuskey A., Verhoef-Post M., Kramer P., Grootegoed J.A., Themmen A.P. (1998) Effect of prenatal exposure to diethylstilbestrol on Müllerian duct development in fetal male mice. **Endocrinology** 139:4244.
- Weihua Z., Ekman J., Almkvist A, Saji S., Wang L., Warner M., Gustafsson J.A. (2002) Involvement of androgen receptor in 17beta-estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. **Biol Reprod** 67:616.
- Weil C., Ueber den (1885) Descensus testicularum, nebst Bemerkungen ueber die Entwicklung der Scheidenhaute and des akrotums. **Z Heilk** 5:225.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Wensing C.J.G. (1973) Testicular descent in some domestic mammals. II The nature of the gubernacular change during the process of testicular descent in the pig. **Proc K Ned Akad Wet Ser C Biol Med Sci** 76:190.
- Wensing C.J.G. (1986) Testicular descents in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. **Anat Rec** 214:154.
- Whitaker R.H. (1988) Neoplasia in cryptorchid men. **Sem Urol** 6:107.
- Williams M.P.L., Hutson J.M. (1991) The phylogeny of testicular descent. **Pediatr Surg Int** 6:162.
- Won H.S., Ho R.K., Taik L.W., Yul M.S., Ki Ch.H., Kang Ch.S. (1998) Immunoreactivity of androgen receptor protein in sexually dimorphic spinal Motonucleus in neonatal male. **Yosie Medical Journal** 39:13.
- Yamanaka J., Baker M.L., Metcalfe S.A., Hutson J.M. (1991) Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys with cryptorchidism. **J Pediatr Surg** 26:621.
- Yamanaka J, Metcalfe S.A., Hutson J.M. (1993) Testicular descent II. Ontogeny and response to denervation of calcitonin gene-related peptide receptors in neonatal rat gubernaculum. **Endocrinology** 132:280.
- Zetterqvist H. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. *Ph.D. Thesis*, Karolinska Institute, Stockholm 1956.
- Zimmermann S., Schwarzler A., Buth S., Engel W., Adham I.M. (1998) Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor 1. **Mol Endocrinol** 12:706.
- Zimmermann S., Steding G., Emmen J.M.N., Brinkmann A.O., Nayernia K., Holstein A.F. (1999) Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. **Mol Endocrinol** 13: 681.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS NO SALE
DEBILITADA

- Zorghiotti A.A. (ed) 1991 Temperature and environmental effects on the testis.
Plenum Press, New York, pp 1-335.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ORIGINAL ARTICLE

Androgen Receptor and Calcitonin Gene-Related Peptide in Neurons
of the Genitofemoral Nerve During Testicular Descent Induced
with Human Chorionic Gonadotropin

Rosa María Viguera,^{a,b} Norma Moreno-Mendoza,^a Gabriela Reyes^b and Horacio Merchant-Larios^a

^aDepartamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM),
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

^bSubdirección de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría (INP), Secretaría de Salud (SSA), Mexico City, Mexico

Received for publication October 15, 2002; accepted February 21, 2003 (02/199).

Background. Low levels of circulating testosterone during testis descent cause cryptorchidism in humans and rats. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) induces testis descent by stimulating production of testosterone (T). Neurons of genitofemoral nerve (GFN), which innervate testicular gubernaculum, may play a role in testis descent.

Methods. In the current study, putative correlations were made between T and GFN motor and sensory neuron activity during inguinoscrotal testis descent. Cryptorchidism was provoked in prepubertal rats with estradiol. Rats with testicular descent induced with hCG and cryptorchid controls were used. Cells of spinal cord and dorsal root ganglia were labeled by retrograde staining with fast-blue. Expression of androgen receptor (AR) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) were detected with indirect immunofluorescence.

Results. Neurons labeled with fast-blue were found in the center of motor horn and dorsal root ganglia at levels L1 and L2. While number of motor neurons expressing AR was significantly higher in the group treated with hCG, number expressing CGRP was higher in controls. In dorsal root ganglion, number of cells immunostained with CGRP antibody was similar in both groups but AR was not detected.

Conclusions. Present results support the hypothesis that motor nucleus of the GFN is a direct target of testosterone and that regulation of CGRP in sensory nucleus may be involved in testicular descent. © 2003 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Cryptorchid, Testicular descent, hCG, CGRP, Androgen receptor.

Introduction

Cryptorchidism, the failure of testes to descend into scrotum, affects approximately 3% of newborn human males. The standard form of therapy is surgical orchiopexy; but hormonal therapy with human chorionic gonadotropin (hCG) is also used. The basis for this treatment is stimulation of Leydig cells with hCG to raise level of circulating testosterone necessary for testis descent (1).

Testes descent occurs in two phases: transabdominal and inguinoscrotal (2). In fetal rats, transabdominal phase occurs at 16–19 days postcoitum. During this phase, testes move from urogenital region to an inguinal position. Thereafter, inguinoscrotal phase takes place at approximately the third week after birth when testes are carried out from abdominal cavity into scrotum. Testes descent is controlled by the *insl-3* gene (3,4), Müllerian inhibiting substance (5), and steroid androgens (6–9).

High maternal levels of estrogens during pregnancy are involved in human cryptorchidism etiology (10–12). In cases of cryptorchidism, it is generally agreed that estrogens inhibit androgen production by acting directly on Leydig cells (7,13). However, in prepubertal rats treated with estradiol

Address reprint requests to: H. Merchant-Larios, Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIBM, UNAM, CU, Apdo. Postal 70228, 04510 México, D.F., México. Tel: (+52) (55) 5622-3833; FAX: (+52) (55) 5622-3897; E-mail: merchant@servidor.unam.mx

113. Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV, Benezra R. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 2001;409:355-359.
114. Shigeishi H, Oue N, Kuniyasu H, Wakikawa A, Yokozaki H, Ishikawa T, Yasui W. Expression of Bub1 gene correlates with tumor proliferating activity in human gastric carcinomas. *Pathobiology* 2001;69:24-29.
115. Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the adenomatous polyposis coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 2001;3:429-432.
116. Zumburn J, Kinoshita K, Hyman AA, Nathke IS. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* 2001;11:44-49.

