



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EL CERDO DOMÉSTICO COMO MODELO ALTERNATIVO PARA EL
ESTUDIO DE LA CRIPTORQUIDIA EN HUMANOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

NATALIA PATRICIA MAGALLÓN CERVERA

ASESORES:

DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	4
1.1 Descenso testicular.....	4
1.2 Criptorquidia.....	7
1.3 Neoplasia intratubular de células germinales.....	10
1.4 Papel de los gonocitos en el desarrollo de neoplasia intratubular de células germinales.....	13
1.5 Propuesta del cerdo como modelo animal.....	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	16
III. HIPÓTESIS.....	18
IV. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
5.1 Estrategia general.....	19
5.2 Formación de grupos experimentales.....	21
5.3 Orquiectomías.....	23
5.4 Procesamiento de muestras.....	25
5.4.1 Procesamiento en EPON.....	25
5.4.2 Análisis histológico.....	26
5.4.3 Procesamiento en parafina.....	27

5.4.4	Inmunohistoquímica para determinar proteínas de pluripotencialidad (PLAP, c-Kit, Sall4 y POU5F1).....	27
5.4.5	Densidad celular positiva a PLAP, c-Kit, Sall4 y POU5F1	28
5.4.5	Análisis estadístico	29
VI.	RESULTADOS	30
6.2	Análisis anatómico.....	30
6.3	Análisis histológico	32
6.4	Análisis inmunohistoquímico	38
6.4.1	Densidad celular de c-Kit.....	38
6.4.2	Densidad celular de PLAP	41
6.4.3	Densidad celular de Sall4	43
VII.	DISCUSIÓN.....	46
VIII.	CONCLUSIÓN.....	54
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	55
X.	ANEXO	62

RESUMEN

MAGALLÓN CERVERA NATALIA PATRICIA “El cerdo doméstico como modelo alternativo para el estudio de la criptorquidia en humanos”

Asesores:

Dr. Oscar Gutiérrez Pérez

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Debido a la falta de modelos animales que desarrollen criptorquidia (CO) de manera natural, se buscó determinar si el cerdo doméstico puede funcionar como modelo alternativo para el estudio de dicha patología en humanos; por lo cual, se realizó una descripción histológica de testículos no descendidos y testículos sanos (grupo testigo) obtenidos de 32 cerdos de diferentes edades (1, 3, 6 y 10 meses). Se evaluó la expresión de proteínas de pluripotencialidad c-Kit, PLAP, Sall4 y POU5F1; las cuales han sido documentadas en pacientes con CO. Se encontró diferencia significativa entre grupos en cuanto al área de los túbulos seminíferos, con reducción en los testículos no descendidos. Se observó mayor cantidad de alteraciones histológicas en testículos no descendidos, determinadas mediante la evaluación del Índice de maduración del epitelio seminífero (índice de Johnsen) y el Índice Histopatológico. El análisis inmunohistoquímico mostró diferencia significativa con mayor positividad celular en el grupo con CO. Se observó que en dos de los individuos con CO de 10 meses hubo una completa atrofia del tejido con involución de túbulos seminíferos. La expresión inmunohistoquímica para POU5F1 fue muy clara en la mayoría de las muestras aunque no en la totalidad; contradiciendo

lo descrito por Goel y cols. (2008), quienes documentaron la ausencia en la expresión de estos receptores en cerdos. Con el fin de superar lo anterior y evitar interpretaciones subjetivas, se sugiere fortalecer el estudio mediante su comprobación o descarte con PCR en tiempo real, incrementando el número de animales evaluados. Así como, realizar pruebas complementarias para determinar otras similitudes existentes entre el cerdo con CO y lo documentado en humanos. Dados los resultados, sin ser aún determinantes, refuerzan la importancia de profundizar estudios en modelos animales alternativos. Los cuales permitan estudios comparativos y traslacionales como apoyo primordial en la investigación biomédica.

