



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

**“FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL EN LA DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS EN
UN MODELO ANIMAL CON NEOPLASIA INTRATUBULAR DE CÉLULAS GERMINALES Y
ANTECEDENTE DE CRIPTORQUIDIA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUCERO CORTÉS TRUJILLO

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR, PROGRAMA MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTOR:

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA. **DR. SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE**, FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

México, D.F., Marzo 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de **Biología de la Reproducción**, en la **Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría (INP)**. (Recurso Federal número 057/2012).

Se contó además con una beca del **CONACYT** para estudios de posgrado con clave de registro: 516208

Se agradece el apoyo económico para asistir a cursos durante mi estancia en el posgrado, a la Universidad Autónoma de México, a través del programa del apoyo a los estudios de posgrado (**PAEP**).

Se agradece la impresión de esta tesis, a la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del programa del apoyo a los estudios de posgrado (**PAEP**).

ASESORES DE TESIS

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

Programa Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

COMITÉ TUTOR

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DR. SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

MIEMBROS DEL JURADO

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

Instituto de Biomédicas

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

Instituto Nacional de Pediatría

DR. JULIO CÉSAR ROJAS CASTAÑEDA

Instituto Nacional de Pediatría

DR. JORGE HERNÁNDEZ ESPINOSA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM)

DRA. MARGARITA DOLORES CHÁVEZ SALDAÑA

Instituto Nacional de Pediatría

AGRADECIMIENTOS

Con cariño y admiración, a la **Dra. Rosa María Viguera Villaseñor**, Jefa del Laboratorio de Biología del Reproducción, del Instituto Nacional de Pediatría; por darme la oportunidad de seguir en su laboratorio, por su paciencia, sus enseñanzas y motivaciones. Le agradezco de todo corazón ser parte de mi futuro, porque gracias a sus consejos he tenido la oportunidad de realizar la maestría, que además de conocimientos me deja experiencias buenas y sueños nuevos por cumplir.

Con admiración y respeto, al **Dr. Oscar Gutiérrez Pérez** y al **Dr. Santiago René Anzaldúa Arce**, gracias por ser parte de mi comité tutor, por sus consejos y por hacer de este trabajo algo hermoso y una experiencia inolvidable, les agradezco de todo corazón su entrega, compromiso y sobre todo el entusiasmo y confianza con la que dirigieron este trabajo. Para mí fue un honor trabajar con ustedes ya que son un ejemplo a seguir en mi vida.

A la **Dra. Margarita Chávez**, **Dr. Julio Rojas** y **Dr. Francisco Jiménez**, por sus consejos, lecciones y ayuda que me brindaron durante mi proceso de formación.

Con cariño y respeto, al técnico **Pedro Medina Granados**, por su gran apoyo, por compartir sus conocimientos y brindar siempre su amistad incondicional.

Con especial cariño a **Paola Montelongo**, por brindarme tu amistad, por compartir cada momento conmigo, gracias por tus buenos consejos, te agradezco por haber hecho este camino más ligero, por ser una persona honesta y alegre, muchas gracias por ser tan atenta y escucharme cuando lo necesité.

A mis compañeros de laboratorio, **Iris Gallegos, Carlos Durand, Daniel Landero, Edgar Cervantes**, por el apoyo que me brindaron, por compartir sus conocimientos y experiencias. Por la compañía y buenos ratos que pasamos juntos y por la amistad que logramos durante este tiempo.

Especialmente a mi compañero **Daniel Landero**, por su tiempo y disposición para enseñarme la técnica de RT-PCR. Gracias por tu amistad y por compartir tus conocimientos.

DEDICATORIA

A Dios, por darme siempre las fuerzas y sabiduría para continuar en situaciones adversas. Porque siempre me acompañas en cada paso que doy y me guías por el camino correcto llenándolo de bendiciones y aprendizaje.

Con todo mi amor a mi papá, porque siempre fuiste y serás mi mayor inspiración y motivación. Porque ante todo me enseñaste que la vida está llena de bendiciones, me enseñaste a vivir con humildad y sencillez pero sobre todo a entregar el alma en las cosas que haces en la vida. Te doy las gracias por ser un ejemplo en mi vida, por llenar mi corazón de buenos sentimientos y valores, por hacer de mí una buena persona. Te agradezco por darme lo más bonito que tengo en esta vida que es mi familia y heredarme los sueños y cosas lindas que sembraste, en fin todas las cosas buenas que tengo, espero que siempre estés orgulloso de mi y que desde el cielo me regales todos los días tu bendición.

A mi mamá y hermanos que los amo con todo mi corazón, porque gracias a su cariño, comprensión y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del esfuerzo y dedicación de todos como familia y equipo, y que gracias a ello he logrado concluir este paso que constituye el legado más valioso que pudiera recibir.

Con cariño y amor a mi novio Ricardo Tonatiuh, gracias por estar a mi lado, por ser mi compañero y amigo cuando más lo necesito, gracias por apoyarme haciendo más ligero el camino hacia nuestro futuro que esperemos sea cada día mejor y que esté lleno de proyectos y metas cumplidas.

Cuando amamos, siempre nos esforzamos por ser mejores de lo que somos.
Cuando nos esforzamos por ser mejor de lo que somos, todo a nuestro
alrededor se vuelve mejor. *El Alquímista* de **Paulo Coelho**.

ÍNDICE

1. Antecedentes

1.1. Descenso testicular.....	1
1.2. Criptorquidia.....	4
1.3. Cáncer testicular.....	6
1.3.1. Clasificación del cáncer testicular.....	7
1.4. Hipótesis propuesta para el origen de la Neoplasia Intratubular de Células Germinales no Clasificada.....	8
1.5. Problemas de fertilidad.....	12
1.6. Modelo animal.....	12
2. Planteamiento del problema y Justificación.....	13
3. Objetivo general.....	14
3.1. Objetivos particulares.....	14
4. Hipótesis.....	14
5. Material y Métodos	
5.1. Estrategia general.....	15
5.2. Formación de grupos experimentales.....	15
5.3. Realización de la orquidopexia.....	18
5.4. Realización de la eutanasia.....	18
5.5. Procesamiento y análisis de las muestras.....	19
5.5.1. Procesamiento en EPON.....	19
5.5.2. Análisis histológico.....	19

5.5.3. Procesamiento en parafina	20
5.5.4. Inmunohistoquímica para determinar proliferación (Ki-67) y proteínas de pluripotencialidad (POU5F1 y c-Kit).....	20
5.5.5. Densidad de células positivas a Ki-67, POU5F1 y c-Kit.....	21
5.5.7. Técnica de RT-PCR para determinar la expresión de proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación (POU5F1 y c-Kit).....	21
5.5.8. Análisis estadístico.....	22
6. Resultados	
6.1. Análisis anatómico.....	24
6.2. Análisis histológico.....	27
6.3. Análisis inmunohistoquímico.....	33
6.3.1. Densidad celular a Ki-67.....	33
6.3.2. Comparación de la densidad celular y expresión génica (RT-PCR) a POU5F1 y c-Kit.....	34
7. Discusión.....	37
8. Conclusión.....	43

ABREVIACIONES

LSC: Ligamento Suspensor Craneal.

NGF: Nervio Genitofemoral.

CGRP: Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina.

CO: Criptorquidia.

IGCNU: Neoplasia Intratubular de Células Germinales no Clasificada.

POU5F1: Factor de transcripción que regula la pluripotencialidad de los gonocitos.

AP-2 γ : Factor de transcripción activador de la proteína-2.

NANOG: Factor de transcripción que mantiene la pluripotencialidad de los gonocitos.

c-Kit: Receptor del SCF.

PLAP: Fosfatasa Alcalina Placentaria.

STRA8: Proteína citosólica rica en ácido glutámico, propia de espermatogonias.

NCAM: Molécula de Adhesion Neuronal.

SCF: Factor de Células *Stem*.

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

EGF: Factor de Crecimiento Epidermal.

OX: Orquidopexia.

Grupo Control: Animales sin manipulación ni tratamiento alguno.

Grupo IGCNU-CO: Animales con criptorquidia que desarrollaron IGCNU.

Grupo IGCNU-CO/CG/VH: Animales con criptorquidia que desarrollaron IGCNU, fueron tratados con Gonadotropina Coriónica y al momento de la orquidopexia solo se les inyectó Vehículo.

Grupo IGCNU-CO/CG/EGF: Animales con criptorquidia que desarrollaron IGCNU, fueron tratados con Gonadotropina Coriónica y al momento de la orquidopexia se les inyectó EGF.

RESUMEN

La criptorquidia (CO; OMIM # 219050) es un factor de riesgo para el desarrollo de la Neoplasia de Células Germinales Intratubular no Clasificada (IGCNU). Y se propone al gonocito como responsable del desarrollo de la IGCNU, ya que ambas expresan proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación como, POU5F1, c-Kit y Fosfatasa Alcalina. Los gonocitos de pacientes con CO mantienen la expresión de dichas proteínas, probablemente debido a que la células sustentaculares no proporcionan factores de diferenciación como PDGF, Ácido Retinoico (AR), Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) entre otros, impidiendo la diferenciación del gonocito a espermatogonia y favoreciendo su malignización. Por lo cual, resulta importante estudiar la diferenciación de los gonocitos y evitar así la malignización de éstas células, por lo cual en este trabajo se desarrolló un modelo animal con Neoplasia Intratubular de Células Germinales y antecedente de CO, al cual se le administró el EGF. Para lo cual, se utilizaron 20 gazapos machos Chinchilla *Oryctolagus cuniculus*. Los cuales fueron distribuidos en cuatro grupos: el grupo Control, grupo IGCNU-CO, grupo IGCNU-CO/CG/VH y grupo IGCNU-CO/CG/EGF. Los grupos a excepción del grupo Control fueron administrados con 17- β -Estradiol, a partir del día 7-60, logrando desarrollar CO y IGCNU a largo plazo. De los 90 a los 105 días post-parto (dpp) se administró Gonadotropina Coriónica (CG), favoreciendo el desarrollo del escroto. A los 105 dpp se realizó la orquidopexia y administración del EGF vía retrógrada en la red testicular. Finalmente a los 200 días se realizó la eutanasia y obtención de muestras. Observando en el grupo Control; testículos descendidos y desarrollo completo del epitelio seminífero. El grupo IGCNU-CO; presentó testículos no descendidos y ausencia de escrotos con alteraciones histopatológicas y alta inmunopositividad a POU5F1. El grupo IGCNU-CO/CG/VH; presentó desarrollo de escrotos e histológicamente se logró la diferenciación de algunos gonocitos a espermatogonias y espermatocitos, presentando alta inmunopositividad a Ki-67 y c-Kit y baja expresión de POU5F1. El grupo IGCNU-CO/CG/EGF; presentó desarrollo de escrotos, la histología se observó similar al grupo VH, aumentó la expresión de Ki-67 y c-Ki y la expresión de POU5F1 disminuyó. La orquidopexia por si sola favoreció la diferenciación de los gonocitos, redujo algunas alteraciones identificadas en la IGCNU y disminuyó la inmunopositividad a POU5F1, evitando probablemente el riesgo de malignización de las células germinales a futuro. Sin embargo proponemos que se requieren más estudios sobre el papel del EGF sobre la diferenciación de los gonocitos.

Pregunta de investigación: ¿El Factor de Crecimiento Epidermal induce la diferenciación de los gonocitos en un modelo animal con neoplasia Intratubular de células germinales y antecedente de criptorquidia?

1. Antecedentes

1.1. Descenso testicular

Durante la gestación los testículos se ubican en una posición abdominal y están sostenidos por dos ligamentos, el Ligamento Suspensor Craneal (LSC) que mantiene a los testículos unidos hacia la parte posterior del abdomen, muy cercanos a los riñones y el gubernáculo, el cual conecta a los testículos a través del epidídimo hacia el futuro canal inguinal y posteriormente a la base del escroto. El descenso testicular es un proceso complejo y gradual que requiere la interacción de factores genéticos, anatómicos y hormonales que en conjunto permiten que ambos testículos desciendan hacia las bolsas escrotales. Foresta *et al.* (2008) describen el mecanismo del descenso testicular, el cual se lleva a cabo en dos fases:

La primera *fase transabdominal*, en el humano inicia durante la semana 10 a la 23 de gestación y es regulada principalmente por el factor asociado a la insulina-3 (INSL3), el cual actúa sobre el gubernáculo a través su receptor LGR8 induciendo el crecimiento del mismo, debido tanto a la proliferación de sus células como a la síntesis de glicosaminoglicanos y ácido hialurónico. Estos procesos dilatan el canal inguinal y el escroto facilitando el paso del testículo por estas estructuras. En esta fase también participan la hormona inhibidora de los conductos paramesonéfricos (MIS) causando la involución de los conductos paramesonéfricos además de tener un efecto indirecto sobre el crecimiento del gubernáculo y finalmente la testosterona que actúa sobre el LSC haciendo que este involucione, permitiendo que el testículo permanezca cercano al anillo inguinal interno, causando la migración del testículo hacia la región inguinal (Figura 1).

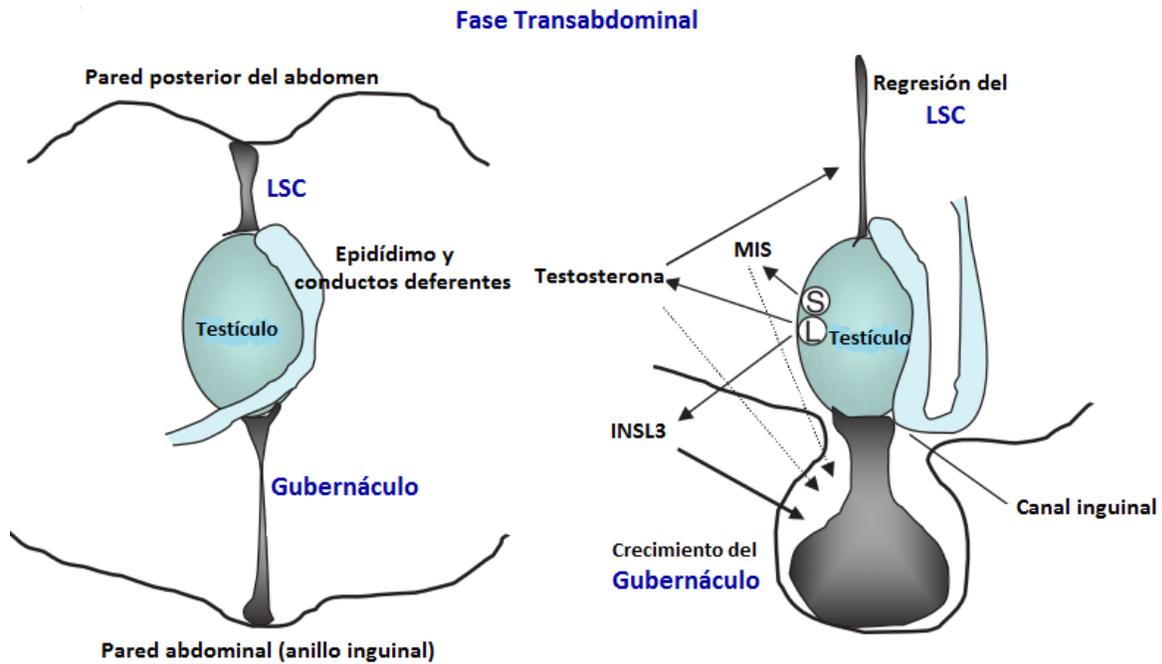


Figura 1: Se muestra el modelo de descenso testicular en humanos para la primera fase transabdominal que es dependiente de INSL3, que al igual que la testosterona son sintetizados por las células intersticiales (L), MIS que es sintetizada por las células sustentaculares (S) y las estructuras involucradas en este proceso (Modificado de Foresta *et al.*, 2008).

La segunda *fase inguinoescrotal*, en el humano continúa alrededor de la semana 26 y concluye en la semana 28 de gestación. Esta fase es regulada principalmente por la testosterona y la presión abdominal. La testosterona actúa a través de los receptores de andrógenos del gubernáculo y que se propone participan en la regresión del gubernáculo (Barthold *et al.*, 2000), o indirectamente a través del nervio genitofemoral (NGF), que en respuesta a la testosterona, libera el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) induciendo la contracción del gubernáculo y de esta forma desplaza al testículo hacia el escroto (Yong *et al.*, 2008) (Figura 2).

En el conejo el descenso inicia en los últimos días de la gestación y concluye a los 50 días después del nacimiento (Vigueras *et al.* 2013). Cuando el descenso testicular se ve interrumpido en la primera o segunda fase, los testículos no descienden adecuadamente y se presenta una patología denominada criptorquidia (CO).