(E2) it was suggested that cryptorchidism provoked by blockage of testosterone (T) may also activate hypothalamic-pituitary-gonad axis (14).

During inguinoscrotal phase of testis descent, androgen receptors (AR) were detected in motor nucleus of genitofemoral nerve (GFN) (15,16). It has been suggested that inguinoscrotal descent might be modulated by GFN that innervates gubernaculum via release of calcitonin gene-related peptide (CGRP). This factor was localized in sensory nucleus of dorsal root ganglia (DRG) (17-19). Experiments *in vitro* showed that CGRP elicits rhythmic contractions of testicular gubernaculums, suggesting that CGRP may play a role in the process of inguinoscrotal descent *in vivo* (20-22). In addition, it was suggested that gubernaculum motility may be controlled by CGRP because timing at which CGRP receptors are produced corresponds to the period of inguinoscrotal migration of gubernaculum (23). However, direct correlation between levels of circulating androgens and activity of GFN motor and sensory neurons during inguinoscrotal testes descent is not yet clear.

Because it is well established that blockage of inguinoscrotal testis descent by estradiol (E2) in rats can be reverted by treatment with hCG (24-26), this model offers the possibility of obtaining insights into the role played by neural system during testis descent. The aim of the present study was to determine levels of circulating testosterone and to identify motor and sensory neurons of GFN expressing AR and CGRP during testicular descent in cryptorchid rats treated with and without hCG.

Materials and Methods

Animals. All animals were treated in accordance with ethical principles and regulations specified by the Animal Care and Use Committee of our institution and the standards of the National Institutes of Health of Mexico (Mexicana-NOM-062-ZOO-1999: Technical specifications for production, care, and use of laboratory animals, D.O.F. 22-VIII-2001). Cryptorchidism was induced in Wistar rats treated daily for 30 days with subcutaneous (s.c.) injections of 1.0 µg 17-β estradiol (E2) (Sigma, Mexico City) in 50 µL of propylene glycol. Treatment began at day 3 postpartum (dpp) according to Lein et al. (14). Thereafter, seven E2-treated rats were killed at 33 dpp and 1.0 mL of blood plasma was taken for radioimmunoassay (RIA). Remaining cryptorchid rats were divided into two groups of 24 animals each. The group denominated cryptorchid-hCG was treated daily from 33 to 43 dpp with s.c. injections of 25 IU/kg body weight of hCG (Sigma, Mexico) in H₂O as vehicle. The remaining group was cryptorchid control treated solely with H₂O. In each group, 12 animals were used for AR detection and the additional 12 were used for CGRP detection. In each of the latter groups, six rats were at 38 dpp and six at 43 dpp.

Radioimmunoassay of testosterone. Samples of blood plasma of both rat groups were collected at 38 and 43 dpp and radioimmunoassay of testosterone (T) was performed using a kit from Diagnostic Products Corp. (Los Angeles, CA, USA). This assay detects >0.04 ng testosterone/mL plasma. Cross-reactivity with dihydrotestosterone was <5% with intra- and interassay coefficients of variability of 6.5 and 10%, respectively. Statistical analysis was made by one-way analysis of variance (ANOVA) and *p* values <0.05 were accepted as significant.

Retrograde fast-blue labeling. Rats were anesthetized with ketamine (35 mg/kg body weight, Imalgem 1000, Merial, Mexico) at 36 and 41 dpp. Peritoneum was incised inferior to left renal vessels and left and right GFN were identified on poas muscle and transected, using care to leave the muscle intact. Crystals of fast-blue (Sigma, Mexico) were placed on sectioned end of GFN, and peritoneum and bowel were carefully replaced in their original positions (27). After 48 h, rats were anesthetized and transcardiac perfusion was performed with 50 mL of PBS followed by 100 mL of 4% paraformaldehyde. Spinal cord and DRG regions L1 to L2 were removed and fixed for 30 min in paraformaldehyde. After washing in PBS, samples were stored for 2 days in PBS containing 30% sucrose at 4°C, embedded in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, San Francisco, CA, USA), and frozen at -70°C (dry ice-hexane). Serial sections of 15-µm thickness each were taken with cryomicrotome, placed on slides coated with poly-L-lysine (Sigma, Mexico), and air dried.

Immunocytochemistry. Sections with blue fluorescent cells in spinal cord and DRG were treated with 1% Triton X-100 for 10 min, blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 2 h, and incubated overnight with rabbit-polyclonal antibody against androgen receptor (AR) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:1000 in BSA. After rinsing with PBS, sections were incubated in anti-rabbit IgG conjugated with rhodamine (Sigma, Mexico) diluted 1:250 with BSA, washed in PBS, and embedded in DAKO fluorescent mounting medium (DAKO Corp., San Francisco, CA, USA). GFN neurons expressing AR were identified by co-localization of red and blue fluorescence. Blue cells with or without AR were counted and statistically analyzed using ANOVA, considering *p* <0.05 as significant. Prostate sections were used as positive controls for AR antibody specificity; negative controls were incubated without primary antibody. For immunocytochemical staining of CGRP, goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted 1:500 in BSA was used. Fluorescein-rabbit anti-goat IgG (Sigma) diluted 1:250 in BSA was secondary antibody.

Results

All estradiol-treated rats were cryptorchid at 33 dpp. Testicular descent was induced by 10-day treatment with hCG in all cryptorchid rats, while testicular descent did not

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

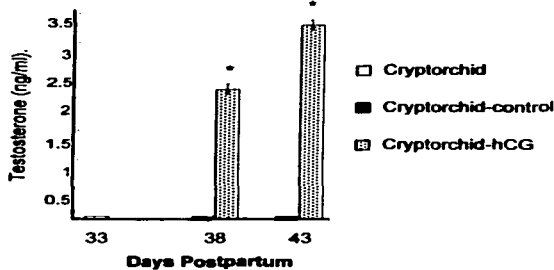


Figure 1. Plasma levels of testosterone in cryptorchid rats compared to rats treated with human chorionic gonadotrophin (hCG) and control group. *Significant difference.

occur in control rats. Plasma testosterone was undetectable in all E2-treated cryptorchid rats at 33 dpp, whereas in the group treated with hCG, levels of testosterone clearly increased from 2.2 ± 0.3 to 3.3 ± 0.4 at days 38 and 43 dpp, respectively. In control group, testosterone levels remained undetectable (Figure 1).