ABREVIATURAS

CES: Ciclo del Epitelio Seminífero

c-Kit: Receptor del factor de Células *Stem*

CO: Criptorquidia

CT: Cáncer testicular

Grupo testigo: Animales que no presentan criptorquidia

NICG: Neoplasia intratubular de células germinales

OMS: Organización Mundial de la Salud

PLAP: Fosfatasa alcalina placentaria

POU5F1: Factor de transcripción que regula la pluripotencialidad de gonocitos

SALL4: Factor de transcripción, recibe su nombre por sus siglas en inglés Sal-Like Protein 4

TCG: Tumor de células germinales

I. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

1.1 Descenso testicular

Durante la gestación los testículos se localizan en posición abdominal y se encuentran sostenidos por el Ligamento suspensor craneal (LSC) y el gubernáculo (Foresta y cols., 2008). Con la finalidad de permitir el desarrollo normal de las células germinales postnatales, el testículo tiene que atravesar un complejo proceso de descenso hacia el escroto (Hutson y cols., 2013);

En vida embrionaria este proceso involucra diferentes estructuras anatómicas y procesos hormonales (Bonney y cols., 2008).

El LSC ayuda a mantener a los testículos unidos a la parte posterior del abdomen, cercanos a los riñones; en cuanto al gubernáculo, se sabe que esta estructura conecta a los testículos a través del epidídimo hacia el futuro canal inguinal y posteriormente a la base del escroto (Foresta y cols., 2008) y se conforma histológicamente de tejido conectivo y fibras de músculo liso (Costa y cols, 2002).

El descenso testicular consta de dos etapas llamadas transabdominal e inguinoescrotal. En individuos sanos puede ocurrir antes o poco después del nacimiento; sin embargo, el momento en el que esto ocurre varía dependiendo de la especie (Amann y Veeramachaneni, 2007).

En el caso del cerdo, la primera etapa ocurre entre los días 12 al 16 de la gestación y la segunda durante los días 65 al 113 de la gestación. Por lo que el

descenso testicular se concluye antes del nacimiento (Amann y Veeramachaneni, 2007).

En el caso del humano la primer etapa inicia durante la semana 12 a la 16 de gestación y la segunda inicia alrededor de la semana 26 y concluye en la 32 de la gestación (Cortés-Trujillo, 2015).

Fase Transabdominal

Bajo influencia de la Hormona parecida a la insulina 3 (INSL3), secretada por las células de Leydig, se genera un sobrecrecimiento del gubernáculo (Figura 1), mediante la cual se comienza a abrir el canal inguinal, permitiendo que el testículo descienda hasta posición inguinal (Bonney y cols., 2008).

Bajo el efecto de los andrógenos (A) secretados por las células de Leydig y de la Sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS), producida por las células sustentaculares; se genera la regresión del LSC y los conductos de Müller involucionan para permitir este proceso (Bonney y cols., 2008).

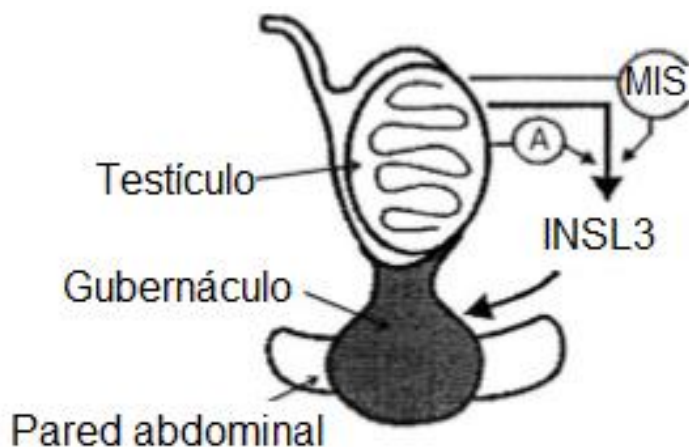


Figura 1.- Esquema de la Fase Transabdominal del descenso testicular, en donde se observa un sobrecrecimiento del gubernáculo gracias a la influencia del INSL3 y la regresión del LSC y la involución de los conductos de Müller bajo la influencia de andrógenos A y de la MIS (Adaptado de Bonney y cols., 2008).

Fase Inguinoescrotal

Bajo efecto de los Andrógenos se masculiniza el nervio genitofemoral (NGF), el cual secreta al péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés). Dicho péptido estimula la contracción del músculo estriado del gubernáculo, lo que lleva a los testículos al escroto (Bonney y cols., 2008) (Figura 2).