Fase Inguinoescrotal

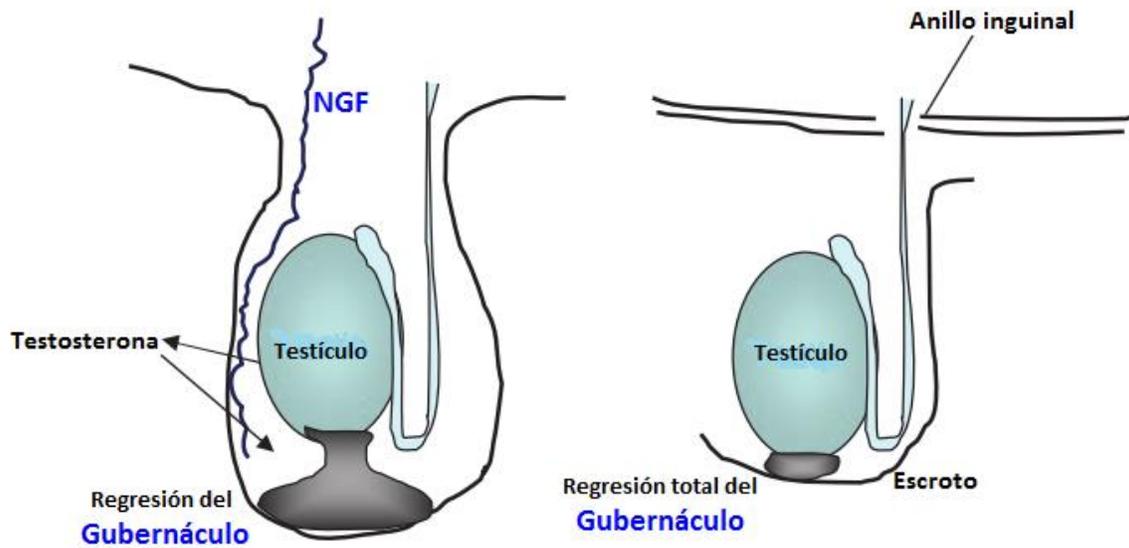


Figura 2: Se muestra el modelo de descenso testicular en humanos para la segunda fase inguinoescrotal que es dependiente de testosterona, la cual actúa sobre el gubernáculo haciendo que este involucre e indirectamente vía el Nervio Genitofemoral (NGF) y el péptido relacionado al gen de la calcitonina para la contracción del mismo, y las estructuras involucradas en este proceso (Modificado de Foresta *et al.*, 2008).

1.2. Criptorquidia

La CO se define como la falla en el descenso de uno o ambos testículos dentro del saco escrotal. La etiología de la CO es multifactorial, puede ser sindrómica o asindrómica. Sin embargo, en la actualidad se propone que la alta incidencia se debe a la exposición frecuente a sustancias químicas, con propiedades estrogénicas que son capaces de interferir en la síntesis o en la acción de andrógenos durante la gestación, es lo que se le conoce como disruptores endócrinos. El 17β estradiol es la forma más potente de esteroides estrogénicos de mamíferos. Regula negativamente el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, reduciendo las concentraciones de andrógenos e inhibiendo el descenso testicular (Vigueras *et al.*, 2004).

Se estima que la CO tiene una incidencia del 2 al 8 % en varones recién nacidos vivos a término (Hutson *et al.*, 2010) y del 30% en prematuros (Campoy y Sancho, 2001), sin embargo se ha reportado que el 50% de estos pacientes presentan descenso espontáneo durante los primeros tres meses de vida, disminuyendo así la incidencia de 0.9 a 2% (Spencer y Gonzales, 2003). En México no se conoce la incidencia de la CO debido a que no se cuentan con estudios epidemiológicos, sin embargo el INEGI en el 2013 reporta 1,300,026 varones recién nacidos vivos al año y con base a la incidencia de 0.9 a 2%, estimamos que 11,700 a 26,000 serán casos nuevos de CO por año.

Una vez que se presenta la CO se predisponen efectos a largo plazo, ya que dicha patología representa el segundo factor de riesgo para el desarrollo de cáncer testicular e infertilidad en la edad adulta (tabla 1) (Alberts *et al.*, 2008; Foresta *et al.*, 2008).

Tabla 1. Factores de riesgo pronósticos en el desarrollo de tumores testiculares.
<p>Factores de riesgo epidemiológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antecedentes de criptorquidia • Síndrome de Klinefelter • Antecedentes familiares de cáncer de testículo en familiares de primer grado • Presencia de tumor contralateral • Neoplasia Intratubular de células germinales no clasificada (IGCNU) o infertilidad
<p>Factores anatomopatológicos de riesgo pronóstico para determinar enfermedad metastásica oculta (en estadio I exclusivamente)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estirpe histopatológica • Seminoma Tamaño tumoral (≥ 4cm) Invasión de la "rete testis) • No seminoma Invasión vascular/linfática o invasión peritumoral Tasa de proliferación (MIB-1) $> 70\%$ Porcentaje de carcinoma embrionario $> 50\%$
<p>Clínicos (en enfermedad metastásica)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Localización primaria • Elevación de los niveles de marcadores tumorales • Presencia de metástasis viscerales no pulmonares

Tabla 1: Se enlistan los factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer testicular (Alberts *et al.*, 2008).

1.3. Cáncer testicular

Desde 1999 Leissner y colaboradores, reportaron que la presencia de CO incrementa de 35 a 48 veces el riesgo de desarrollar una Neoplasia de Células Germinales Intratubular no clasificada (IGCNU), se considera que esta neoplasia es un estado precursor del cáncer testicular en particular del seminoma, principalmente cuando se presenta la CO, aun cuando se desciende el o los testículos quirúrgicamente por medio de una orquidopexia (OX) (Skakkebaek, 2001).

Actualmente se ha documentado, que la mayor parte del cáncer testicular tiene su origen a partir de la IGCNU (Garner *et al.*, 2005). Aunque dicha asociación está establecida, se desconocen los mecanismos celulares involucrados (Moss *et al.*, 1986 y Garner *et al.*, 2008). Se reporta que el 50% de los pacientes diagnosticados con IGCNU, desarrollan cáncer testicular invasivo en aproximadamente 5 años a partir de su diagnóstico (Giwerzman *et al.*, 1988). También se conoce que la IGCNU coexiste con historia familiar de CO (Giwerzman *et al.*, 1989).

Aunque los tumores de células germinales del testículo comprenden sólo el 2% de todas las neoplasias humanas y el 1% de los tumores malignos en hombres, son los cánceres más comunes en varones jóvenes de 20 a 40 años (Tovar *et al.*, 2005). Con una tasa de mortalidad del 12.9% a nivel mundial. En México en el 2007 el cáncer testicular fue la cuarta causa de muerte en hombres, lo que representa el 11.8% del total de defunciones en el sexo masculino (INEGI, 2007).

En los últimos 50 años se ha reportado un incremento en la incidencia del cáncer testicular en varios países, incluyendo a Estados Unidos, Canadá, Europa, Australia y Nueva Zelanda (Liu *et al.*, 2000 y Bray *et al.*, 2006). La prevalencia mundial del número de casos reportados de cáncer testicular ha tenido un incremento del 100% desde 1936 (Ginsberg *et al.*, 2007). En México la incidencia del cáncer testicular es de 8.9 por cada 100 000 habitantes (Globocan, 2012). De los tumores de órganos genitales en este género representa el 50% (Travis, 2002).

1.3.1. Clasificación del cáncer testicular

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer testicular se clasifica en tres categorías: (a) tumores de células germinales; (b) tumores del estroma y del cordón sexual; y (c) tumores mixtos de células germinales y células del estroma y cordón sexual. Los tumores de células germinales representan del 90 al 95% de los casos de cáncer testicular, según el sistema de clasificación de la OMS (tabla 2) (Alberts *et al.*, 2008).

Tabla 2: Clasificación anatomopatológica (modificada de la Organización Mundial de la Salud, 2004) (Alberts *et al.*, 2008).

<p>1. Tumores de las células germinales</p> <ul style="list-style-type: none">• Neoplasia Intratubular de células germinales• Seminoma (incluye casos con células sincitiotrofoblásticas)• Seminoma espermatocítico• Carcinoma embrionario• Tumor de saco vitelino• Coriocarcinoma• Teratoma (maduro, inmaduro, con componente maligno)• Tumores con más de una estirpe histológica
<p>2. Tumores de los cordones sexuales/estroma gonadal</p> <ul style="list-style-type: none">• Tumor de células de Leydig• Tumor de células de Sertoli (variante con alto contenido de lípidos, esclerosante, de células grandes calcificadas)• Tumor maligno de células de Sertoli• Granulosa (adulto y juvenil)• Tumores del grupo de los tecomas/fibromas• Otros tumores del cordón sexual/estroma gonadal (incompletamente diferenciados, mixtos)• Tumores que contienen células germinales y del cordón sexual/estroma gonadal (gonadoblastoma)
<p>3. Otros tumores inespecíficos del estroma</p> <ul style="list-style-type: none">• Tumores del epitelio ovárico• Tumores de los túbulos colectores y de la “<i>rete testis</i>”• Tumores inespecíficos del estroma (benignos y malignos)

1.4. Hipótesis propuesta para el origen de la IGCNU

Actualmente se propone que el origen de la IGCNU es durante el inicio del desarrollo embrionario y fetal (Garner *et al.*, 2008) y se plantea que los gonocitos de pacientes con CO, son responsable del origen de la IGCNU. De manera normal, durante el desarrollo testicular del feto los gonocitos expresan proteínas de pluripotencialidad como POU5F1, AP-2 γ , NANOG, c-Kit y PLAP entre otras (tabla 3), las cuales se expresan a la alta durante la etapa fetal temprana y su expresión decrece gradualmente, mientras que los gonocitos se diferencian a espermatogonias inmaduras (Jorgensen *et al.*, 1995b; Rajpert *et al.*, 2004; Gaskell *et al.*, 2004; Honecker *et al.*, 2004 y Rajpert, 2006;), posteriormente a espermatogonias maduras, esto ocurre en diversas especies, incluyendo el humano, lo cual se asocia con la expresión a la baja de los marcadores de pluripotencialidad. Otro marcador que permite observar el desarrollo del gonocito es el Ki67 que es una proteína nuclear cuya presencia se asocia estrictamente con el ciclo celular y se confina al núcleo, lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento o regulación del ciclo de división celular, por lo cual además de ser un marcador de proliferación es utilizado como marcador diagnóstico de tumores testiculares (Ciaputa *et al.*, 2014). Así mismo se ha propuesto que en pacientes con antecedentes de CO el gonocito no logra su diferenciación a espermatogonia madura (Zivkovic *et al.*, 2007, Cortés *et al.*, 2012), la cual se identifica por la expresión de genes específicos de espermatogonias como STRA8 Y MAGE4 (Mitchell *et al.*, 2008).

Por lo tanto, en los casos de los pacientes con CO, los gonocitos pueden permanecer pluripotentes expresando proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación, haciéndolos susceptibles a malignizarse y desarrollar una IGCNU (Rajpert, 2006). Esta teoría está respaldada por la semejanza morfológica entre las células de la IGCNU y los gonocitos que son células grandes, redondas, con bordes definidos, con uno o más nucléolos, con pocos organelos y mitocondrias dispuestas alrededor del núcleo; además ambos tipos celulares comparten un fenotipo molecular muy similar (Sonne *et al.*, 2009); incluso en el semen de pacientes adultos con IGCNU, se ha demostrado la presencia de algunas proteínas (POU5F1, Ap2Y y NANOG) que les confieren características de células indiferenciadas y pluripotentes (Nielsen *et al.*, 2011).

Es importante aclarar que en etapa neonatal, los gonocitos se encuentran acoplados a las células de sustentaculares, vía uniones tipo gap, y dependen de factores producidos por

las células sustentaculares, para su diferenciación, tales como: Moléculas de Adhesión Celular Neuronal (NCAM), Factor de las Células *Stem* (SCF), c-Kit, Caderinas de Hipófisis y Cerebro de Tipo Corto (STPB-C), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Ácido Retinóico (AcR), Stra8 y el Factor de crecimiento Epidermal (EGF), algunos de estos se describen en la tabla 4.

El EGF es un polipéptido glicosilado compuesto por 53 residuos de aminoácidos, se produce en la glándula submaxilar, células epiteliales de los túbulos proximales renales, próstata, vesícula seminal, hipófisis anterior, estómago y testículo. El papel de éste factor en la regulación de la función reproductiva masculina, implica la síntesis de la testosterona (Sordoillet *et al.*, 1991), por tanto se sugiere un efecto positivo del EGF en la espermatogénesis a través de un mecanismo autócrino. Específicamente se ha demostrado que este factor aumenta la acción de gonadotropinas en la producción de testosterona al modular la actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de la testosterona y por incrementar la biodisponibilidad de colesterol para la esteroidogénesis o por inducir la proliferación de las células intersticiales (Moore y Morris, 1993).

Este factor está involucrado en la espermatogénesis ya que promueve la diferenciación de las células germinales. Se sugieren que en la rata el EGF y otros miembros de esta familia, tal como el factor de crecimiento transformante (TGF), tienen un papel específico en la regulación de la actividad mitótica de las espermatogonias en el epitelio seminífero, ya que estimulan, *in vitro* la síntesis de DNA (Wahab *et al.*, 2003).

Por otra parte, Kurokawa *et al.* (2005) demostró que la administración del EGF combinado con la OX en ratas con CO reduce las alteraciones histológicas testiculares, comparado con la OX por si sola. Sin embargo, el análisis de resultados de éste trabajo fue a largo plazo, por tanto no estudiaron el o los mecanismos por los cuales el EGF ejerció su efecto, probablemente sobre la diferenciación de los gonocitos testiculares.

Muchos de estos factores de diferenciación han sido propuestos por estudios en animales de laboratorio como la rata y el ratón. El momento en el cual se diferencian los gonocitos a espermatogonias, varía con la especie, en el humano se inicia en el último tercio de la gestación y se concluye entre el segundo al cuarto mes de edad (Brinster, 2002; Wu *et al.*, 2009) y en el conejo inicia en día 50 y se concluye aproximadamente a los 70 días (Vigueras *et al.*, 2013).

TABLA 3: Factores que mantienen la pluripotencialidad e indiferenciación de los gonocitos.