Retrograde traveling of fast-blue through GFN produced blue fluorescent labeling in several neurons of motor nucleus and DRG. Blue fluorescent motoneurons were localized in the center of motor horn of spinal cord at level L1-L2 (Figures 2A and B). Cells labeled with fast-blue were not found in sensory horns. Androgen receptor was detected within nucleus of motoneurons (Figure 2C) and in nucleus of secretory epithelial cells of prostate gland in adjacent sections used as positive control (not shown).

Table 1 summarizes quantitative results of fast-blue-labeled neurons with and without AR. At 38 dpp, average of

fast-blue-labeled neurons treated with hCG was 280 ± 9.7 . Of these neurons, 238 ± 4.8 were positive to AR immunostaining. At day 43 dpp, fast-blue-labeled neurons showed average of 272 ± 5.0 with 214 ± 5.9 AR positive. Cryptorchid control group showed average of 266 ± 6.9 fast-blue-labeled neurons with 50 ± 3.8 neurons immunostained with antibody against AR at 38 dpp. At 43 dpp, fast-blue-labeled neurons presented average of 281 ± 8.6 with 68 ± 5.7 AR positive. Difference of immunostain with AR between the two groups was significant at the two ages ($p < 0.05$). Finally, while several neurons were also positive to retrograde staining of fast-blue in DRG, they were negative to AR immunostaining.

On the other hand, some fast-blue-labeled neurons of motor nucleus showed colocalization with CGRP immunostaining (Figures 3A and B); quantitative results are summarized in Table 1. In motor nucleus, mean of fast-blue-labeled neurons in cryptorchid-hCG group was 252 ± 7.8 ; of these neurons, 10 ± 2.7 showed positive immunostaining to CGRP at 38 dpp. At 43 dpp, average of fast-blue-stained neurons was 241 ± 5.5 with 9 ± 1.7 CGRP positive neurons. In cryptorchid control group, average of 246 ± 7.0 fast-blue-labeled neurons with 44 ± 4.1 CGRP-positive neurons at 38 dpp was observed. At 43 dpp, fast-blue-labeled neurons were 264 ± 9.6 ; of these, 39 ± 3.3 were CGRP-positive. Comparing number of CGRP-labeled neurons in cryptorchid hCG with cryptorchid control, it was found that number of CGRP-positive neurons was significantly higher in control group ($p < 0.05$).

Statistical analysis of positive fast-blue neurons within DRG of GFN was 1449 ± 88.7 . Among these neurons, 114 ± 12.8 were positive to CGRP in cryptorchid hCG group at 38 dpp. At 43 dpp, average was $1,630 \pm 51.4$ with 213 ± 20.0 of CGRP-labeled neurons. In cryptorchid control group, mean of $1,523 \pm 35.4$ fast-blue-positive neurons with mean of 147 ± 13.6 CGRP cells at 38 dpp were quantified.

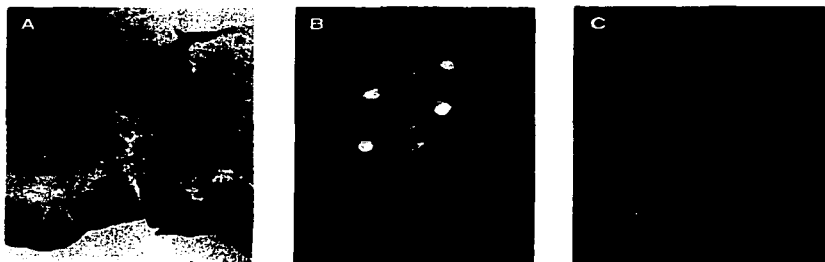


Figure 2. A: Cross-section of spinal cord at L2 level showing groups of cells retrograde-labeled with fluorescent fast-blue. Cells appear distributed in both left and right motor horns (arrows). B: Fast-blue-stained cells in the center of motor horn. C: Indirect immunocytochemical red staining of androgen receptor (AR) on same section shown in Figure 1B. Nuclei of three fast-blue neurons show AR (arrows). Magnification $\times 20$.

Table 1. Number of cells of motor nucleus double-labeled with fast-blue and antibody against androgen receptor and CGRP

Group	Cryptorchid hCG	Cryptorchid control
38 dpp		
Fast-blue	280 ± 9.7	266 ± 6.9
Androgen receptor	238 ± 4.8*	50 ± 3.8
Fast-blue	252 ± 7.8	246 ± 7.0
CGRP	10 ± 2.7*	44 ± 4.1
43 dpp		
Fast-blue	272 ± 5.0	281 ± 8.6
Androgen receptor	214 ± 5.9*	68 ± 5.7
Fast-blue	241 ± 5.5	264 ± 9.6
CGRP	9 ± 1.7*	39 ± 3.3

Values are shown as mean ± standard error (SE) for six animals at each age. *Significant differences compared with cryptorchid control in each age ($p < 0.05$).

Furthermore, at 43 dpp mean of CGRP-labeled neurons was 1,599 ± 29.4; of these, 196 ± 24.6 cells were positive to CGRP immunostaining. No significant differences were detected between the two groups (Table 2) (Figures 3C and D).

Discussion

Current results confirmed that treatment with hCG raised level of serum testosterone and induced testes descent in

Table 2. Number of cells of sensory nucleus of dorsal root ganglia double-labeled with fast-blue antibody against CGRP

Groups	Cryptorchid hCG	Cryptorchid control
38 dpp		
Fast-blue	1,449 ± 88.7	1,523 ± 35.4
CGRP	114 ± 12.8	147 ± 13.6
43 dpp		
Fast-blue	1,630 ± 51.4	1,599 ± 29.4
CGRP	213 ± 20.0	196 ± 24.6

Values are shown as mean ± standard error (SE) for six animals at each age.

E2-induced cryptorchid rats (24–26). It was suggested that testis descent induced by hCG treatment may be due to stimulation of neurons of sensitive and motor nucleus of GFN. Signals from these neurons may reach gubernaculum innervated by GFN and lead to testes descent (20–22).