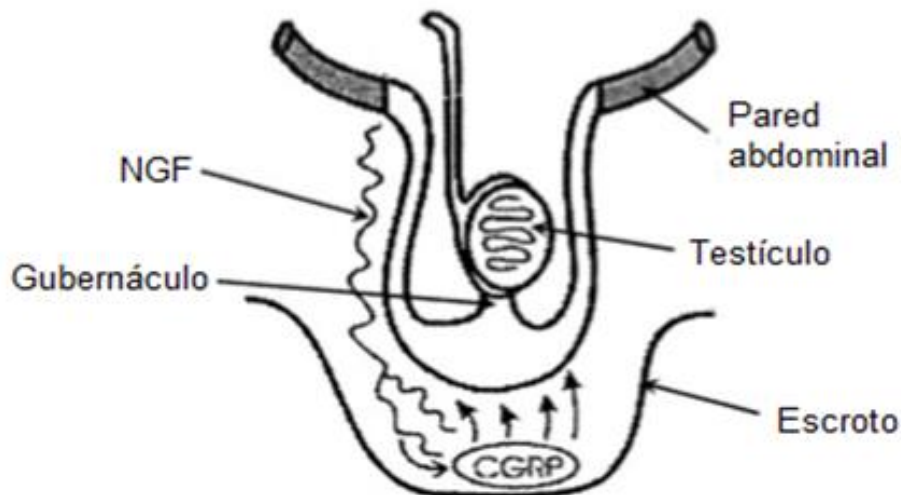


Figura 2.- Esquema de la Fase inguinoescrotal del descenso testicular, en donde se observa como el NGF secreta CGRP, estimulando al gubernáculo para permitir el descenso del testículo hacia el escroto (Adaptado de Bonney y cols., 2008)

Cualquier alteración durante el descenso testicular puede generar la interrupción del mismo, dando origen a la patología conocida como criptorquidia (CO).

1.2 Criptorquidia

La CO, también conocida como testículo no descendido; es una patología que involucra una serie de condiciones en la cual uno o dos testículos no se encuentran en la posición escrotal normal (Bonney y cols., 2008); en base a esto se puede clasificar en unilateral o bilateral, así como en palpable y no palpable (Virtanen y cols., 2007). Sin embargo, existe otra clasificación que hace referencia a la posición testicular; la cual puede ser abdominal, inguinal, supra escrotal y ectópica (Virtanen y cols., 2007). Algunos autores afirman que la CO unilateral en humanos es cuatro veces más frecuente que la bilateral (Gottlieb y cols., 2009).

Es considerada la anomalía congénita más frecuente en el varón y un reconocido factor de riesgo para el desarrollo de infertilidad y cáncer testicular (Gottlieb y cols., 2009). Un individuo con CO tiene de 7 a 10 veces mayor probabilidad de desarrollar cáncer testicular que un individuo sano (Amann y Veeramachaneni, 2007).

Existen datos estadísticos que señalan una incidencia de CO a nivel mundial entre el 2-8% de los nacimientos (Virtanen y cols., 2007), otros informes señalan que va del 1-4.5% de los nacimientos (Abaci y cols., 2013).

Estas diferencias estadísticas se deben probablemente a que se trata de una patología de incidencia variable de una población a otra. Se sabe que el país con la incidencia más elevada hasta el momento es Dinamarca con un 9% de nacimientos al año y el país con la incidencia más baja es Finlandia con únicamente un 2.4% de casos nuevos anualmente (Ferguson y cols., 2013).

Actualmente no se cuenta con datos epidemiológicos precisos acerca de la incidencia de CO en México; sin embargo, por comunicación directa se sabe que el Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud informa un total de 110 casos de niños con testículos no descendidos registrados al año (información obtenida por comunicación directa).

Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, en el año 2015 hubo en México un total de 2,078,235 nacimientos (INEGI, 2015); asumiendo que el 50% de los individuos son niñas y que la incidencia a nivel mundial de la CO es del 4%, se puede determinar que durante ese año se presentaron un total de 41,565 casos nuevos de niños con CO a nivel nacional.