<p>NANOG</p> <p>también conocido como</p> <p>ENK</p>	<p>Factor de transcripción que mantiene la pluripotencialidad de las células, se expresa en células <i>stem</i> y germinales embrionarias (Yamaguchi <i>et al.</i>, 2005). Su expresión en humano es alta a las 14 semanas de gestación y posteriormente se regula a la baja (Hoei-Hansen <i>et al.</i>, 2005 y Kistensen <i>et al.</i> 2008).</p>
<p>c-Kit</p>	<p>El c-Kit fue descrito por primera vez en un tumor de células germinales por Strohmeier <i>et al.</i>, (1991a) y en la IGCNU por Rajpert y Skakkebaek (1993), seguido de varios estudios (Izquierdo <i>et al.</i>, 1995; Strohmeier <i>et al.</i>, 1995 y Bokemeyer <i>et al.</i>, 1996), su expresión se regula a la baja con la edad. Sin embargo su expresión puede contribuir al desarrollo neoplásico por prolongar la sobrevivida de células indiferenciadas (Stoop <i>et al.</i>, 2008).</p>
<p>POU5F1</p> <p>también conocido como</p> <p>OCT3/4</p>	<p>Primer factor de transcripción descrito asociado con pluripotencialidad y específico para células <i>stem</i> embrionarias (Schöler <i>et al.</i>, 1989). Su expresión después de los 4 meses de edad, se considera como factor de riesgo para malignización de los gonocitos (Looijenga <i>et al.</i>, 2003).</p>
<p>AP-2γ</p>	<p>Factor de transcripción activador de la proteína 2, involucrado en la sobrevivencia de gonocitos (Hoei-Hansen <i>et al.</i>, 2004 y Almstrup <i>et al.</i>, 2004). Se expresa en gonocitos fetales y células de la IGCNU (Rajpert, 2006).</p> <p>Pauls <i>et al.</i> (2005), demostró que el AP-2γ se expresa desde la semana 12 a la 37 de la gestación en gonocitos fetales y su expresión disminuye progresivamente. El AP-2γ regula la expresión de c-Kit en gonocitos humanos (Yamamoto <i>et al.</i>, 1993; Yasuda <i>et al.</i>, 1993).</p> <p>La expresión de AP-2γ en varios estudios, apoya la hipótesis del origen de la IGCNU a partir de los gonocitos, (Hoei-Hansen <i>et al.</i>, 2004; Pauls <i>et al.</i>, 2005; Biermann <i>et al.</i>, 2006).</p>
<p>Vasa</p>	<p>Este factor está presente en células germinales humanas a través de su desarrollo y maduración (Castrillon <i>et al.</i>, 2000 y Honecker <i>et al.</i>, 2004) y también se expresa en la IGCNU y en seminoma testicular (Zeeman <i>et al.</i>, 2002).</p>
<p>PLAP</p>	<p>Proteína que permite el desplazamiento de células germinales del alantoides a hacia las crestas germinales. Su expresión permite identificar este tipo celular (Buehr <i>et al.</i>, 1993).</p>

TABLA 4: Factores que inducen la diferenciación de los gonocitos

NCAM	Glicoproteína de superficie que mantiene la adhesión entre las células de Sertoli y los gonocitos (Wu <i>et al.</i> , 2003). Es necesaria en la adhesión, división, diferenciación y migración de distintos tipos celulares (Edelman y Crossin, 1991; Ling-Hong <i>et al.</i> , 1998). Su expresión en la rata se observa a los 5 dpp y desaparece los 15 dpp (Ling-Hong <i>et al.</i> , 1998).
SCF	Factor de células <i>Stem</i> , se expresa en el tejido somático del embrión de humano y ratón, a lo largo de la vía de migración de las células germinales primordiales (CGP), con alto nivel en la cresta genital (Keshet <i>et al.</i> , 1991 y Matsui <i>et al.</i> , 1991). Cuando la CGP migra a la gónada y se diferencia a gonocito, las células sustentaculares secretan SCF y puede mantener la sobrevivencia y actividad mitótica del gonocito humano (Strohmeier <i>et al.</i> , 1995).
STPB-C	Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , reportan una alta expresión de esta proteína en el testículo de neonatos y su disminución durante el desarrollo. Por su localización, se sugiere que actúa en las adhesiones entre las células sustentaculares y los gonocitos, manteniendo la sobrevivencia y desarrollo de estas células germinales (Wu <i>et al.</i> , 2003).
PDGF	Factor producido por las células sustentaculares postnatales, regulan la proliferación (Gnessi <i>et al.</i> , 1995 y Thuillier <i>et al.</i> , 2003), migración y diferenciación celular (Basciani <i>et al.</i> , 2008). El gonocito presenta receptores para estos y responde proliferando mitóticamente, así migra del centro del cordón a la periferia, lo que induce que se diferencie en espermatogonia (Basciani <i>et al.</i> , 2008).
AcR	El AcR modula diferentes procesos biológicos como proliferación y diferenciación (Blomhoff, 1994 y Kastner <i>et al.</i> , 1995). Es indispensable para la reproducción y mantenimiento de la función reproductiva masculina ya que la deficiencia de AcR provoca la detención del proceso de espermatogénesis, así mismo la degeneración de los tubos seminíferos (Thompson <i>et al.</i> , 1964 y Howell <i>et al.</i> , 1963). Además se ha reportado que el AcR afecta la sobrevivencia y proliferación de las CGP (Koshimizu <i>et al.</i> , 1995).
Stra8	Stra8, es una proteína citosólica fosforilada por el AcR. Se conoce que Stra8 se expresa en espermatogonias (Giulii <i>et al.</i> , 2002). Varios identifican al AcR como un regulador clave en la diferenciación de los gonocitos de ratas (Wang y Culty, 2007) y en el ratón (Huang <i>et al.</i> , 2008). Se sugiere que el AcR induce la diferenciación de los gonocitos <i>in Vitro</i> , resultando en una disminución en el número de gonocitos

1.5. Problemas de fertilidad

La falta de diferenciación de los gonocitos, probablemente se asocia a la carencia de factores producidos por las células sustentaculares, esto induce a los gonocitos a que se programen a morir por apoptosis, generando, en algunos pacientes, la presencia de únicamente células sustentaculares (Nistal *et al.*, 2007). Por lo tanto, la CO genera alteración en la espermatogénesis. Así mismo, los hombres adultos con CO bilateral presentan azoospermia, sin embargo, después de la OX, el 28% de estos hombres tienen cuenta espermática normal. Aproximadamente el 49% de los hombres con persistencia de criptorquidia unilateral, muestran concentración espermática normal comparados con el 71%, de los que tienen OX exitosa. Pocos estudios han demostrado la relación entre la calidad espermática y la edad de la OX. Es importante aclarar que cuando la OX se practica a temprana edad, entre los 10 meses y 4 años de edad, en pacientes con criptorquidia bilateral, se genera una cuenta espermática normal en un 76% de los casos, comparado con un 26% cuando la cirugía se practica a una edad entre los 4 y los 14 años de edad (Virtanen *et al.*, 2007).

Se asume que la falta de diferenciación de los gonocitos se asocia a los problemas de fertilidad, que repercuten en la cantidad de espermatogonias maduras. Se ha demostrado que en pacientes con CO el número de espermatogonias maduras es escaso. Esta reducción en la cantidad de espermatogonias es más grave que la reducción en el número total de células germinales, por lo que se conoce que existe una correlación entre el número de espermatogonias maduras y la espermatogénesis futura (Zivkovic *et al.*, 2007).

1.6. Modelo Animal

Vigueras y cols, (2013) reportó que el conejo chinchilla es un excelente modelo animal del cual se conoce el desarrollo del epitelio seminífero postnatal así como el momento en que los gonocitos migran hacia la lámina basal y adquieren características morfológicas de espermatogonias. Recientemente demostraron que la administración de 17β -estradiol a conejos postnatales desarrollan CO bilateral y posteriormente IGCNU (manuscrito enviado a publicación).

El 17β -estradiol es un estrógeno que asemeja a la exposición a disruptores endocrinos, que se considera son los causantes del desarrollo de síndromes como el de disgenesia

testicular, entre los que se incluyen a la CO (Sharpe, 2006) y al cáncer testicular. Este modelo con administración de 17 β -estradiol se apega a las condiciones humanas en donde se señala que la CO puede ser causada por la exposición a compuestos con actividad estrogénica o inhibidores de la testosterona durante el desarrollo intrauterino (Vigueras *et al.*, 2004 y Sharpe, 2006).

2. Planteamiento del Problema y Justificación

La CO es el defecto congénito al nacimiento más frecuente en humanos y el factor de riesgo mejor documentado para la IGCNU. Así mismo se ha propuesto al gonocito como el responsable del desarrollo de la IGCNU, y se menciona que este tipo celular se mantiene indiferenciado y pluripotente en los pacientes con CO desde etapas fetales con susceptibilidad a malignización. Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró mediante técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR la presencia de las proteínas POU5F1, c-Kit y PLAP en el 21.8% de los pacientes con CO, más allá de su periodo de diferenciación, es decir en pacientes mayores a los 24 meses. Aunando a este hecho, la falta de diferenciación del gonocito a espermatogonia en la ventana de tiempo, genera la ausencia de espermatogonias que repercute en la fertilidad en el estado adulto.

Con base en estos antecedentes, resulta importante el inducir la diferenciación de los gonocitos mediante factores relacionados con este proceso, como es el EGF, que participan y estimulan este proceso celular en modelos animales experimentales. Estos conocimientos pueden aportar más elementos para entender mejor la etiología y la fisiopatología de la enfermedad, con esto probablemente, en un futuro, se lograrán reducir el riesgo de desarrollar cáncer testicular e infertilidad.

3. Objetivo General

Inducir la diferenciación de los gonocitos con la administración del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) en un modelo animal con IGCNU y antecedente de criptorquidia.

3.1. Objetivos particulares

Determinar en animales con IGCNU, antecedente de criptorquidia y administración de EGF:

- a) La diferenciación de los gonocitos en relación a su morfología y al desarrollo de la espermatogénesis.
- b) Las alteraciones histológicas propias de la IGCNU.
- c) Las proteínas de pluripotencialidad como POU5F1 y c-Kit propias de gonocitos, empleando técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR en tejido testicular.
- d) La proliferación de los gonocitos a partir de Ki-67.

4. Hipótesis

La administración del EGF, permite la diferenciación de gonocitos a espermatogonias con pérdida de proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación en un modelo animal con CO-IGCNU-orquidopexia experimental.

5. Material y Métodos

5.1. Estrategia general

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la torre de investigación “Dr. Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría, y los animales fueron alojados en el Bioterio de la misma Institución.

Con base al cálculo bioestadístico para el tamaño de la muestra, se emplearon 20 conejos macho, sin manipulación experimental, clínicamente sanos con un estado microbiológico convencional. El manejo de los animales se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Además siguiendo al pie de la letra los reglamentos internos de principios de ética y trato a los animales del Instituto Nacional de Pediatría (CICUAL) y del CICUAE-FMVZ/UNAM.

Para la obtención de las crías se contó con hembras gestantes que se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable individuales (90 cm x 60 cm x 40 cm de altura), en ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad. Temperatura ambiente entre 17 a 24 °C. Agua y alimento en pellets (Purina® Rabbit Chow, México) a libre acceso. Para la construcción de los nidos, se proporcionaron criaderos (40 cm x 35 cm x 15 cm de altura), rellenos de viruta de madera, 3 días antes del término de la gestación. El destete se realizó a los 35 dpp, momento en el cual los animales se alojaron en jaulas de acero inoxidable (90 cm x 60 cm x 40 cm altura), con alimento balanceado (Purina® Rabbit Chow, México) y agua *ad libitum*.

5.2. Formación de los grupos experimentales

Se estudiaron 5 conejos para cada uno de los cuatro grupos, los cuales fueron clasificados de la siguiente manera (Figura 3):

- **Grupo Control:** Se obtuvieron conejos sanos sin ningún tratamiento, ni manipulación mismos que se les practicó la eutanasia a los 200 dpp para la obtención de las muestras.
- **Grupo IGCNU-CO:** En este grupo se indujo el desarrollo de la IGCNU administrando una dosis de 17 β -estradiol distribuida en 53 días, a partir del día 7 al 60 post-parto, en días alternados hasta cubrir una dosis de 500 μ g. Con este

modelo se desarrolló 100% de gazapos con CO bilateral inguinal. Se realizó la eutanasia a los 200 días de edad para la obtención de los testículos.

- **Grupo IGCNU-CO/CG/VH:** conejos administrados con 17β -estradiol con desarrollo de IGCNU, que al día 90 iniciaron la administración de Gonadotropina Coriónica de uso veterinario (CG) (Gonakor del laboratorio Sanfer, México) diluida en Solución salina inyectable al 9%, vía intramuscular en una dosis de 100 U.I./kg/cada tercer día, durante 6 semanas. Para desarrollar las bolsas escrotales, previo a la OX.

Al día 130-135 dependiendo del desarrollo del escroto, se realizó la OX la cual se describe a detalle más adelante. A este grupo solo se les realizó la OX y al mismo tiempo se administró el vehículo del EGF (120 μ l de azul de tripan + 40 μ l de albúmina sérica de conejo), no tuvieron ningún tratamiento posterior, se esperó la recuperación de los animales y que cumplieran los 200 días de edad para practicar la eutanasia y obtener los testículos.

- **Grupo IGCNU-CO/CG/EGF:** conejos administrados con 17β -estradiol con desarrollo de neoplasia, a los que al día 90 se les administró Gonadotropina Coriónica vía intramuscular en una dosis de 100 U.I./kg/cada tercer día, durante 6 semanas, para desarrollar las bolsas escrotales y posteriormente realizar la OX.

Es importante mencionar que en estos dos últimos grupos, antes de realizar la OX, se tomó una muestra sanguínea a través de la vena marginal de la oreja, previa sedación con Xylacina 10 mg/kg. Para obtener albúmina sérica del conejo que se inyectó como parte del vehículo del EGF.

Al día 130 a 135 dependiendo del desarrollo del escroto, se les realizó la OX momento en el cual se inyectó en cada testículo el EGF en una concentración de 10 μ g (Invitrogen, Carlsbad, California). El EGF se disolvió en una solución como vehículo, conteniendo albúmina sérica de conejo y 400 μ g/ml de azul de tripán, difundida dentro del testículo vía retrograda a través de la red testicular, con jeringa calibre 30 y aguja integrada, en un volumen de 50 μ g por testículo (Yang y Honaramooz, 2010). El azul de tripán nos permitió verificar el paso de la solución por la red testicular (Ma *et al.*, 2011). Al finalizar la OX se les dio un periodo de aproximadamente 70 días de recuperación, considerando que el ciclo del epitelio seminífero del conejo dura aproximadamente 52 días y dejando un período de 18 días para su total recuperación tanto físico como a nivel de células

testiculares logrando así que los gonocitos logren su diferenciación. Se realizó la eutanasia a los 200 días de edad para la obtención de las muestras.

Estrategia experimental

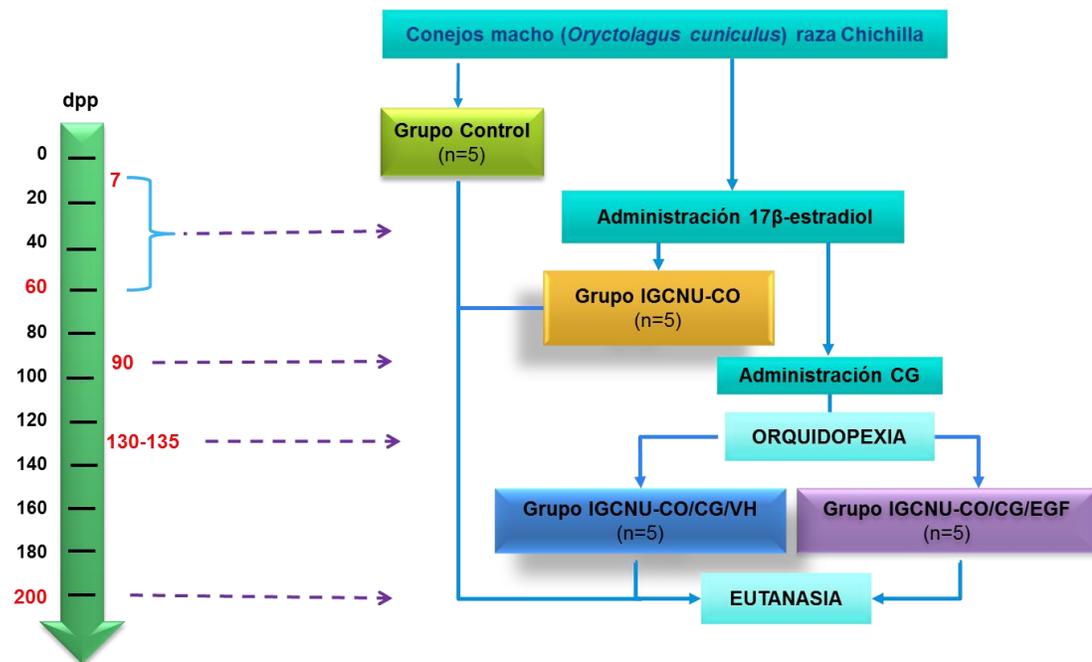


Figura 3: Esquema que muestra la distribución de los cuatro grupos experimentales: Grupo Control sin tratamiento alguno, Grupo IGCNU-CO, Grupo IGCNU-CO/CG/VH y Grupo IGCNU-CO/CG/EGF; en cada uno de los grupos entre paréntesis se indica la cantidad de animales que se utilizó por grupo. Todo esto basado en tiempos determinados que se indican en la flecha verde de la parte izquierda, en donde se indica la edad a la cual se realizó cada uno de los tratamientos y cirugías.

5.3. Realización de la OX

La OX se llevó a cabo en el área de usos múltiples del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría. Se indujo anestesia (IM ketamina 45 mg/kg), previa sedación (IM xilacina 10 mg/kg). Posteriormente se rasuró al conejo para dejar la zona libre de pelambre. Se continuó con antisepsia de la región abdominal e inguinal para realizar una incisión en la región abdominal sobre la aponeurosis del oblicuo externo para abrir el anillo interno y explorar el retroperitoneo en busca de los testículos. Una vez localizados se dividió el gubernáculo que separa el saco herniario del cordón para permitir el descenso al hemiescrotro correspondiente. Para esto se realizó una incisión en el escroto para facilitar el descenso y la fijación escrotal con una mínima tensión. Se fijó el testículo al escroto por medio de una sutura en el Dartos y se realizó una segunda ligadura ligeramente más alta para asegurar la fijación. Se utilizaron suturas absorbibles de calibre 3-0. La incisión se cerró por planos y la piel se suturó con seda intradérmica con nudos ocultos.