Present results support the hypothesis that GFN plays an important role in testicular descent by demonstrating that there is significant increase in number of AR-positive motoneurons of GFN in hCG-treated rats undergoing testicular descent compared with their cryptorchid controls. Although Beasley and Hutson (28) suggested that motoneurons of GFN may respond directly to testosterone and induce testicular descent, identity and location of GFN neurons expressing AR and CGRP remained controversial. While Cain et al. (15) using immunocytochemical staining found that number of motoneurons expressing AR increased from gestational day 15 through birth, Han et al. (16) reported that number of neurons expressing AR increased from birth to day 30. However, neither attempted to identify whether neurons expressing AR actually pertained to GFN.

Barthold et al. (29) claimed that androgens had no effect on GFN nucleus because this formation was of similar size in both cryptorchid androgen-insensitive and normal male rats. In contrast, present results showed correlation between high levels of testosterone and increase in number of motoneurons of GFN expressing AR. Furthermore, because neurons expressing AR were not found in dorsal sensory nucleus of GFN, results suggested that T may act directly on AR-positive motoneurons and that they in turn regulated activity of sensitive nucleus.

In the current study we confirmed that neurons expressing CGRP were rare within motor nucleus (17,29,30). GFN neurons stained with antibody against CGRP were found mainly within DRG. Interestingly, rats treated with hCG undergoing testicular descent had a significantly lower number of neurons expressing CGRP than untreated controls. Goh et al. (27) reported a significant decrease in CGRP-positive motoneurons prenatally treated with flutamide and examined at 7 dpp, consistent with their suggestion that testosterone stimulated CGRP production in motoneurons of GFN. However, this idea is in conflict with increased

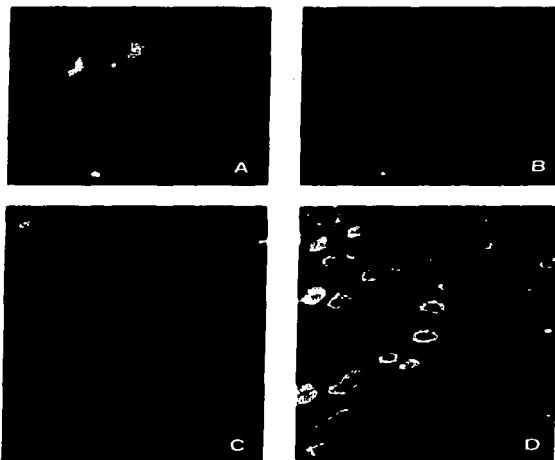


Figure 3. A and C show fast-blue-stained motor cells at spinal cord and dorsal root ganglion, respectively. B and D correspond to cells immunostained with anti-CGRP in the same section shown in A and C. Some blue cells are positive to CGRP staining (arrows). Magnification ×20.

levels of CGRP in sexually dimorphic nuclei found in castrated and flutamide-treated rats reported by other groups (31,32) and with scant CGRP-positive motoneurons found in hCG-treated rats in the present study. An explanation for these conflicting findings may be different regulation of CGRP in motoneurons at different ages.

In mutant cryptorchid rats (TS), CGRP receptors were diminished and gubernaculum became resistant to exogenous CGRP (22,33). After sectioning GFN, CGRP receptors increased in gubernaculum together with contractile response (33). Moreover, it was found that prenatal anti-androgen treatment significantly decreased number of CGRP cells in DRG (18). Although in this study presence of AR in DRG was not attempted, present results suggested that the major source of CGRP were cells within DRG of GFN. Current result revealed fewer CGRP-positive cells in rats undergoing testis descent and suggested that T stimulated CGRP depletion by stimulating its secretion. It is tempting to speculate that increased levels of testosterone induced testicular descent by acting on motor nucleus, which regulates CGRP production in GFN sensory nucleus.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Vicente Díaz for RIA determination, Isabel Pérez-Montfort for English revision, and Pedro Medina for technical assistance. This research was partially supported by a fellowship (CONACYT, Mexico, #138339) to RMV.

References

1. Saez MJ. Leydig cell: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 1994;15:574-626.
2. Hutson JM. A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet* 1985;24:419-431.
3. Nef S, Parada LF. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet* 1999;22:295-299.
4. Zimmermann S, Steding G, Emmen JMN, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF. Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol* 1999;13:681-691.
5. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns C. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 1997;18:259-280.
6. Hadziselimovic F. Embryology of testicular descent and mal-descent. In: Hadziselimovic F, editor. *Cryptorchidism: management and implications*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1983. pp. 11-34.
7. Hadziselimovic F, Thommen L, Girard J, Herzog B. The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes. *J Urol* 1986;136:274-276.
8. Abney TO, Key BA, editors. *The cryptorchid testis*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press;1989. pp. 1-176.
9. Husmann AD, Levy BJ. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 1995;42:267-276.
10. Cosgrove MD, Benton B, Henderson BE. Male genitourinary abnormalities and maternal diethylstilbestrol. *J Urol* 1977;117:220-222.
11. Dupue RH, Pike MC, Henderson BE. Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:1151-1155.
12. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Elevated placental estradiol: a possible etiological factor of human cryptorchidism. *J Urol* 2000;164:1694-1695.