Después de la cirugía, los animales fueron tratados con Enrofloxacina 3.5 mg/Kg vía IM como antibiótico por 5 días y Flunixinina 2 mg/Kg vía subcutánea como desinflamatorio por tres días. Se utilizó tramadol como analgésico. Los animales se monitorearon para checar su recuperación, se observó muy bien que no exista disminución de consumo de agua de bebida y alimento. La recuperación postquirúrgica de cada conejo se monitoreo con base a la escala de dolor (ANEXO 1).

5.4. Realización de la eutanasia

La eutanasia se realizó según la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio”. Efectuando el sacrificio de forma humanitaria. Los cadáveres fueron tratados de manera respetuosa y desechándolos según la NOM-087-SEMARNAT-SSA-1-2002 y con base a la normatividad del Instituto Nacional de Pediatría y apegados a los artículos 23 y 46 capítulo VIII de la “Ley de protección a los animales” del Distrito Federal.

Una vez que los animales cumplieron 200 días se realizó la eutanasia con una sobre dosis de pentobarbital (90 mg/kg) i.p., previa sedación con xylacina (10 mg/kg). Es importante mencionar que el pentobarbital se diluyó 50/50 con solución salina fisiológica, para disminuir la irritación producida por la aplicación intraperitoneal del fármaco.

Los testículos se tomaron quirúrgicamente y se pesaron para obtener la relación con respecto al peso corporal.

5.5. Procesamiento y análisis de las muestras

Tejidos testiculares

En la exploración *post-mortem* se corroboró la ubicación y el peso de los testículos. Se procesaron para determinar el índice de maduración del epitelio seminífero, índice histopatológico (material incluido en epón), evaluar la inmunoreactividad a diversas proteínas empleando técnicas de inmunohistoquímica (inclusión en parafina) y de RT-PCR (material ultracongelado) tal y como se describe en la figura 4.

5.5.1. Procesamiento en EPON

Los testículos de cada animal fueron fijados en Karnovsky modificado por 24 horas. Posteriormente lavamos con buffer de Cacodilatos de sodio al 0.1 M, durante 2 horas. Para la post-fijación del tejido se colocaron en Tetróxido de Osmio al 1% (Zelterquist), durante 1 hora. La deshidratación de la muestra consistió en pasos sucesivos de alcoholes graduales. Para el proceso de inclusión, las muestras se lavaron con óxido de propileno, y continuamos con diluciones del epón, en el óxido de propileno, hasta llegar a la inclusión de las muestras en el epón puro y su polimerización en estufa a 60 °C. Posteriormente se obtuvieron cortes semifinos de 1 µm de grosor; se cortaron con un ultramicrotomo (Leica modelo Ultracut-UCT) y fueron teñidos con azul de toluidina al 0.5% (SIGMA-ALDRICH, México), finalmente se montaron en un portaobjetos.

5.5.2. Análisis histológico

Se realizó por un solo observador auxiliándose de un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 6.0). Por cada testículo se observaron de 20 a 30 secciones transversales de tubos seminíferos:

- a) Se determinó el área del epitelio seminífero en cortes transversales de los tubos seminíferos.
- b) Se obtuvo el grado de maduración del epitelio seminífero empleando el índice de Johnsen (1970) (ANEXO II).

c) Se determinó el índice histopatológico, basándonos en los criterios morfológicos normales y bajo los criterios de la OMS para determinar características presentes en la IGCNU en tubos seminíferos cortados transversalmente.

5.5.3. Procesamiento en Parafina

Los testículos se fijaron en paraformaldehído al 4% (SIGMA-ALDRICH, México), durante 24 horas, se realizaron lavados de PBS y se colocaron las muestras en el histoquinate con la finalidad de deshidratarlas e incluirlas en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 4 µm de grosor que se montaron en laminillas cubiertas con grenetina.

5.5.4. Inmunohistoquímica para determinar proliferación (Ki-67) y proteínas de pluripotencialidad (POU5F1 y c-Kit)

Una vez obtenido el corte, las muestras se desparafinaron y se realizó el desenmascaramiento de los epítopes colocando las muestras en citrato de sodio. Se colocó el lápiz hidrofóbico alrededor del tejido y las laminillas se colocaron en una cámara húmeda, se lavaron con PBS 0.1 M y posteriormente se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios.

Para Ki-67, después de lavar con PBS, se bloquearon con peróxido de hidrógeno, 10 min, enjuagamos con PBS y PBS-Twin 20 al 0.1 % por 10 minutos, se incubaron con BSA al 5% durante 2 horas y se incubaron con anticuerpo primario Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, Clone MIB-5, (DAKO, Dinamarca) por 24 horas; después se enjuagaron con PBS-Twin al 0.1%, y se incubaron con el anticuerpo biotinilado por 2 horas, se enjuagaron con PBS-Twin, luego con el complejo Avidina-HRP Biotinilada (AB) por 1 hora, se enjuagaron con PBS-Twin y se revelaron con diaminobencidina (DAKO, Dinamarca), finalmente se, contrastaron con hematoxilina, se enjuagaron y se dejaron secar para montarlas con entellan.

Para POU5F1 y c-kit, después de lavar con PBS, se incubaron con proteinasa K durante 20 minutos, se lavaron con PBS, se puso HCL 2N durante 30 minutos, baño de Borato de sodio 0.1 M a pH 8.5 durante 10 minutos, se lavaron con PBS, se bloquearon con suero de burro 5%, se incubaron con el anticuerpo primario (POU5F1 o c-Kit, Santa Cruz) durante 24 horas y a partir de aquí se continuó la técnica como se describió anteriormente hasta revelar, secar y montar.

5.5.5. Densidad de células positivas a Ki-67, POU5F1 y c-Kit

Se determinó en al menos 30 tubos seminíferos cortados transversalmente y longitudinalmente la proporción de células positivas a cada anticuerpo en relación al área de cada uno de los tubos observados y medidos determinados por el sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 6.0).

5.5.7. Técnica de RT-PCR para determinar la expresión de proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación (POU5F1 y c-Kit)

Las muestras de los testículos fueron colocados en un tubo limpio estéril a -70 °C para realizar RT-PCR. El proceso requirió de cuatro pasos secuenciados: Extracción del RNA total; cuantificación de RNA total; purificación del RNA total y RT-PCR propiamente dicho.

Para la extracción se tomaron 250 μ de muestra de tejido testicular agregando 500 μ l de TRIZOL (TRI REAGENT® SIGMA ALDRICH, México), se homogenizaron y se agregaron 250 μ l más de TRIZOL, para obtener una concentración final de 1:3 e incubaron por 20 minutos en hielo (10° a 15°C). Después la muestra se separó agregando 200 μ l de cloroformo por cada 750 μ l de Trizol empleado un vórtex por 10 segundos. La muestra se separaron en dos fases y se almacenaron por 15 min a 10° -15° C. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un eppendorf y se le agregaron 500 μ l de isopropanol. Se almacenaron por 12 horas a -20°C para permitir la precipitación del RNA.

Al día siguiente se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 min, desechando el sobrenadante. El pellet se lavó con 100 μ l de alcohol al 80% libre de RNAsa. Se centrifugó por 15 min a 4°C, para retirar el alcohol sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 20 min y se resuspendió en agua libre de RNAsa.

La cuantificación del RNA se llevó al acabo a partir de una alícuota de 1 μ l del RNA total para su lectura en espectrofotómetro *NanoDrop*. Por otro lado, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (80 volts x 40 min) para ver la integridad del RNA.

La purificación del RNA total se llevó a cabo con un máximo de 2 días antes del RT-PCR, para eliminar DNA y proteínas contaminantes, utilizando desoxiribonucleasa I

amplification grade kit (Invitrogen™) más RNasa por 15 min a temperatura de cuarto. La RNasa se inactivó con EDTA 25 mM incubando por 10 min a 65°C.

Para el RT-PCR se empleó el *kit one step* QIAGEN de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante para lograr la síntesis, desnaturalización, alineación y extensión total del cDNA amplificado. La amplificación por PCR de punto final se utilizó con primers específicos diseñados con ayuda del programa *ESSAY BY DESIGN* (APPLIED BIOSYSTEMS), para los genes en estudio. Tomando como gen de referencia β -actina. La cuantificación correspondiente en este caso fue cualitativa y se realizó comparando cada uno de los amplificados de los genes en estudio con el amplificado del gen de referencia mediante densitometría.

5.5.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA y comparación múltiple de Tukey a una $p < 0.05$ como diferencia significativa. Los datos se procesaron mediante el programa estadístico SSPS V.10.

Metodología: Procesamiento y análisis de las muestras

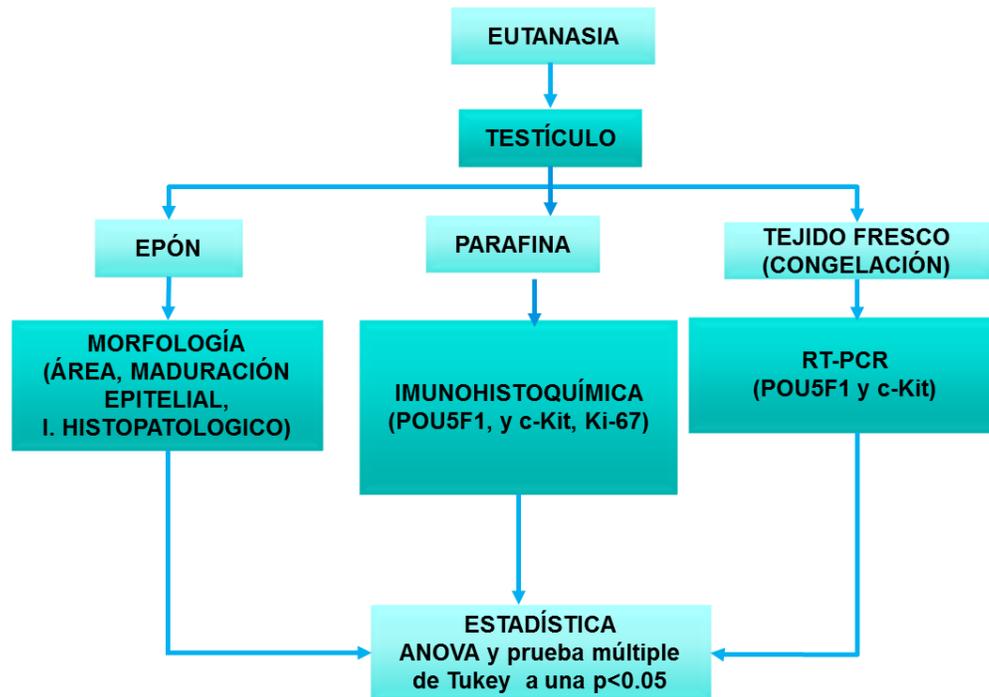


Figura 4: Esquema que muestra el procesamiento y análisis de las muestras que se tomaron a los 200 días de edad, en la exploración *post-mortem*. Los testículos se procesaron en epón, parafina y congelación y fueron analizados para evaluar la histomorfología, índice de inmunopositividad y expresión de proteínas. Los resultados fueron evaluados por un análisis estadístico mediante ANOVA y prueba múltiple de Tukey a una $p < 0.05$ como diferencia significativa.

6. Resultados

6.1. Análisis anatómico

Grupo Control: Se observó la anatomía testicular acorde a su edad para esta especie. El peso testicular fue de 0.132 ± 0.0058 gr, ubicados perfectamente en el escroto (gráfica 1, tabla 3); el pene se observó desenvainado (figura 5 A, B y C).

Grupo IGCNU-CO: En estos animales no se presentó el descenso testicular y el escroto no se desarrolló (figura 5, D, E y F). Durante la eutanasia se determinó la ubicación de los testículos dentro del canal inguinal corroborando así el tipo de criptorquidia presente en los animales estudiados, dando como resultado que el 100% de estos conejos presentaron criptorquidia bilateral inguinal. El peso testicular disminuyó significativamente del 22.5% comparando con el grupo Control ($p < 0.05$, gráfica 1, tabla 3).

Grupo IGCNU-CO/CG/VH: Todos los animales que fueron administrados con CG desarrollaron gradualmente las bolsas escrotales aun después de la administración de CG y el pene desenvainado (figura 5G y H). Durante la eutanasia se observaron que ambos testículos se ubicaron en las bolsas escrotales (figura 5 I). El peso testicular mostró una reducción significativa de 2.79% con respecto al grupo Control ($p < 0.05$, gráfica 1, tabla 3).

Grupo IGCNU-CO/CG/EGF: Al igual que el grupo anterior este grupo desarrolló ambos escrotos y el pene desenvainado. Y durante la eutanasia se identificaron los testículos en las bolsas escrotales, evidenciando una disminución en el peso testicular de 4.75% comparado con el grupo control ($p < 0.05$, gráfica 1, tabla 3).

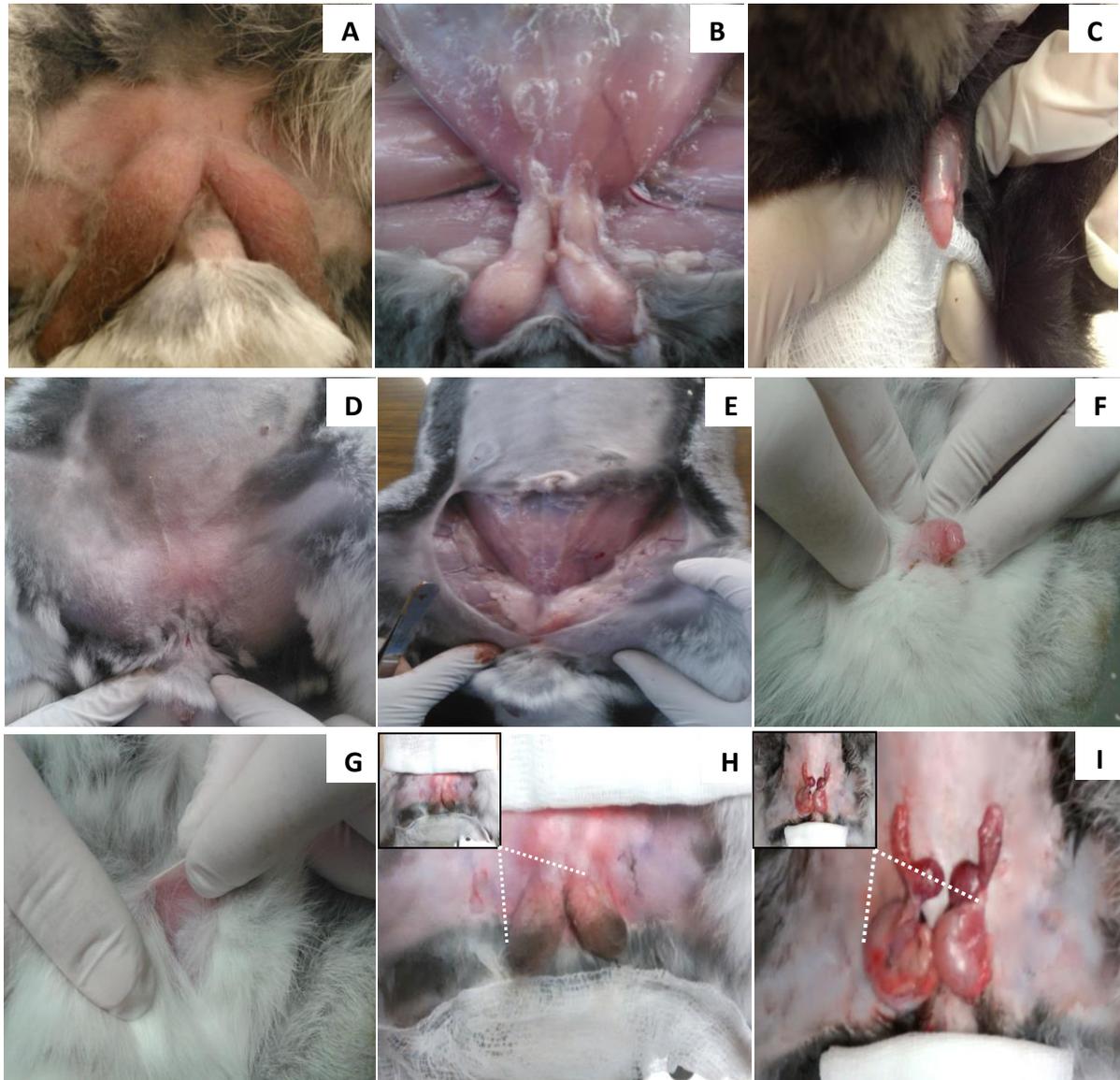
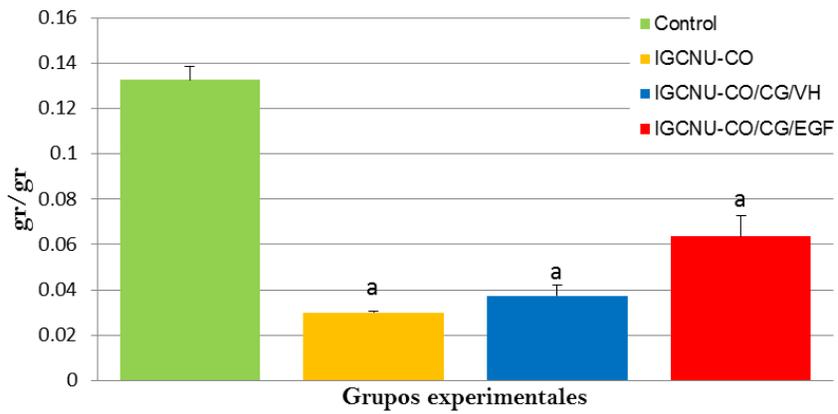


Figura 5. Imágenes anatómicas en donde se muestran la posición testicular y el desarrollo del escroto en los cuatro grupos experimentales. A) Testículos de un conejo del **Grupo Control** descendidos en las bolsas escrotales y con mayor detalle en la imagen; B) donde se hace evidente el tamaño de los mismos y C) se observa que el pene desenvaina completamente; D) Conejo del **Grupo IGCNU-CO** donde se observa ausencia de testículos escrotados; E) en este mismo grupo en la exploración se aprecian ambos testículos inguinales y F) se observa que el pene no desenvaino completamente; G) **Grupo IGCNU-CO/CG/VH** y **Grupo IGCNU-CO/CG/EGF** donde se observa, escroto en proceso de desarrollo; H) testículos descendidos después de la OX e I) ubicación de los testículos una vez realizada la eutanasia.

Peso testicular/Peso corporal



Gráfica 1: Peso testicular con respecto al peso corporal, representados como la media \pm error estándar. Considerado a $p < 0.05$ como diferencia significativa al comparar los diferentes grupos experimentales con el grupo control .

6.2. Análisis histológico

Grupo control: En este grupo se determinó que el área promedio de los tubos seminíferos fue mayor comparado con los diferentes grupos experimentales y la maduración del epitelio seminífero mostró una espermatogénesis completa (gráfica 2, tabla 5). No se observaron células germinales o gonocitos ya que éstos lograron su diferenciación a espermatogonias (gráfica 3, tabla 5). Por lo tanto, se presentó el desarrollo desde espermatogonias, espermatocitos, espermátidas redondas y elongadas hasta espermatozoides.

Se presentaron algunas alteraciones inespecíficas en el epitelio seminífero de estos conejos, como descamación y vacuolización citoplasmática (figura 6 A, B y C), estas alteraciones histopatológicas fueron consideradas como normales y propias del epitelio seminífero del conejo (gráfica 2, tabla 5).

Grupo IGCNU-CO: En este grupo el área calculada de los tubos seminíferos y el Índice de maduración epitelial fueron significativamente menor al compararse con el grupo Control, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF ($p < 0.05$) En los tejidos de este grupo, el epitelio seminífero no se desarrolló completamente ($p < 0.05$, gráfica 2, tabla 5). La presencia de gonocitos fue significativamente mayor al comparar con el grupo Control y los grupos con OX IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF ($p < 0.05$). El número de espermatogonias fue significativamente mayor con respecto a los grupos con OX IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF ($p < 0.05$, gráfica 3, tabla 5). Se lograron identificar varias alteraciones histopatológicas, como la presencia de microlitiasis o microcalcificaciones, en el centro de algunos tubos seminíferos, las cuales se originaron por degeneración celular en los cordones o túbulos seminíferos (figura 6 D, E y F); estas alteraciones fueron significativamente más evidentes para este grupo con respecto al grupo Control y a los grupos con OX IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF ($p < 0.05$, gráfica 2, tabla 5).

Grupo IGCNU-CO/CG/VH: En este grupo, el área de los tubos seminíferos fue significativamente menor con respecto a las áreas del grupo Control, IGCNU-CO y IGCNU-CO/CG/EGF ($p < 0.05$). La maduración epitelial fue significativamente menor al grupo Control ya que en los tejidos de este grupo, no se observó un epitelio seminífero

bien desarrollado característico del grupo Control. En este parámetro se presentó un aumento significativo con respecto a los grupos IGCNU-CO y IGCNU-CO/CG/EGF, ($p < 0.05$, gráfica 2, tabla 5). Se observaron algunos gonocitos persistentes aún con OX, la presencia de estos gonocitos fue significativamente menor con respecto al grupo IGCNU-CO, además el número de espermatogonias se redujo significativamente con respecto al grupo IGCNU-CO ($p < 0.05$, gráfica 3, tabla 5). Sin embargo, algunos gonocitos lograron su diferenciación a espermatogonias lo cual permitió el desarrollo del epitelio seminífero hasta espermatocitos y no se identificó otro tipo celular, por lo tanto la espermatogénesis fue incompleta. El Índice histopatológico disminuyó significativamente con respecto al grupo IGCNU-CO ($p < 0.05$), gráfica 2, tabla 5), aunque se identificaron casi las mismas alteraciones que dicho grupo (figura 6 G, H y I).

Grupo IGCNU-CO/CG/EGF: En este grupo las áreas de los tubos seminíferos aumentaron significativamente ($p < 0.05$) con respecto a las áreas del grupo IGCNU-CO/CG/VH, aunque no mostro diferencia significativa con respecto al grupo IGCNU-CO ($p > 0.05$). La maduración epitelial fue significativamente mayor al grupo IGCNU y menor al grupo IGCNU-CO/CG/VH ($p < 0.05$, gráfica 2, tabla 5). Al igual que el grupo anterior, se identificaron algunos gonocitos persistentes, los cuales disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) con respecto al grupo IGCNU-CO, sin embargo, esta disminución no fue significativamente diferente al grupo IGCNU-CO/CG/VH. El número de espermatogonias fue significativamente menor al grupo IGCNU-CO y no hubo diferencias al comparar con el grupo IGCNU-CO/CG/VH ($p < 0.05$, gráfica 3, tabla 5). El Índice histopatológico disminuyó significativamente con respecto al grupo IGCNU-CO y no presentó diferencias significativas comparado con el grupo IGCNU-CO/CG/VH ($p < 0.05$, gráfica 2, tabla 5), evidenciando casi el mismo comportamiento que el grupo IGCNU-CO/CG/VH (figura 6 J, K y L).

Tabla 5: Indica los parámetros determinados para cada grupo representado como media ± error estándar.

TABLA 5: RESULTADOS MORFOMÉTRICOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS									
GRUPOS	PT/PC (gr/gr)	ÁREA (μm^2)	M. Epitelial	Núm. G	Núm. Esp.	I.H.	I.P. (10,000 μm^2)	I.I. POU5F1 (10,000 μm^2)	I.I. c-Kit (10,000 μm^2)
CONTROL	0.132 ± 0.0058	39.41x10 ³ ± 0.6974	9.5 ± 0.1		2.17 ± 0.07	5.37 ± 0.2	7.23 ± 0.34	0 ± 0	0 ± 0
IGCNU-CO	0.029 ± 0.0005 ^a	13.10x10 ³ ± 0.3315 ^a	3 ± 0 ^a	4.23 ± 0.19 ^b	2.31 ± 0.09	12.2 ± 0.3 ^a	2.70 ± 0.14 ^{abe}	9.58 ± 0.7 ^b	1.97 ± 0.1 ^a
IGCNU-CO/CG/VH	0.037 ± 0.0046 ^a	9.59x10 ³ ± 0.2432 ^{ad}	4.9 ± 0.1 ^{ac}	0.72 ± 0.14 ^e	1.33 ± 0.18 ^c	7.90 ± 0.2 ^{ae}	17.16 ± 0.7 ^{adf}	3.19 ± 0.4 ^d	7.04 ± 0.8 ^{ad}
IGCNU-CO/CG/EGF	0.063 ± 0.0092 ^a	13.86x10 ³ ± 0.4986 ^{af}	4.3 ± 0.09 ^{abf}	0.70 ± 0.12 ^e	1.07 ± 0.10 ^c	7.57 ± 0.2 ^{ae}	23.8 ± 0.7 ^{aef}	3.96 ± 0.6	3.45 ± 0.9 ^{af}
<p>PT/PC: Peso testicular/Peso corporal. M. Epitelial: Maduración Epitelial. Núm. G: Número de Gonocitos. Núm. Esp: Número de Espermatogonias. I.H: Índice Histopatológico. I.P: índice de Proliferación. I.I.POU5F1: Índice de Inmunopositividad a POU5F1. I.I. c-Kit: índice de Inmunopositividad a c-Kit.</p>			<p>a, al comparar el grupo Control vs los grupos IGCNU-CO, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF. b, al comparar el grupo Control vs el grupo IGCNU-CO. c, al comparar el grupo Control vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF. d, al comparar el grupo IGCNU –CO vs el grupo IGCNU-CO/CG/VH. e, al comparar el grupo IGCNU-CO vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF. f, al comparar el grupo IGCNU-CO/CG/VH vs el grupo IGCNU-CO/CG/EGF.</p>						
<p>p<0.05 al comparar los diferentes grupos experimentales</p>									

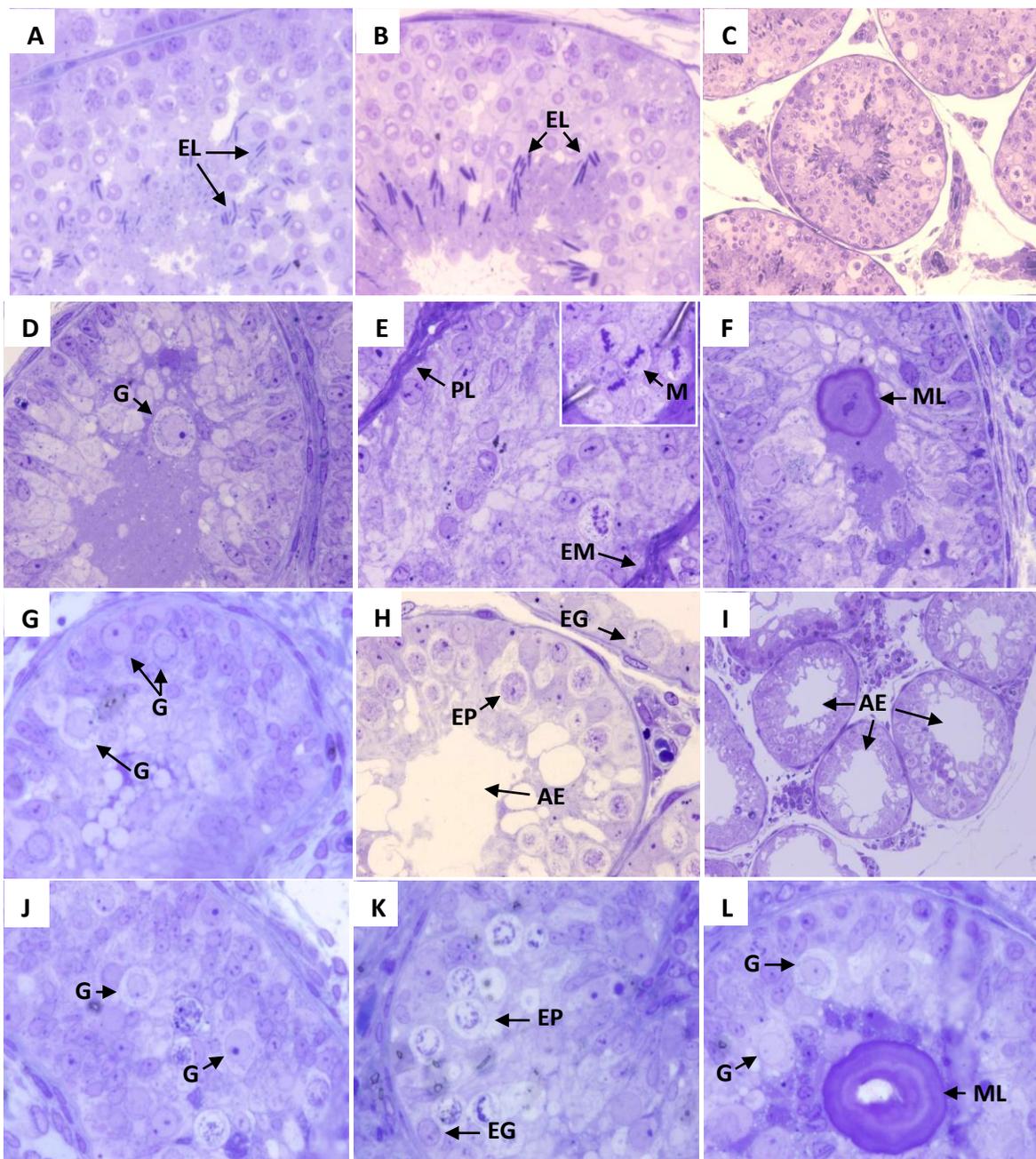
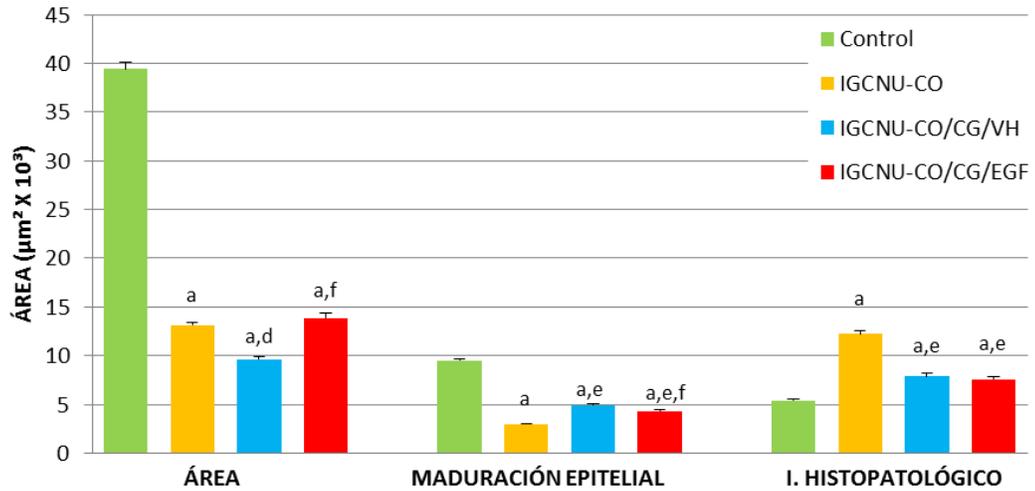


FIGURA 6. Tejido testicular de conejos de los diferentes grupos experimentales. A-C **Grupo Control** en donde se observa el desarrollo completo del epitelio seminífero hasta espermatidas elongadas (EL). D-F **Grupo IGCNU-CO** se muestra la presencia de gonocitos (G) en el centro de los cordones seminíferos, abundantes mitosis (M), plegamiento (PL) y engrosamiento (EM) de la membrana basal y microlitiasis (ML). G-I **Grupo IGCNU-CO/CG/VH** se observa persistencia de gonocitos (G), algunas espermatogonias (EG) y espermatocitos (EP) y ausencia de espermatogénesis (AE). J-L **Grupo IGCNU-CO/CG/EGF** se observaron gonocitos (G) persistentes, espermatogonias (EG), espermatocitos (EP) y microlitiasis (ML). Microscopía óptica, Azul de toluidina 20X y 60X.

Área, Maduración epitelial e Índice Histopatológico



Gráfica 2: Áreas de los tubos seminíferos, Índice de maduración epitelial e Índice histopatológico representados como medias \pm error estandar. $p < 0.05$ al comparar los diferentes grupos experimentales.

a $p < 0.05$, Grupo Control vs los grupos IGCNU-CO, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

b $p < 0.05$, Grupo Control vs el grupo IGCNU-CO.