13. Abney TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 1999;64:610-617.
14. Lein M, Fahlenkamp D, Schönberger B, Prollius S, Loening S. The pharmacological effect of the gonadotrophin-releasing hormone on experimental cryptorchidism in rats. *Scand J Urol Nephrol* 1996;30:185-191.
15. Cain PM, Kramer AS, Tindall JD, Husmann AD. Expression of androgen receptor protein in the lumbar spinal cord during ontologic development and following antiandrogen induced cryptorchidism. *J Urol* 1994;152:766-769.
16. Han SW, Rha KH, Lee WT, Mah SY, Choi HK, Choin SK. Immunoreactivity of androgen receptor protein in sexually dimorphic spinal motoneurons in neonatal male rats. *Yonsei Med J* 1998;39:13-19.
17. Schwindt B, Farmer PJ, Watts ML, Hrabovszky Z, Hutson M. Localization of calcitonin gene-related peptide within the genitofemoral nerve in immature rats. *J Pediatr Surg* 1999;34:986-991.
18. Hrabovszky Z, Farmer JP, Hutson MJ. Does the sensory nucleus of the genitofemoral nerve have a role in testicular descent? *J Pediatr Surg* 2000;35:96-100.
19. Hrabovszky Z, Farmer JP, Hutson MJ. Undescended testis is accompanied by calcitonin gene related peptide accumulation within the sensory nucleus of the genitofemoral nerve in trans-scrotal rats. *J Urol* 2001;165:1015-1018.
20. Park WH, Hutson JM. The gubernaculum shows rhythmic contractility and active movement during testicular descent. *J Pediatr Surg* 1991;26:615-617.
21. Momose Y, Griffiths AL, Hutson JM. Testicular descent. III. The neonatal mouse gubernaculum shows rhythmic contraction in organ culture in response to calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* 1992;131:2881-2884.
22. Goh DW, Momose Y, Middlesworth W, Hutson JM. The relationship among calcitonin gene-related peptide androgens and gubernaculum development in 3 animal models of cryptorchidism. *J Urol* 1993;150:574-576.
23. Terada M, Goh WD, Farmer JP, Hutson MJ. Calcitonin gene-related peptide receptors in the gubernaculum of normal rat and 2 models of cryptorchidism. *J Urol* 1994;152:759-762.
24. Rajfer J, Walsh PC. Hormonal regulation of testicular descent: experimental and clinical observations. *J Urol* 1977;118:985-990.
25. Spencer JR, Vaughan ED, Imperato-McGinley J. Studies of the hormonal control of postnatal testicular descent in the rat. *J Urol* 1993;149:618-623.
26. Viguera VRM, Reyes TG, Cuevas OJ, Rojas CJC, Merchant LH. The histological effect of the human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone-releasing hormone on experimental cryptorchidism in rats. *Proc West Pharmacol Soc* 1999;42:71-72.
27. Goh DW, Middlesworth W, Farmer PJ, Hutson JM. Prenatal androgen blockade with flutamide inhibits masculinization of the genitofemoral nerve and testicular descent. *J Pediatr Surg* 1994;29:836-838.
28. Beasley SW, Hutson JM. Effect of division of genitofemoral nerve on testicular descent in the rat. *Aust NZ J Surg* 1987;57:49-51.
29. Barthold JS, Mahler HR, Newton BW. Lack of feminization of the cremaster nucleus in cryptorchid androgen insensitive rats. *J Urol* 1994;152:2280-2286.
30. Newton BW, Unger J, Hamill RW. Calcitonin gene-related peptide and somatostatin immunoreactivities in the rat lumbar spinal cord sexually dimorphic aspects. *Neuroscience* 1990;37:471-489.
31. Popper P, Micevych PE. The effect of castration on calcitonin gene-related peptide in spinal motor neurons. *Neuroendocrinology* 1989;50:338-343.
32. Popper P, Micevych PE. Steroid regulation of calcitonin gene-related peptide in RNA expression in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus. *Mol Brain Res* 1990;8:159-166.
33. Terada M, Hutson JM, Farmer PJ. The role of the genitofemoral nerve and calcitonin gene-related peptide in congenitally cryptorchidism mutant TS rats. *J Urol* 1995;154:734-737.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Gubernacular fibroblasts express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with hCG .

Rosa Maria Viguera¹, Gabriela Reyes¹, Norma Moreno-Mendoza² and Horacio Merchant-Larios^{2*}.

¹Instituto Nacional de Pediatría, SS. México D.F., México, 04530. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria, México, D.F., México 04510

*Corresponding author:

Horacio Merchant-Larios

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, México, D.F., México 04510. Email: merchant@servidor.unam.mx

Short running title:

hCG and gubernacular androgen receptor

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Objective

To identify the cells that express the androgen receptor (AR) during experimental testis descent in the gubernaculum.

Materials and Methods

Cryptorchidism was provoked in 3 day-old rats treated with 17 β -estradiol during 30 days. In a group of animals, testis descent was induced with hCG, applied daily for 5 or 10 days. A correlative study using a testosterone RIA with electron microscopy and immunocytochemical detection of AR was performed in gubernacula of hCG-treated and untreated control animals.

Results

The gubernaculum of rats undergoing testes descent showed a dramatic increase in the number of AR-positive cells. They were located in the connective tissue among smooth muscle cells in the gubernacular cord and between striated muscle fibers in the bulb. In both regions AR-positive cells were identified as fibroblasts. Several clusters of amorphous material appeared in the extracellular matrix of the connective tissue in hCG-treated rats.

Conclusions

Results suggest that testosterone induces expression of AR in gubernacular fibroblasts which seem to degrade the extracellular matrix during gubernacular involution.

Key words: gubernaculum, androgen receptor, testis descent, fibroblasts, cryptorchid, rat, hCG, testosterone.

INTRODUCTION

The failure of testes to descend into the scrotum known as cryptorchidism affects approximately 3% of children (1). During development, testicular descent occurs in two phases: transabdominal and inguinoscrotal (2). In the rat, the transabdominal phase occurs during days 16-19 of gestation and the inguinoscrotal phase starts at day 19 of gestation; complete descent is accomplished around day 21 after birth (3, 4).

The gubernaculum, first described by John Hunter (5) as a fibrous structure that anchors the testicle and the epididymis to the floor of the scrotum is required for testis descent. In the rat, the gubernaculum forms between days 14 and 15 of gestation (3). In this species, the gubernaculum has two regions: the cranial gubernacular cord connecting the testicle and the epididymis and the caudal gubernacular bulb expanding to the retro-abdominal wall. Histologically, the gubernaculum is composed of mesenchymal cells and abundant extra-cellular matrix, rich in glycosaminoglycans and collagen (4-6) as well as striated muscle fibers (3-4, 7).

The cellular mechanisms underlying inguinoscrotal testis descent remain unclear. Active cell processes occur in the gubernaculum during its size reduction that may be involved: cell proliferation, differentiation and migration (8-10). Furthermore, since the gubernaculum pulls down the testis by reducing its size, some authors have suggested gubernacular muscle contraction as the main process for testis descent (7, 11). However, others consider that active regulation of the gubernacular involution underlies inguinoscrotal testis descent (3, 4, 12). Whatever

the case may be, it is widely accepted that the inguinoscrotal phase of testis descent depends substantially on androgens (1, 2, 13, 14). In the rat, androgen receptors (AR) are present in gubernacular cells between days 15 and 18 of gestation with a fall just before the final migration of the testicle (15-17). Inguinoscrotal testis descent can be inhibited in animals with the postnatal administration of estradiol (18).