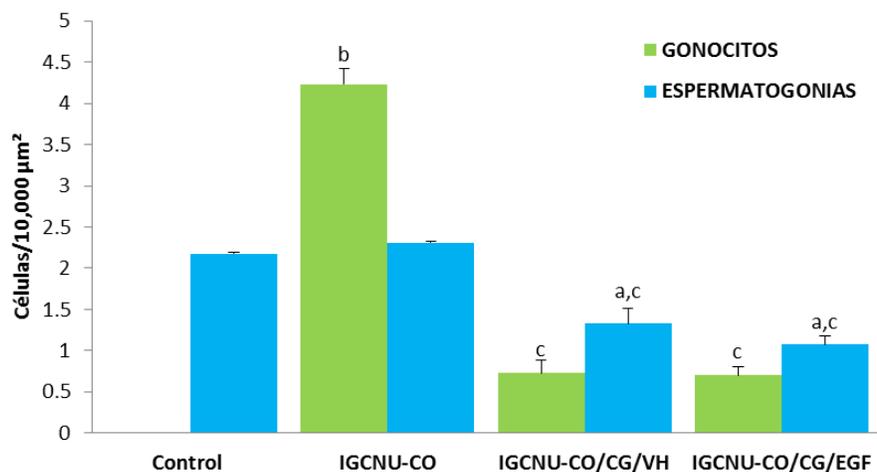
c $p < 0.05$, Grupo Control Vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

d $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs el grupo IGCNU-CO/CG/VH.

e $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

f $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO/CG/VH vs el grupo IGCNU-CO/CG/EGF.

Número de Gonocitos/Espermatogonias por Áreas



Gráfica 3: Número de Gonocitos y espermatogonias con respecto al área de los tubos seminíferos, representados como medias \pm error estandar. Se observa una diferencia significativa $p < 0.05$ entre los grupos para cada uno de los parámetros.

a $p < 0.05$, Grupo Control vs los grupos IGCNU-CO, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

b $p < 0.05$, Grupo Control vs el grupo IGCNU-CO.

c $p < 0.05$, Grupo Control Vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

d $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs el grupo IGCNU-CO/CG/VH.

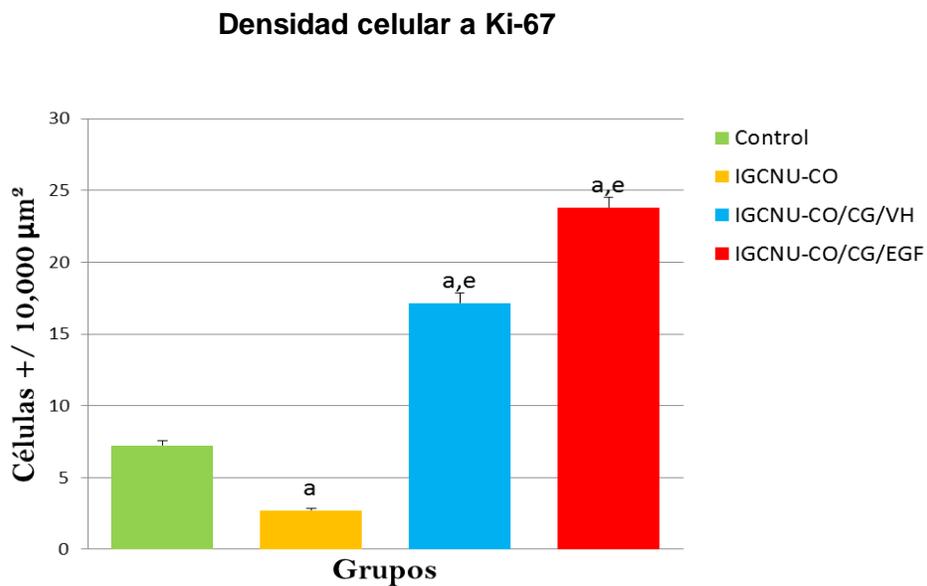
e $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

f $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO/CG/VH vs el grupo IGCNU-CO/CG/EGF.

6.3. Análisis Inmunohistoquímico

6.3.1. Densidad celular a Ki-67

Se cuantificó el número de células positivas a Ki-67 con respecto al área de los tubos seminíferos. La expresión de Ki-67 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) para el grupo IGCNU-CO con respecto al grupo Control. En los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF la expresión a Ki-67 aumento significativamente ($p < 0.05$) al comparados con el grupo Control y el Grupo IGCNU-CO.



Gráfica 4: Número de células positivas a Ki-67 en relación al área de tubos seminíferos, representados como medias \pm error estandar. Se observa una diferencia significativa $p < 0.05$ entre los grupos para cada uno de los parámetros estudiados.

a $p < 0.05$, Grupo Control vs los grupos IGCNU-CO, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

b $p < 0.05$, Grupo Control vs el grupo IGCNU-CO.

c $p < 0.05$, Grupo Control Vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

d $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs el grupo IGCNU-CO/CG/VH.

e $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

f $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO/CG/VH vs el grupo IGCNU-CO/CG/EGF.

6.3.2. Comparación de la densidad celular y expresión génica (RT-PCR) de *POU5F1* y *c-Kit*

La expresión de *POU5F1*, aumentó significativamente ($p < 0.05$) en los grupos IGCNU-CO, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF al comparar con el grupo Control. Esta expresión disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo IGCNU-CO/CG/VH con OX comparado con el grupo IGCNU-CO sin OX. Y no se presentó ninguna diferencia significativa al comparar el grupo IGCNU-CO/CG/VH con el grupo IGCNU-CO/CG/EGF (Tabla 3, Grafica 5A).

Se confirmaron los resultados de la inmunohistoquímica por RT-PCR. Respecto a *POU5F1*, el gel muestra (figura 5B), que para el caso de los conejos control, no hubo expresión de este transcrito, la expresión es evidente en el grupo IGCNU-CO y disminuye en los grupos IGCNU-CO/CG/VH y el grupo IGCNU-CO/CG/EGF, lo cual coincide con lo observado en la técnica de inmunohistoquímica.

La expresión de *c-Kit* aumentó significativamente ($p < 0.05$) en los diferentes grupos con respecto al grupo Control. En el grupo con OX IGCNU-CO/CG/VH se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la expresión de *c-Kit* al compararlo con el grupo sin OX IGCNU-CO. Además se identificó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo IGCNU-CO/CG/VH y el grupo IGCNU-CO/CG/EGF (Tabla 3, Gráfica 6).

Se confirmaron los resultados de la técnica de inmunohistoquímica por RT-PCR. En el gel se muestra la expresión del transcrito de *c-Kit* (figura 6B), que para el caso de los conejos control, no hubo expresión de este transcrito, la expresión es evidente en el grupo IGCNU-CO y disminuye en el grupo IGCNU-CO/CG/VH y en el grupo IGCNU-CO/CG/EGF aunque es evidente la presencia de *c-Kit*, lo cual coincide con lo observado en la técnica de inmunohistoquímica.

Como control constitutivo observamos la expresión de β -actina en todos los tejidos testiculares de los cuatro grupos.

Densidad celular a POU5F1

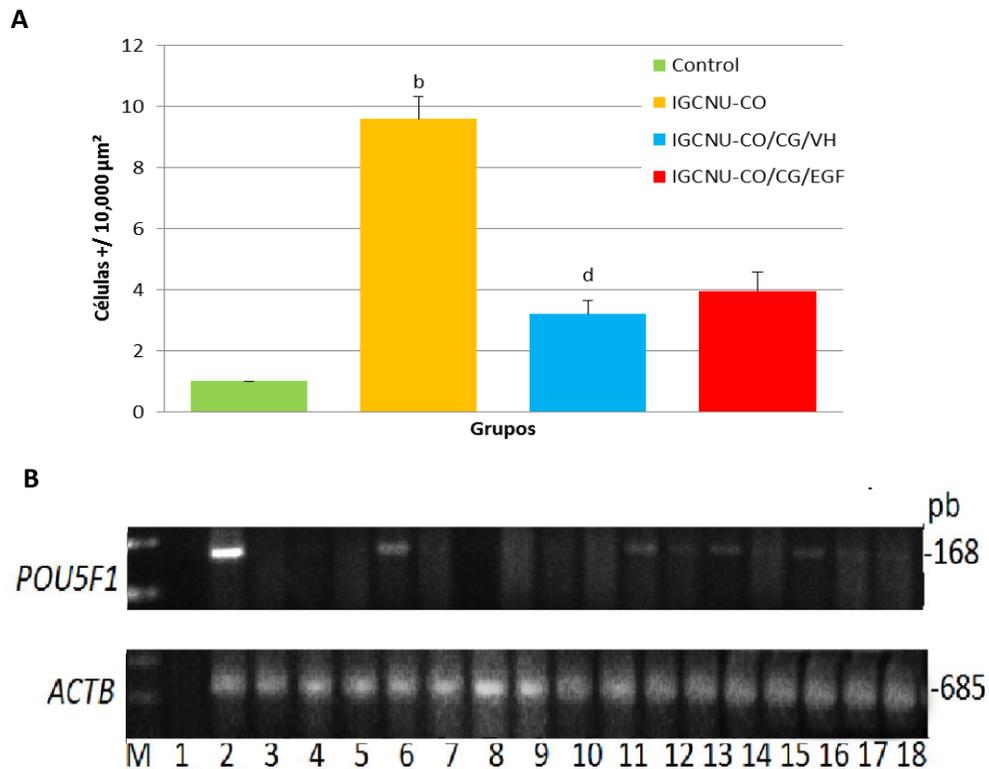


Figura 7A: Gráfica donde se muestra el número de células positivas a POU5F1 en relación al área de tubos seminíferos, representados como media \pm error estándar. Se observa una diferencia significativa $p < 0.05$ entre los grupos para cada uno de los parámetros estudiados. **7B: Gel de la RT-PCR;** expresión de *POU5F1* en tejido testicular de conejos. Línea 1: Control negativo de la técnica. Línea 2: Control positivo de un paciente con IGCNU. Línea 3 y 4: Grupo IGCNU-CO, Línea 5-10: IGCNU-CO/CG/VH, Línea 11-18 Grupo IGCNU-CO/CG/EGF.

a $p < 0.05$, Grupo Control vs los grupos IGCNU-CO, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

b $p < 0.05$, Grupo Control vs el grupo IGCNU-CO.

c $p < 0.05$, Grupo Control Vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

d $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs el grupo IGCNU-CO/CG/VH.

e $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

f $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO/CG/VH vs el grupo IGCNU-CO/CG/EGF.

Densidad celular a c-Kit

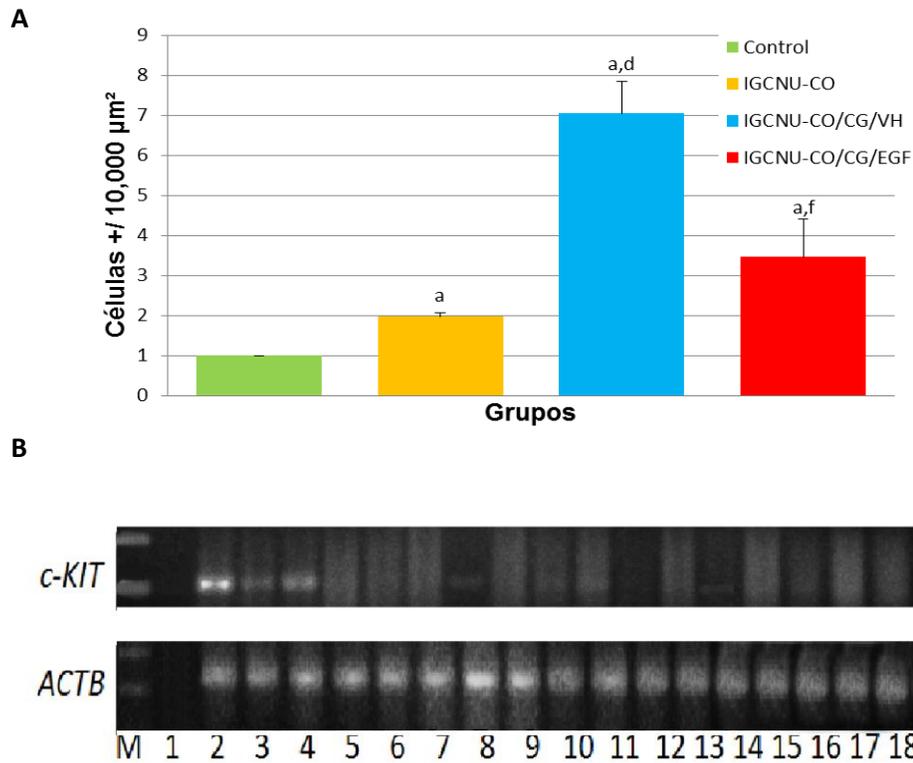


Figura 8A: Gráfica donde se muestra el número de células positivas a c-Kit en relación al área de tubos seminíferos, representados como media \pm error estandar. Se observa diferencia significativa $*p < 0.05$ entre los grupos para cada uno de los parámetros estudiados (estadística ANOVA y prueba múltiple de Tukey para grupos independientes). **8B: Gel de la RT-PCR;** expresión de *c-Kit* en tejido testicular de conejos. Línea 1: Control negativo de la técnica. Línea 2: Control positivo de un paciente con IGCNU. Línea 3 y 4: Grupo IGCNU-CO, Línea 5-10: IGCNU-CO/CG/VH, Línea 11-18: Grupo IGCNU-CO/CG/EGF.

a $p < 0.05$, Grupo Control vs los grupos IGCNU-CO, IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

b $p < 0.05$, Grupo Control vs el grupo IGCNU-CO.

c $p < 0.05$, Grupo Control Vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

d $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs el grupo IGCNU-CO/CG/VH.

e $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO vs los grupos IGCNU-CO/CG/VH y IGCNU-CO/CG/EGF.

f $p < 0.05$, Grupo IGCNU-CO/CG/VH vs el grupo IGCNU-CO/CG/EGF.

7. Discusión

La IGCNU, es una lesión precursora del seminoma y ésta solo puede ser diagnosticada a partir de una biopsia testicular, esta toma de muestra se realiza comúnmente a causa de infertilidad masculina, disgenesia testicular, testículos con traumatismos y en el testículo contralateral en casos de tumor testicular de células germinales (Velasco, 2010).

Histológicamente, la IGCNU se caracteriza por la presencia de células grandes, de citoplasma claro con abundante glicógeno de núcleo central grande con cromatina densa y nucléolo prominente, los núcleos son aneuploides y las células semejan a gonocitos, a veces muestran mitosis atípicas. Estas células se ubican adosadas a la membrana basal, la cual está engrosada. A veces los túbulos muestran microcalcificaciones, necrosis celular y células sustentaculares distribuidas hacia la zona central. La fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), c-Kit (CD117) y POU5F1 son empleados como marcadores diagnósticos para IGCNU. Es importante resaltar, que estas proteínas también están presentes en los gonocitos que al diferenciarse se regulan a la baja (Velasco, 2010).

Estos hallazgos confirman parte de nuestros resultados ya que en los grupos con IGCNU y antecedente de CO mostraron alteraciones que se apegan a las establecidas por la OMS para la clasificación de la IGCNU, como son: presencia de células atípicas, grandes y que se tiñen pálidas; con núcleos grandes, irregulares e hipercromáticos; presencia de uno o más nucleolos; abundantes mitosis; células ubicadas a nivel basal principalmente; lamina basal plegada y engrosada, además de que la espermatogénesis es comúnmente ausente debido quizá, a la falta de espermatogonias en algunos casos. La microlitiasis se observa frecuentemente asociada a pacientes con tumores testiculares, especialmente seminomas; en el 74% de los pacientes con tumor testicular se presenta este signo (Furness *et al.*, 1998; Golash *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2001; Prenti *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, los grupos que desarrollaron IGCNU, estas alteraciones ya mencionadas fueron evidentes y estuvieron asociadas a gonocitos persistentes y células sustentaculares. Esto se apega a la propuesta de Skakkebaek *et al.* (2001) en la que mencionan que en los pacientes con CO se produce una disgenesia testicular en la que existe una alteración de las células sustentaculares y de la diferenciación de las células germinales, lo que genera una predisposición a cáncer testicular.

Se reporta que los testículos de pacientes con CO, presentan displasia o un desarrollo aberrante de los gonocitos durante la etapa fetal predisponiendo a la presencia de una IGCNU y a largo plazo el desarrollo de cáncer testicular. Aunado a la CO existen factores relacionados con el desarrollo del cáncer testicular como son la bilateralidad de la CO, la OX tardía y presencia de otras anomalías asociadas (Castejón *et al.*, 2000).

En nuestros grupos con IGCNU y antecedente de CO, al evaluar los diferentes parámetros testiculares, se evidenció una mejoría con respecto al grupo con IGCNU-CO sin OX, ya que se presentó un aumento en el área de los tubos seminíferos y en la maduración epitelial, además de la disminución de las alteraciones histopatológicas y de gonocitos. Por lo tanto se propone que la OX, por si sola, favorece la diferenciación de los gonocitos lo cual repercute en el restablecimiento de la espermatogénesis reduciendo las alteraciones histológicas y mejorando el área epitelial, disminuyendo el riesgo de malignización. Se reporta que el riesgo de desarrollar cáncer testicular se reduce significativamente al realizar la OX temprana como lo demuestra el estudio realizado por Moller (2001). Este autor observó que a los niños a los que se les practicó la OX entre 0 a 9 años, el riesgo a neoplasia fue de 1.1 frente al 2.9 en aquellos niños con OX entre los 10 a 14 años y de 3.5 los intervenidos más allá de los 15 años, el riesgo aumenta hasta 14 veces en la edad adulta. Sin embargo hasta la fecha no se tenía evidencia científica que demuestre que la OX por si sola reduce el riesgo de desarrollar cáncer testicular, por lo tanto este es el primer reporte que sugiere la diferenciación de gonocitos a espermatogonias a partir de una OX oportuna.

Se desconoce el mecanismo por el cual la OX, favorece el restablecimiento del epitelio seminífero. En este trabajo proponemos que en los tejidos testiculares con IGCNU y antecedente de CO, las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno son elevadas (Ikeda *et al.*, 1999, Ishii *et al.*, 2005), el origen de estas no se conoce, sin embargo se han reportado daños al DNA originados por ROS; estas alteraciones pueden generar tanto detención como inducciones en la replicación del material genético o inestabilidad genética, todas ellas asociadas con el proceso de carcinogénesis (Marnett, 2000; Valko *et al.*, 2007). Además algunos datos indican, que la exposición continua a concentraciones moderadas de ROS induce una mayor tasa de mutaciones y con ello mayor riesgo de oncogénesis (Díaz *et al.*, 2010). Algunos autores proponen que al generarse un estrés oxidante caracterizado por el incremento de ROS se modifican algunas vías de señalización, lo que involucra el desarrollo de diversas

enfermedades; dentro de ellas el cáncer (García, 2012). El estrés oxidante participa en la carcinogénesis; por ello se ha considerado como estrategia para la prevención del cáncer, el reforzamiento de los mecanismos celulares de defensa antioxidante (García, 2012).

Por lo tanto en este trabajo al realizar la OX favorecimos la diferenciación del gonocito y probablemente la disminución de las concentraciones de ROS y con esto el riesgo de malignización.

Por otra parte, Orejón *et al.*, 2007, propone que la OX temprana disminuye el riesgo de cáncer testicular, sin embargo no realiza ningún estudio histológico que lo compruebe. Aunque con base en nuestros resultados, coincidimos con su hipótesis ya que al realizar la OX, el testículo reduce el tiempo a la exposición del estrés térmico, favoreciendo la diferenciación del gonocito y disminuyendo la expresión de proteínas de pluripotencialidad como POU5F1 y por lo tanto reduciendo el riesgo de malignización.

En esta investigación observamos mayor expresión de POU5F1 en células de los grupos con IGCNU-CO, tal y como lo reportan Jones *et al.*, 2004, quienes identifican a POU5F1 como marcador diagnóstico de la IGCNU. En los grupos con OX, la expresión de POU5F1 disminuyó y aunque no se sabe el mecanismo por el cual la OX favorece esta regulación a la baja, si se ha reportado que la OX temprana reduce el riesgo de desarrollar un cáncer testicular a futuro (Fernández *et al.*, 2013).

En tanto que c-kit presentó una expresión alta en grupos con OX administrados con VH y EGF. El c-Kit es otro marcador utilizado para diagnóstico de la IGCNU y cáncer testicular, y al igual que POU5F1 se desconoce el mecanismo por el cual mantiene la sobrevivencia de los gonocitos, además se ha propuesto que la expresión de *c-Kit* puede contribuir al desarrollo neoplásico prolongando y la sobrevivencia de células pluripotentes (Stoop *et al.*, 2008). Lo que podría explicar lo observado en los tejidos con IGCNU-CO, donde se observó la expresión de c-Kit.

Uno de los tumores en donde el c-Kit se ha visto alterado, es en el Tumor Gastrointestinal (TGI), en donde el gen *c-Kit* se encuentra mutado aproximadamente en un 80%. Las mutaciones en *c-Kit* dan como resultado un cambio en la forma y en la función del receptor manteniéndolo constantemente activo. Esto significa que, incluso sin la señal normal de su ligando SCF, los receptores siguen produciendo un estímulo constante para

que las células del TGI se dividan y sobrevivan (Michael *et al.*, 2011). Es probable que este mecanismo por el cual el *c-Kit* es alterado, se presente de igual modo en los tejidos testiculares de los conejos que fueron positivos a esta proteína, dando como resultado la sobrevivencia del gonocito y predisponiendo el desarrollo del cáncer testicular.

Sin embargo, algunos autores proponen que el *c-Kit* también participa en el inicio de la espermatogénesis durante la pubertad ya que, la expresión de los receptores de *c-kit* puede quizás, constituir uno de los factores de regulación de la espermatogénesis, por medio de la modulación de la proliferación y la apoptosis en el epitelio seminífero, así como la regulación de la motilidad tubular (Rothschild *et al.*, 2003). Probablemente esto explicaría lo observado en los grupos a los cuales realizamos la OX, la expresión de *c-Kit* aumentó significativamente esto debido probablemente a que la OX favorece el inicio de la espermatogénesis, y aunque en nuestros tejidos no observamos una espermatogénesis completa, es posible que el menor número de gonocitos observados se hayan diferenciado para dar origen a espermatogonias y posteriormente a espermatocitos.

Aunado a esto, observamos alta expresión de Ki-67, en los grupos a los cuales realizamos la OX, demostrado que probablemente este marcador indique el restablecimiento de la espermatogénesis, ya que podría haberse activado la proliferación de espermatogonias y espermatocitos. Ya que se ha reportado que el Ki-67, se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis) pero no en G0, por lo tanto, Ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de crecimiento del tejido (De Manzoni, 1998).

Con base a lo anterior, proponemos que este modelo con administración de 17β estradiol se apega a lo sugerido para el humano en donde observamos que las alteraciones en el microambiente gonadal durante el desarrollo son altamente sensibles a hormonas y a factores parácrinos (Rajpert, 2006). Además al comparar la histología testicular y la presencia de células atípicas en el conejo, logramos simular la IGCNU en el humano, expresando las mismas alteraciones histomorfológicas y la expresión de los mismos marcadores proteicos.

La búsqueda de receptores para EGF u otro factor de diferenciación en el gonocito, sería una estrategia a futuro que probablemente podría dirigir una ruta de diferenciación.

Aunque nuestros resultados no fueron los esperados al administrar el EGF, nos permitió establecer preguntas sobre la acción del EGF en el tejido testicular de conejo, ya que a pesar de contar con información sobre éste, Kurokawa *et al.*, (2005), solo hace una evaluación del desarrollo de la espermatogénesis en tejido testicular de ratas con CO unilateral inguinal, a las cuales administra Flutamida para regenerar la CO, posteriormente les practica la OX a las 10 semanas y administra el EGF; 14 días después realiza la orquiectomía y solo evalúa maduración epitelial a través del Índice de Jonsen y apoptosis. A pesar de que en su estudio, las ratas no presentan CO bilateral intraabdominal y tampoco desarrollan en la edad adulta la IGCNU, Kurokawa *et al.*, (2005), reportan que la administración del EGF, promovió significativamente la maduración de la espermatogénesis en comparación con la OX por si sola. Además de que el EGF redujo la incidencia de la apoptosis de las células germinales, aunque mencionan que los receptores para EGF están presentes en células sustentaculares y no en células germinales; por lo tanto el EGF estaría estimulando a las células germinales a través de las células sustentaculares. También mencionan que el ajuste de temperatura en el testículo al realizar la OX, podría ser un factor importante en la recuperación de la espermatogénesis y la disminución de la incidencia de la apoptosis.

Además de las diferencias en el modelo utilizado, reportan la administración de Flutamida para generar ratas con CO, sin embargo, en nuestro estudio utilizamos 17β -estradiol, generando una marcada diferencia entre nuestros modelos y los resultados obtenidos, ya que se sabe que la Flutamida es un antiandrógeno, que probablemente no genera alteraciones en el descenso testicular y el 17β -estradiol que es un compuesto con actividad estrogénica y es considerado como disruptor endócrino, por lo que impide el descenso testicular y que además probablemente genere alteraciones directas sobre diversos tipos celulares incluyendo a los gonocitos, impidiendo la diferenciación del mismo.

En nuestro estudio, propusimos la administración de EGF para inducir la diferenciación del gonocito a espermatogonia. Sabemos que dicho proceso es complejo y no se cuenta con información suficiente. Kurokawua *et al.* (2005), proponen al EGF en combinación con la OX como posible factor para revertir alteraciones histológicas en los tejidos testiculares. Además sugieren que el EGF juega un papel importante en la regulación de la espermatogénesis provocando efectos intracelulares a través de receptores de superficie

celular localizados en células sustentaculares, intersticiales y mioides y no están presentes en los gonocitos. Con base en nuestros resultados, sugerimos que la acción del EGF no logró inducir la diferenciación del gonocito, esto debido a que probablemente el EGF no es suficiente para estimular a las células sustentaculares, para que ésta libere factores de diferenciación al gonocito o probablemente el gonocito no tenga los receptores para recibir factores de diferenciación, quizás porque sigue expresando algunos factores de pluripotencialidad como POU5F1 y c-Kit.

Sin embargo otros autores como Wunsch *et al.* (2004), demuestran la presencia de receptores para EGF, denominado Eps8. Este receptor se expresa en gonocitos, células de intersticiales y sustentaculares en ratas neonatas. Sin embargo, en el conejo no se ha descrito la presencia de estos receptores y aunque en nuestro trabajo asumimos que el comportamiento era similar al de la rata, nuestros resultados reflejan que probablemente este receptor no exista o está alterado. Es posible que la ventana de tiempo en el cual el receptor podría activarse se limite al periodo de diferenciación del gonocito y se inactive posteriormente cuando se establece la IGCNU. El conejo es una especie poco estudiada, en cuanto al desarrollo neonatal y la expresión de proteínas, porque es importante determinar si esta especie cuenta con receptores para el EGF ya que Wunsch *et al.*, reporta dos isoformas del receptor Eps8 como son p97 eps8 y p68 eps8.

Finalmente nosotros sugerimos que en el conejo con IGCNU, existen receptores para EGF en los gonocitos, en células sustentaculares, intersticiales o células mioides y probablemente el EGF no logra la diferenciación a espermatogonia debido a que sus receptores están inactivos o debido a que la acción indirecta del EGF sobre las células de sustentaculares, intersticiales y mioides, no son suficientes para activar vías de señalización involucradas en este proceso de diferenciación. Además de que probablemente se requiera de una mezcla de factores de diferenciación como AcR, PDGFGF, EGF, NCAM SCF entre otros que podrían estar actuando conjuntamente y de manera simultánea.

En estudios previos realizados por Tonelli y Sorof (1980), demostraron en epitelio mamario *in vitro*, que la administración de EGF se logra un estadio de pre-diferenciación a las células en cultivo. Estos resultados confirman que el EGF es un elemento importante para lograr la diferenciación de células del epitelio mamario, para nuestro estudio

probablemente sería necesario identificar si el EGF induce la diferenciación de los gonocitos *in vitro*, ya que bajo estas condiciones probablemente el EGF podría administrarse exclusivamente a gonocitos aislados y ser una herramienta más para el estudio del papel del EGF sobre la diferenciación de los gonocitos

Es importante hacer mención que requerimos de más estudios para determinar el papel del EGF sobre la diferenciación de los gonocitos, sin embargo contribuimos con el conocimiento de que la OX por sí sola favorece la diferenciación del gonocito, dato que no había sido reportado hasta la fecha y que reafirma la necesidad de la XO como un factor de reducción para el desarrollo de la IGCNU y cáncer testicular a futuro.

8. Conclusión

La OX por si sola favorece la diferenciación de los gonocitos, reduce algunas alteraciones identificadas en la IGCNU y disminuye la inmunopositividad a POU5F1, evitando probablemente el riesgo de malignización de gonocitos a futuro.

En nuestro estudio, la administración del EGF no favoreció la diferenciación de los gonocitos. Sin embargo, se requieren más estudios sobre el papel del EGF en la diferenciación de los gonocitos.

Referencias

Alberts P., Albrecht W., Algaba F., Bokemeyer C., Cohn-Cedermark G., Fizazi K., Horwich A., Laguna M. P. (2008) Testicular Cáncer. *Eur Urol*; 53 (3): 478-96, 497-513.

Almstrup K., Høi-Hansen C. E., Wirkner U., Blake J., Schwager C., Ansorge W., Nielsen J. E., Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E., Leffers H. (2004) Embryonic stem cell like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res*; 64: 4736–4743.

Barthold J. S., Kumasi-Rivers K., Upadhyay J., Shekarriz B., Imperato-Mcginley J. (2000) Testicular position in the androgen insensitivity syndrome: implications for the role of androgens in testicular descent. *J Urol*. 164 (2): 497-501. Review.

Basciani S., De Luca G., Dolci S., Brama M., Arizzi M., Mariani S., Rosano G., Spera G., Gnessi L. (2008) Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology*; 149:6226-6235.

Biermann K., Klingmüller D., Koch A., Pietsh T., Shorle H., Buttner R., Zhou H. (2006) Diagnostic value of markers M2A, OCT3/4, AP-2gamma, PLAP and c-KIT in the detection of extragonadal seminomas. *Histopathology*; 49 (3): 290-7.

Blomhoff, R. (1994) Vitamin A in health and disease. R. Blomhoff, editor. Macel Dekker, Inc., New York. 677.

Brinster R. L. (2002) Germine stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, 21; 296 (5576): 2174-6.

Bray F., Richiardi L., Ekbom A., Pukkala E., Cuninkova M., Moller H. (2006) Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. *Int J Cancer* 2006; 118: 3099–3111.

Buehr M., McLaren A., Bartley A., Darling S. (1993) Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Dev Dyn*;198: 182–189.

Campoy Lechuga J. L. y Sancho Lechuga A. M. (2001). Estudio funcional del eje hipotálamo-hipófisis-somatotrofo. *Pediatric End Met*; 14: 377-382.

Castejón Casado J., Jiménez Alvarez C., Alaminos Mingorance M., Valladares Mendias J. C., Fernández Valdés R. (2000) Metaanálisis Cáncer criptorquidia. *Cir Pediatric*. 13: 92-6.

Castrillon D. H., Quade B. J., Wang T. Y., Quigley C., Crum C. P. (2000) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15; 97(17):9585-90.

Ciaputa R., Nowak M., Madej J. A., Poradowski D., Janus I. (2014). Inhibin-a, E-cadherin, calretinin and Ki-67 antigen in the immunohistochemical evaluation of canine and human testicular neoplasms. *Histochem Cytobiol*, 52(4):326-34.

Cortés T. L., Viguera Villaseñor R. M., Chávez Saldaña M. D., Gutierrez Pérez O., Castañeda Rojas J. C. Diferenciación de gonocitos en niños con criptorquidia y su asociación con el carcinoma *in situ* testicular Tesis para Obtener el grado de Lic. En Biología, FES-Z. Ciencias, UNAM, 2012.

De Manzoni G. (1998) Study on KI-67 Immunoreactivity as a Prognostic Indicator in Patients with Advanced Gastric Cancer. Universidad de Verona, Italia.

Díaz Valdés N., Comendador M. A., Sierra L. M. (2010). Mus308 processes oxygen and nitrogen ethylation DNA damage in germ cells of *Drosophila*. *J. Nucleic Acids*.

Edelman G. M. Crossin K. L. (1991) Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Ann Rev Biochem*; 60:155-190.

Fernández Castillo A. L., Esteban Paredes R. M., Cruz Vargas V., Hierro Ruiz C., Betancor Lasso C. E., Beltrán Gomez O. D., Pérez Garrido J. I. (2013). Cáncer Testicular y Criptorquidia. Mito o realidad. *Cir Pediatr*, 26-98-101.

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

Furness E. L. Ross A., Davis T. P. King G. C. (1998) A hydrophobic interaction site for lysosome binding to polyethylene glycol and model contact lens polymers. *Biomaterials*. 19 (15): 1361-9.

García Alvarez Virginia (2012). Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J. of Pineal Research*; 54 (4), 373-380.

Garner M., Turner M. C., Ghadirian P., Krewski D. (2005) Epidemiology of testicular cancer: an overview. *In J Cancer*; 116: 331-339.