Although in humans with cryptorchidism, the standard form of therapy is surgical orchiopexy, hormonal therapy has also been advocated. The most commonly used hormone is human chorionic gonadotrophin (hCG). The latter therapy, however, remains controversial since the direct or indirect effects of exogenous hormones on tissues forming the gubernaculum during testis descent are poorly known. The aim of this study was to correlate the location of the cells expressing the AR with the ultrastructural changes occurring in the gubernaculum induced by hCG treatment in rats. Concomitant with the raise in testosterone was a considerable increase in the number of AR-positive cells in the gubernaculum. AR-positive cells were located in the connective tissue and identified as fibroblasts. In the extracellular matrix around these cells, clusters of amorphous material probably representing denatured collagen fibers were found in hCG-treated rats. Current results suggest that testosterone induces the expression of AR in gubernacular fibroblasts, which in turn may degrade the extracellular matrix during gubernacular involution leading to testis descent.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All animals were treated according to the ethical principles and regulations specified by the Animal Care and Use Committee of our institution and the standards established by the National Institutes of Health of Mexico (Mexicana-NOM-062-ZOO-1999: Technical specifications for production, care and use of laboratory animals. D.O.F. 22-VIII-2001).

Cryptorchidism was induced in Wistar rats treated daily for 30 days with subcutaneous injections of 0.1 µg of 17-β-estradiol (E2) (Sigma, Mexico City) in 50 µl of propylene glycol. The treatment was started 3 days postpartum (dpp) according to Lein et al. (18). Thereafter, seven E2-treated rats were killed at 33 dpp and 1.0 ml of blood plasma was taken for radioimmunoassay (RIA). The remaining cryptorchid rats were divided in two groups containing 12 animals each. The cryptorchid-hCG group was treated daily from 33 to 43 dpp with subcutaneous injections of 25 IU/kg body weight of hCG (Sigma, Mexico City) in H₂O as the vehicle. The other group was the cryptorchid-control group treated with H₂O. In each group, twelve animals were used for AR detection. In each of the latter groups, six rats were sacrificed at 38 dpp and six others at 43 dpp.

Testosterone Radioimmunoassay

Blood plasma samples were taken from each group at 38 and 43 dpp. Radioimmunoassay of testosterone (T) was performed using a kit obtained from Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA., U.S.A.). This assay detects

over 0.04 ng of testosterone/ml plasma. Cross-reactivity with dihydrotestosterone was < 5% with intra- and inter-assay variability coefficients equal to 6.5% and 10%, respectively. A one-tail analysis of variance (ANOVA) was conducted and p values < 0.05 were considered significant.

DAPI and Androgen Receptor Immunocytochemistry

Rats were anesthetized and transcardiac perfusion was performed using 50 mL of phosphate-buffered saline (PBS), followed by 100 mL of 4% paraformaldehyde. The skin from the inguinoscrotal regions was removed, and the gubernacula were excised at the base of the projections from the abdominal wall and fixed in paraformaldehyde for 30 minutes. After washing the samples in PBS, they were stored for two days in PBS containing 30% sucrose at 4°C, the gubernacula were embedded in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, U.S.A.) and frozen at 70°C (dry-ice hexane). Serial sections of 15 µm thickness were obtained using a cryomicrotome, placed on slides coated with poly-L-lysine (Sigma, Mexico) and air-dried. Sections were stained with DAPI (1 µg/mL), rinsed in PBS and treated with 1% Triton X-100. After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA), sections were incubated overnight with rabbit-polyclonal antibody against the androgen receptor (AR)(Santa Cruz Biotechnology, Inc., U.S.A.) diluted 1:1000 in BSA. After rinsing in PBS, the sections were incubated in anti-rabbit IgG conjugated with rhodamine or FITC (Sigma, Mexico), diluted 1:250 with BSA, washed in PBS and embedded in DAKO fluorescent mounting medium (DAKO Corporation, U.S.A.). Cells expressing the AR in the gubernaculum were identified by the fluorescent co-localization of red (rhodamine) with blue (DAPI) colors within the nucleus of the

same cell. Similarly treated sections of prostate placed on the same slide of sections the gubernaculum were used as positive controls for the specificity of the AR-antibody. Negative controls were incubated without the primary antibody.

Electron Microscopy

Tissues were fixed in Karnovsky solution (19) without Ca^{2+} and post-fixed in 1% OsO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in Zetterqvist buffer (20). Tissue samples were washed in cacodylate buffer, dehydrated in increasing concentrations of ethanol (50-100%), propylene oxide and embedded in Epon 812 (Electron Microscopy Science Fort Washington, Philadelphia, U.S.A.). Sections (60-70 nm) were cut with an ultramicrotome (Reichert Ultracut S), stained with uranyl acetate and lead hydroxide and examined under a Jeol 1010 electron microscope. For light microscopy, semithin sections (1 μm) were stained with toluidine blue.

Results

Cryptorchidism was successfully induced in all rats at 33 dpp, after 30 days of E2 treatment. While 100% of animals treated with hCG showed testicular descent at 43 dpp after 10 days of treatment, untreated controls remained cryptorchid at this age. Testosterone was undetected in all cryptorchid rats at day 33 after birth when treatment with hCG was started. Levels of plasma testosterone gradually increased in rats treated with hCG; after 5 and 10 days of treatment, the levels of testosterone were 2.2 ± 0.3 and 3.3 ± 0.4 respectively. On the other hand, although testosterone remained undetectable in control rats at 38 and 43 dpp, they showed a similar growth rate as those treated with hCG (results not shown).