Garner M., Turner M. C., Ghadirian P., Krewski D., Wade M. (2008) Testicular cancer and hormonally active agents. *Toxicol Environ Health B Crit Rev*;11:260-275.

Gaskell T. L., Esnal A., Robinson L. L., Anderson R. A. and Saunders P. T. (2004) Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod*; 71:2012–2021.

Ginsberg M., Grewal R., Heelan R. (2007) Lung Cancer. *Radiology Clinics N Am*; 45: 21-43.

Giulli G., Tomljenovic A., Labrecque N. (2002) Murine spermatogonial stem cells: targeted transgenes expression and purification in an active state. *EMBO Rep* 3:753-759.

Giwercman A., Muller J., Skakkeboek N. E. (1988) Cryptorchidism and testicular neoplasia. *Horm Res*;30: 157–163.

Giwercman A., Bruun E., Frimodt-Moller C., Skakkebaek N. E. (1989) Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol*; 142:998–1001.

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

Golash A., Parker J., Ennis O., Jenkis B. J. (2000) The interval of development of testicular carcinoma in patient with previously demonstrated testicular microlithiasis. *J Urol*. 163 (1): 239.

GLOBOCAN (2012) Testis cancer incidence and mortality worldwide in 2008. <http://globocan.iarc.fr>.

Hoei-Hansen C. E., Nielsen J. E., Almstrup K., Hansen M. A., Skakkebaek N. E., Rajpert-DeMeyts E., Leffers H. (2004) Identification of genes differentially expressed in testes containing carcinoma in situ. *Mol Hum Reprod*; 10: 423–431.

Hoei-Hansen C. E., Almstrup K., Nielsen J. E., Brask Sonne S., Graem N., Skakkebaek N. E., Leffers H., Rajpert-De Meyts E. (2005) Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopatologu*; 47:48-56.

Holm L. Berg C., Brunstrom B., Ridderstrale Y., Brandt I. (2001) Disrupted carbonic anhydrase distribution in the avian shell gland following in ovo exposure to estrogen. *Arch Toxicol*; 75 (6): 362-8.

Honecker F., Stoop H., de Krijger R. R., Lau Y-F. C., Bokemeyer C. and Looijenga L. H. (2004) Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol*; 203:849–857.

Howell, J. McC., J. N. Thompson, and G. A. J. (1963) Histology of the lesions produced in the reproductive tract of animals fed a diet deficient in vitamin A alcohol but containing vitamin A acid. I. The male rat. *J. Reprod. Fertil*. 5:159-167.

Huang X. Y., Guo X. J., Shen J., Wang Y. F., Chen L., Xie J., Wang N. L., Wang F. Q., Zhao C., Huo R., Lin M., Wang X., Zhou Z. M., Sha J. H. (2008) Construction of a proteome profile and functional analysis of the proteins involved in the initiation of mouse spermatogenesis. *J Proteome Res*;7(8):3435-46.

Hutson T. E., Bukouski R. M., Cowey C. L., Figlin R., Escudier B., Sternberg C. N. (2010) Sequential use of targeted agents in the treatment of renal cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 77 (1): 48-62.

INEGI, (2007) Estadísticas vitales; Base de datos.

Ikeda G., Isaji S., Chandra B., Watanabe M., Kawarada Y. (1999) Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer;* 15; 86 (8): 1396-405.

Ishii T., Matzuki S., Luchi Y., Okada F., Toyosaki S., Tomita Y., Ikeda Y., Fujii J. (2005). Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic. Res.* 39, 697-705.

Jones T. D., Ulbright T. M., Eble J. N., Cheng L. OCT4: A sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Cancer Res,* 15, 10 (24).8544-7.

Jørgensen N., Rajpert-De Meyts E., Graem N., Müller J., Giwercman A. and Skakkebaek N. E. (1995b) Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest;* 72:223–231.

Kastner, P., M Manuel, and P. Chambon. (1995a) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life. *Cell.* 83:859-869.

Keshet E., Lyman S. D., Williams D. E., Anderson D. M., Jenkins N. A., Copel and N. G., Parada L. F. (1991) Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J;*10: 2425–2435.

Kistensen D. M., Sonne S. B., Ottense A. M., Perrett R. M., Nielsen J. E., Almstrup K., Skakkebaek N. E., Leffers H., Meyts E. R. (2008) Origin of pluripotent germ cell tumors: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol;*288:111-118.

Koshimizu, U. M. Watanabe, and N. Nakatsuji. (1995) Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. *Dev. Biol.* 168:683-685.

Kurokawa S., Koyima Y., Mizuno K., Nakane A., Hayashi Y., Kohri K. (2005) Effect of epidermal growth factor on spermatogenesis in the cryptorchidism rat *J Urol,* 174:2415-2419.

Leissner J., Filipas D., Wolf H. K., Fisch M. (1999) The undescended testis: considerations and impact on fertility. *BJU Int;*83:885-891.

Liu S., Semenciw R., Waters C., Wen S. W., Mery L. S., Mao Y. (2000) Clues to the a etiological heterogeneity of testicular seminomas and non-seminomas: time trends and age-period-cohort effects. *International J Epidemiol;* 29: 826–831.

Ling-Hong L. I., Williams F., Jester J. R., Joanne Moanne M. Orth. (1998) Expression of 140-kDa Neural Cell Adhesion Molecule in Developing Testes In Vivo and in Long-Term Sertoli Cell-Gonocyte. *Cocultures Journal of Andrology.* Vol. 19. No. 3. American Society of Andrology.

Looijenga L. H. de Leeuw H., van Oorshot M., van Gurp R. J., Stoop H., Gillis S. J., de Gouvela Brazao C. A., Weber R. F., Kirkels W. J., van Dijk T., von Lindern M., Valk P., Lajos G., Olah E., Nesland J. M., Fossa S. D., Oosterthus J. W. (2003) Stem cell factor receptor (c-KIT) cordon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ cell tumours. *Cancer Res.* 15;63 (22): 7674-8.

Marnett L. J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis;* 21 (3): 361-70.

Matsui Y., Toksoz D., Nishikawa S., Nishikawa S., Williams D., Zsebo K., Hogan B. L. (1991) Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture *Nature;* 353:750–752.

Mitchell R. T., Cowan G., Morris K. D., Anderson R. A., Fraser H. M., Mckenzie K. J., Wallace W. H. B., Kelnar C. J. H., Saunders P. T. K., Sharpe R. M. (2008) Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human *Hum Reprod;* 23:2755-2765.

Michael D. J., Daugherty S., Santos A., Ruby B. C., Kalns J. E. (2011) Fatigue biomarker index: an objective salivary measure of fatigue level. *Accid Anal Prev.*68-73.

Moller H. (2001) Epidemiological studies of testicular germ cell cancer. Thames Cancer Registry, Kings College. London; P. 1-87.

Moore, A. and Morris, I. D. (1993) The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. *J. Endocrinol*, 138:107.

Moss A. R., Osmond D., Bacchetti P., Torti F. M., Gurgin V. (1986) Hormonal risk factors in testicular cancer. A case-control study. *Am J Epidemiol*;124:39–52.

Nielsen J. E., Kristensen D. M., Almstrup K., Jørgensen A., Olesen I. A., Jacobsen G. K., Horn T., Skakkebaek N. E., Leffers H., Rajpert-De Meyts E. (2011) A novel double staining strategy for improved detection of testicular carcinoma in situ cells in human semen samples. *Andrologia*. Apr; 44(2):78-85.

Nistal M., Paniagua R., Riestra M. L., Reyes-Mugica M., Cajaiba M M. (2007). Bilateral prepubertal testicular biopsias predict significance of cryptorchidism-associated mixed testicular atrophy, and allow assessment of fertility. *American Journal of Surgical Pathology* 31 1269-1275.

Orejón de Luna G., Aizpurua Galdeano P. et al. (2007). La criptorquidia debe tratarse antes de la pubertad para evitar el cáncer testicular. *Evid*

Pauls K., Jager R., Weber S., Wardelmann E., Koch A., Büttner R., Schorle H. (2005). Transcription factor AP2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. *Int Journal Cancer*; 115:470-477.

Prenti G. C., Zago S. Lusa M., Campioni P., Mannella P. (2007). Association between testicular microlithiasis and primary malignancy of the testis: our experience and review of the literature. *Radiol Med*, 112 (4):588-96.

Rajpert-De Meyts E., Hanstein R., Jørgensen N., Græm N., Vogt P. H. and Skakkebaek N. E. (2004) Developmental expression of the POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod*;19: 1338–1344.

Rajpert-De Meyts E. (2006) Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*;12: 303-323.

Rothschild G., Sottas C. M., Kissel H., Agosti V., Manova K., Hardy M. P. and Besmer P. A. Role for c-Kit receptor signaling in Leydig cell steroidogenesis. *Biol. Reprod*; 69 (3):925-32, 2003.

Schöler H. R., Hatzopoulos A. K., Balling R., Suzuki N. and Gruss P. (1989) A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*; 8:2543–2550.

Sharpe R. M. (2006) Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*;20(1):91-110.

Sonne S. B., Almstrup K., Dalgaard M., Juncker A. S., Edsgard D., Ruban L., Harrison N. J., Schwager C., Abdollahi A., Huber P. E., Brunak S., Gjerdrum L. M., Moore H. D., Andrews P. W., Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E., Leffers H. (2009) Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res.* 15;69(12):5241-50.

Spencer Sweetland S., Gonzalez Berrington A. (2003). A meta –analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *J. Cancer*; 89(3):519-23.

Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E., Main K. M. (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*;16: 972–978.

Sordoillet C., Chauvin, M. A., Peretti E. de Morera, A. M., and Benahmed M. (1991) Epidermal growth factor directly stimulates steroidogenesis in primary cultures of porcine Leydig cells: actions and sites of action. *Endocrinology*, 128:2160. -

Strohmeier T., Peter S., Hartmann M., Munemitsu S., Ackermann R., Ullrich A. and Slamon D. J. (1991a) Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res*;51:1811–1816.

Strohmeier T., Reese D., Press M., Ackerman R., Hartmann M. and Slamon D. (1995) Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J Urol*;153: 511–515.

Stoop H., Honecker F., Van de Geijn G. J. M., Gillis A. J. M., Cools M. C., de Boer M., Bokemeyer C., Wolfenbittel K. P., Drop S. L. S., de Krijger R. R., N. Dennon, Summersgill B., McIntyre A., Shipley J., Oosterhuis J. W., Looijenga L. H. (2008) Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *J Pathol*; 216: 43–54.

Thompson, N. J. J., McC. Howell and G. A. J. (1964) Vitamin A and reproduction in rats. *Proc. R. Soc. Ser B*. 159:510-535.

Thuillier R., Wang Y., Culty M. (2003) Prenatal exposure to estrogenic compounds alters the expression pattern of platelet-derived growth factor receptors α and β in neonatal rat testis: identification of gonocytes as targets of estrogen exposure. *Biol Reprod*; 68: 867–880.

Tonelli Q. J. y Sorof S. (1980). Epidermal growth factor requirement for development of cultured mammary gland. *Nature*, 285 (5762):250-2.

Tovar-Guzmán V. J., López-Antuñano F. J., Rodríguez-Salgado N. (2005) Tendencias recientes de la mortalidad por cáncer pulmonar en México, 1980-2000. *Revisión Salud Pública*: 17 (4): 254-62.

Travis W. (2002) Pathology of lung cancer. *Clinics in chest Medicine*; 23: 65-6.

Valko M. Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *J. Biochem Cell Biol*; 39 (81):44-84.

Velasco Ruiz (2010). Estudio mediante ecografía convencional y doppler de las lesiones extra e intratesticulares más frecuentes. *J. Clin* 32 :32.

Vigueras V. R. M., Moreno M. N. A., Reyes T. G., Merchant L. H. (2004) Gubernacular fibroblasts express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with hCG. *Urological Research* 32(6):386-90.

Vigueras Villaseñor R. M., Montelongo Solis P., Chávez Saldaña M. D., Gutierrez Pérez O., Silva Arteaga M., Castañeda Rojas J. C. (2013). Postnatal testicular development in Chinchilla rabbit. *Acta Histochemica*.

Virtanen H. E., Bierknes R., Cortes D., Jorgensen N., Rajpert-De Meyts E., Torzón A. b.v. Thorup J., Main K. M. (2007) Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr*;96:611-616.

Wahab-Wahlgren A., Martinelle N., Holst M., Jahnukainen K., Parvinen M., Söder O. (2003) EGF stimulates rat spermatogenesis DNA synthesis in seminiferous tubule segments in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, 201:39.

Wang Y., Culty M. (2007). Identification and distribution of a novel platelet-derived growth factor receptor beta variant: effect of retinoic acid and involvement in cell differentiation. *Endocrinology* 148: 2233-2250.

Wu J., Jester W. F. Jr, Laslett A. L., Meinhardt A., Orth J. M. (2003) Expression of a novel factor, short-type PB-cadherin, in Sertoli cells and spermatogenic stem cell of the neonatal rat testis. *J endocrinol*;176:381-391.

Wu X., Schmidt J. A., Avarbock M. R., Tobias J. W., Carlson C. A., Kolon T. F., Ginsberg J. P., Brinster R. L. (2009) Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106:21672-21677.

Wunsch A., Strothmann K., Simoni M., Gromoll J., Nieschlag E., Luetiens C. M. (2004). Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) expression in maturing testis. *Journal Andrology* (3); 195-203.

Yamaguchi S., Kimura H., Tada M., Nakatsuji N., Tada T. (2005) Nanog expresión in Mouse germ cell development. *Gene Exp. Patterns*;5:639-346.

Yamamoto K., Tojo A., Aoki N., Shibuya M. (1993). Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Jpn Journal Cancer Res.* 84: 1136-1144.

Yasuda H., Galli S. J., Geissler E. N. (1993). Cloning and functional analysis of the mouse c-kit promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 191:893-901.

Yong Mark T. Beckmann R. Toye A. M., Tanner M. J. (2008). Red-cell glycophorin- A-band 3 interactions associated with the movement of band 3 to the cell surface. *J. Biochemical.* 350, 53-60.

Zeeman A. M., Stoop H., Boter M., Gillis A. J. M., Castrillon D. H., Oosterhuis J. W. and Looijenga L. H. J. (2002) VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. *Lab Invest*; 83:159–166.

Zivkovic D., Bica D. T., Hadziselmovic F. (2007) Relationship between adult dark spermatogonia and secretory capacity of Leydig cells in cryptorchidism. *BJU International* 100 1147-1149.

ANEXOS

ANEXO I: Clasificación del grado de angustia/dolor y stress, sufrido por roedores y lagomorfos de experimentación.

ligero	Moderado	considerable
Ganancia de peso reducida	Perdida de peso mayor al 20%	Perdida de peso mayor al 25%
Alrededor del 40 al 75% de lo normal del consumo de agua y alimento por un periodo de 72 hrs	Consumo de agua y alimento menor al 40% de lo normal por un periodo de 72 hrs	Consumo de agua y alimento menor al 40% de lo normal por un periodo de 7 días, o bien inapetencia total (anorexia) por 72 hrs.
Piloerección (erizado del pelo) parcial	Piel evidente por piloerección marcada	Zonas evidentes de piel y/o piloerección marcada con otros signos de deshidratación como piel reseca.
Animales decaídos pero con respuesta de comportamiento normal a los estímulos	Animales decaídos con respuesta de comportamiento a los estímulos deprimida	Sin respuesta a provocación o actividad externa
Interacción visual sostenida (peer)	Sin interacción visual (peer)	
Acurrucado (posición en ovillo) transitorio sobre todo después de la dosificación o manejo	Acurrucado intermitente	Acurrucado persistente, algunas veces con temores.
Vocalización transitoria	Vocalización intermitente en respuesta a provocación (chillidos)	Sufrimiento -vocalización no provocada (quejidos)
Descarga oculo-nasal transitoria (signo típico de cromorinodaciorrea en roedores)	Descarga oculo-nasal persistente	Descarga óculo nasal persistente y copiosa.
Respiración normal	Patrón de resuello intermitente-respiración anormal	Dificultad respiratoria
Tremores transitorios	Tremores intermitentes	Tremores persistentes
Sin convulsiones	Convulsiones intermitentes	Convulsiones persistentes
Sin postración	Postración transitoria (menor a 1hr)	Postración prolongada (por mas de 1 hr)
Sin auto mutilación	Sin auto mutilación	Auto mutilación

Report of the European
Laboratory Animals Science Associations (FELASA)
Working Group on Pain and Distress
London, November 1992.

ANEXO II INDICE DE MADURACIÓN EPITELIAL

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