Immunocytochemical detection of the androgen receptor (AR) in the gubernaculum of E2-induced cryptorchid rats revealed clear differences depending on the presence or absence of hCG treatment. While cells with AR-positive nuclei were abundant in hCG-treated animals undergoing testis descent (Fig. 1A), they were rarely seen in the gubernaculum of untreated rats that remained cryptorchid (Fig. 1B). AR-positive cells were present along the gubernaculum of hCG-treated rats 5 or 10 days after treatment. Although in the current study a quantitative analysis was not attempted, the number of AR-positive cells in the gubernaculum appeared greater at 38 dpp (5 days hCG) than at 43 dpp (10 days hCG). The AR appeared located within the nuclei in AR-positive gubernacular cells as in sections of prostatic epithelial cells placed on the same slide which were used as positive control (image not shown).

Counterstaining the nuclei of all the cells with DAPI (Fig. 1C), it was possible to distinguish the location of cells with AR-positive nuclei (Fig. 1D) among the different tissues that form the gubernacula (Fig. 1E). Although scattered AR-positive cells were found in the gubernacular cord formed by fibroblasts and smooth muscle fibers, most cells with AR-positive nuclei were concentrated in the bulb. As confirmed at electron microscope level, the bulb region is formed by a layer of fibrous connective tissue and a layer formed by striated muscle fibers. Most cells in the layer of fibrous connective tissue had AR-positive nuclei while in the layer rich in striated muscle, muscle fibers nuclei appeared AR-negative (Fig. 1E).

The ultrastructural study of the gubernaculum showed similar types of cells at 38 and 43 dpp in both the cryptorchid-hCG and in the cryptorchid-control animals. In

addition to collagen fibers, abundant smooth muscle cells and some fibroblasts appeared in the gubernacular cord (Fig. 2A). Since in this region smooth muscle nuclei predominate over fibroblast nuclei, the scant number of cells with AR-positive nuclei seen in frozen sections with the light microscope probably correspond to fibroblasts. In contrast to the cord, smooth muscle cells were rare in the bulb while fibroblasts and striated muscle fibers were abundant. Fibroblast cells were concentrated in the layer of dense connective tissue where collagen fibers were abundant (not shown). In the layer formed mainly by striated muscle cells, fibroblasts were also tightly arranged as narrow strips of connective tissue between bundles of striated muscle cells (Fig. 2B). Considering the correlation in number and distribution of AR-positive nuclei and fibroblasts in both the cord and the bulb, it is likely that cells with AR-positive nuclei correspond to fibroblasts rather than to nuclei of smooth or striated muscle cells.

Alternated semi-thin and thin sections of both, the cord and the bulb of hCG-treated rats showed conspicuous clusters of electron-dense amorphous material in the extracellular matrix which were absent in the cryptorchid controls. The clusters of amorphous material were randomly distributed among dense bundles of collagen fibers in the near elongated cytoplasmic processes of fibroblasts (Figs. 2C). Furthermore, as in control animals, apoptotic cells were rarely found in the regressing gubernaculum of hCG-treated rats undergoing testis descent.

Discussion

While during gestation, abundant mesenchymal cells were found in the rat gubernaculum (3), mesenchymal cells were occasionally seen in the gubernaculum after birth. This finding suggests that most mesenchymal cells present in the fetal

gubernaculum differentiate as fibroblast, smooth and striated muscle cells after birth. Therefore, present observations indicate that factors required for differentiation of mesenchymal cells into fibroblasts have acted during the perinatal period. Differentiation of mesenchymal cells into smooth and striated muscle fibers, however, may still take place during testis descent.

Involution of the gubernaculum during inguinoscrotal testis descent implies size reduction. Although studies in other species suggest that regression of the connective tissue takes place during testis descent (3, 4, 12), current results indicate that regression occurs without cell death. Apoptotic cells were rare in rats treated with hCG when testes were actively descending.

In the present study a high number of AR-positive cells was found in postnatal rats during testis descent in estradiol-treated cryptorchid rats. In contrast, during normal testis descent, a high number of AR-positive cells were seen in the gubernaculum of fetal rats but few AR-positive cells were formed after birth (15-17). These conflicting results may be explained by the accelerated process of testicular descent induced by hCG treatment in present experimental conditions. While in the current study inguinoscrotal testis descent lasted 10 days, normal testicular descent lasts around 21 days. Thus, a larger number of AR positive cells may be needed to carry out the same process in a shorter period of time.

In the current study, the use of DAPI, an ubiquitous nuclear stain, allowed us to determine that the cells immunoreactive to AR in the gubernaculum correspond mainly to fibroblast cells found in great number in the hCG-treated group.

Furthermore, it is tempting to speculate that the amorphous material observed with the electron microscope in hCG-treated rats, may be collagen and other matrix

glycoconjugates in the process of being digested. Testosterone-stimulated fibroblasts may secrete metalloproteases involved in the involution of the gubernacular intercellular matrix. This idea is supported by the presence of high acid phosphatase activity found in the gubernaculum during testis descent (21). Husmann and Levy (1) proposed that androgens alter the viscoelastic properties of the gubernaculum reducing its turgidity and pushing the testis into the scrotum. In the absence of androgens, the gubernaculum becomes rigid preventing testicular descent (22). In the current study, the process of inguinoscrotal testicular descent induced with hCG correlates with increasing levels of plasma testosterone as previously shown (23). Testosterone acts directly or indirectly on the gubernaculum inducing testicular descent. In addition to an indirect action via the genitofemoral nerve (24) it has been proposed that testosterone acts directly on the gubernaculum inducing functional and/or morphological changes leading the testis to migrate towards the scrotum. Thus, muscle contraction and/ or connective tissue remodeling may be the mechanisms underlying the gubernacular function for testis descent (3, 4, 7, 11, 12).

In the present study, the ultrastructure of the gubernaculum showed abundant striated and smooth muscle fibers located in the bulb and the cord, respectively. The presence of the two kinds of muscle fibers in the gubernaculum suggests their participation in the process of testis descent induced by hCG. According with current results, the role of testosterone to induce smooth and striated muscle contraction for testis descent, appears to be complex. Since in current results the AR were mainly located in connective cells nuclei and not in muscle fibers nuclei, at least two possible mechanisms can be postulated: i. Testosterone action is

mediated by fibroblasts which contain AR by changing the conditions of the intercellular matrix that leads to gubernacular muscle contraction. ii. Testosterone induces gubernacular muscle contraction through a non-genomic pathway (25).

Conclusion

During the inguinoscrotal testicular descent, testosterone targets fibroblastic cells of the gubernaculum. Gubernacular muscle contraction for testis descent induced by testosterone may be indirectly mediated by connective fibroblasts and/or directly by a non-genomic mechanism. Testosterone may induce gubernacular fibroblasts to secrete proteolytic enzymes that digest the extracellular matrix during gubernacular involution.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Isabel Pérez-Montfort for English revision. This research was partially supported by a fellowship (CONACyT, Mexico, # 138339) to RMV

REFERENCIAS

- 1- Husmann AD, Levy BJ. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 1995;42:267-76.
- 2- Hutson JM, Donahoe PK. The hormonal control of testicular descent. *Endocr Rev* 1986; 7:270-83.
- 3- Fujikake N, Togashi H, Yamamoto M, Arishima K, Ueda Y, Eguchi Y. Relationship between the development of the gubernaculum and the testicular descent in the rat fetus: macroscopic and light and electron microscopic observation *Nippon Juigaku Zasshi* 1989; 51:416-24.
- 4- Wensing CGJ. Testicular descent in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. *Anat Rec* 1986; 214:154-60.
- 5- Hunter J. A description of the situation of the testis in the foetus with its descent into the scrotum. In Hunter J editors *Observations certain parts of the animal occonany*. London 13 castle St, 1786 p. 1-26.
- 6- Heyns CF, Human HJ, Werely CJ, De Klerk DP. The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the foetus. *J Urol* 1990; 143:612-17.
- 7- Radhakrishnan J, Morikawa Y, Donahoe, PK, Hendrel W H. Observations on the gubernaculum during descent of the testis. *Invest Urol* 1979; 16:365-68
- 8- Fallat ME, Williams MPL, Farmer PJ, Hutson JM. Histologic evaluation of inguinoscrotal migration of the gubernaculum in rodents during testicular descent and its relationship to the genitofemoral nerve. *Pediatr Surg Int* 1992; 7:265-70.
- 9- Lam LKS, Clarnette DT, Hutson MJ. Does the gubernaculum migrate during inguinoscrotal testicular descent in the rat? *Anat Rec* 1998; 250:159-63.
- 10- Hrabovszky Z, Di Pilla N, Yap T, Farmer JP, Hutson MJ, Carlin BJ. Role of the

- gubernacular bulb in cremaster muscle development of the rat. *Anat Rec* 2002; . 267:159-65.
- 11- Somerville CP, Jamison ES, Goldie GR, Warton A, MacKellar A, Curnow DH, Keogh EJ. A pharmacological and ultrastructural study of the rabbit gubernaculum testis. *Comp Biochem Physiol* 1983; 76:75-80
- 12- Cain PM, Kramer AS, Tindall JD, Husmann AD. Flutamide-induced cryptorchidism in the rat is associated with altered gubernacular morphology. *Urology* 1995; 46:553-58.
- 13- Heyns CF, Hutson JM. Historical review of theories in testicular descent. *J Urol* 1995; 153:754-67.
- 14- Hutson MJ, Hasthorpe S, Heyns C. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* 1997;18:259-80.
- 15- George FW, Peterson KG. Partial characterization of the androgen receptor of the newborn rat gubernaculum. *Biol. Reprod* 1988; 39: 536-39.
- 16- Husmann DA, McPhaul MJ. Localization of the androgen receptor in the developing rat gubernaculum. *Endocrinology* 1991;128: 383-87.
- 17- Bentvelsen FM, George FW. The foetal rat gubernaculum contains higher levels of androgen receptor than does the postnatal gubernaculum. *J Urol* 1993; 150: 1564-66.
- 18- Lein M, Tahlenkamp D, Schönberger B, Prollius S, Loenings. The pharmacological effect of the gonadotrophin-releasing hormone on experimental cryptorchidism in rats. *Scand J Urol Nephrol* 1996; 30:185-192.
- 19- Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965; 27,137A.

- 20- Zetterqvist H. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. *Ph.D. Thesis*, Karolinska Institute, Stockholm 1956.
- 21- Baumans V, Dijkstra G, Wensing CJG. Testicular descent in the dog. *Zbl Anat Histol Embryol* 1981; 10: 97-110.
- 22--McMahon RD, Kramer AS, Husmann AD. Antiandrogen induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididymal malformations. *J Urol* 1995; 154:553-57.
- 23-Spencer JR, Vaughan ED, Imperato-McGinley J. Studies of the hormonal control of postnatal testicular descent in the rat. *J Urol* 1993; 149:618-23.
- 24- Beasley SW, Hutson JM. The role of the gubernaculum in testicular descent. *J Urol* 1988; 140:1191-93.
- 25-Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E132-39.

Figure legends

Fig. 1. Immunocytochemical detection of the androgen receptor in frozen sections of rat gubernacula dissected at day 43 after birth. (A) Shows the gubernaculum of a rat which was treated with hCG for 10 days. Notice the higher number of AR-positive cells with green nuclei compared to the gubernaculum shown in (B) corresponding to the gubernaculum of a control rat. (C-E) Shows different images of the same section of the gubernacular bulb of a rat treated 10 days with hCG. (C) Shows the nuclei of all cells stained blue with DAPI. (D) Here, only the AR-positive nuclei are stained red. The connective layer (co) is at the left while the layer rich in striated muscle fibers (st) appears at the right side of this figure. (E) Pink-stained nuclei indicate co-localization of red and blue colors shown in Figs. (C) and (D). Notice that several nuclei of the muscle fibers are blue (arrow heads) suggesting their lack of AR. Bar=100 μ m

Fig. 2 Electron micrographs illustrating the ultrastructure of the gubernaculum from one control (A) and two hCG-treated animals (B and C). (A) At the gubernacular cord, the smooth muscle cells (sm) embedded in a collagen matrix (*) predominate over the fibroblasts (not shown here). Bar= 6 μ m. (B) Nuclei of satellite cells (white arrows), striated fibers (*) and fibroblasts (f) are shown. Bar= 15 μ m. (D) Part of a fibroblast (f) located in the connective layer of the bulb showing irregular cytoplasmic processes (arrows). Notice several electron-dense bodies (arrow heads) scattered in the extracellular matrix. Bar= 2 μ m.