Etiología de la CO

Ha sido atribuida a factores genéticos (como trisomías), hormonales (defectos de andrógenos) o anatómicos (alteraciones en el gubernáculo) principalmente (Wensing, 1973; Shikone y cols., 1994; Ivell y Hartung, 2003). Existen otros factores que han sido considerados como predisponentes para el desarrollo de CO. Algunos de estos son nacimientos prematuros, bajo peso al nacimiento, consumo de tabaco y alcohol por parte de la madre e historial de familiares con CO; entre otros (Fantasía y cols., 2015).

Fisiopatología

Esta patología afecta macroscópicamente a los testículos, los cuales desarrollan una marcada disminución del volumen y peso testicular. (Bernal-Mañas y cols., 2005).

Microscópicamente se llegan a observar también importantes alteraciones que afectan directamente la espermatogénesis; ya que se presentan cambios histológicos (Cuadro 1) a nivel de la túnica propia, el tejido intersticial, los vasos sanguíneos y el epitelio; afectando por completo la función testicular (Zhang y cols., 2002)

Principales Alteraciones Histológicas en Testículos con CO
Epitelio con una menor cantidad de células sustentaculares
Menor proliferación celular que en testículos sanos
Reducción significativa en el número y diámetro de los túbulos seminíferos
Disminución en el número de espermatogonias

Cuadro 1.- Alteraciones histológicas presentes en individuos con CO (Adaptado de Pinart y cols., 1999; Zhang y cols., 2002 y Bernal-Mañas y cols., 2005).

Consecuencias a largo plazo

Los efectos a largo plazo como consecuencia de CO consisten en que dicha patología es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer testicular y de infertilidad en etapa adulta (Alberts y cols., 2008; Foresta y cols., 2008).

1.3 Neoplasia intratubular de células germinales

La Neoplasia intratubular de células germinales (NICG), es la lesión postpuberal preinvasiva asociada con el tumor de células germinales (Berney y cols., 2016). Se le considera una lesión preneoplásica tanto de seminomas como no seminomas y no se le ha encontrado asociación con teratomas ni tumores de saco vitelino en humanos (Berney y cols., 2016).

El cáncer testicular de células germinales desarrollado a partir de NICG es considerado como una anomalía de origen fetal y se asocia con otros problemas reproductivos masculinos como hipospadias y CO. Durante las últimas décadas ha habido un incremento significativo en la presentación de tumores de células germinales a nivel mundial, particularmente en países de población caucásica (Skakkebaek, 2016). Se considera que algunos factores ambientales como los disruptores endócrinos podrían estar involucrados en su desarrollo (Weir y cols., 2000 y Hardel y cols., 2006). En el caso de la NICG y de seminomas se ha comprobado que hay expresión de marcadores como POU5F1 (OCT3/4), Sall4, c-Kit, NANOG, entre otros; los cuales son de utilidad para su diagnóstico de neoplasias. Estos marcadores, coinciden con las proteínas que expresan las células germinales primordiales y gonocitos embrionarios (Looijenga y cols., 2011) y deben reflejar una tendencia a la baja

durante su diferenciación a espermatogonias entre los primeros seis a nueve meses postnatales en el humano (Vigueras y cols, 2015) y los primeros dos meses de edad en el cerdo (Hughes y Varley, 1980). Esto sugiere que los tumores testiculares se originan gracias a la permanencia de este tipo de células embrionarias en testículos adultos (Ferguson y cols., 2013).

Estudios recientes para comprender la biología molecular de los tumores testiculares han llevado a la identificación de diferentes marcadores inmunohistoquímicos para NICG (Emerson y Ulbright, 2010).

Histológicamente se han encontrado algunas alteraciones asociadas a testículos con NICG (Cuadro 2, Figura 3).

Alteraciones histológicas presentes en individuos con NICG
Presencia de gonocitos en animales adultos
Células en mitosis
Plegamiento y engrosamiento de la membrana basal de los túbulos seminíferos
Microlitiasis y microcalcificaciones
No se observa espermatogénesis en el centro por un proceso de degeneración celular en túbulos y cordones seminíferos
Desplazamiento de los núcleos de células sustentaculares

Cuadro 2.- Alteraciones histológicas presentes en individuos con NICG (Adaptado de Skakkebaek, 2016) (Figura 3).

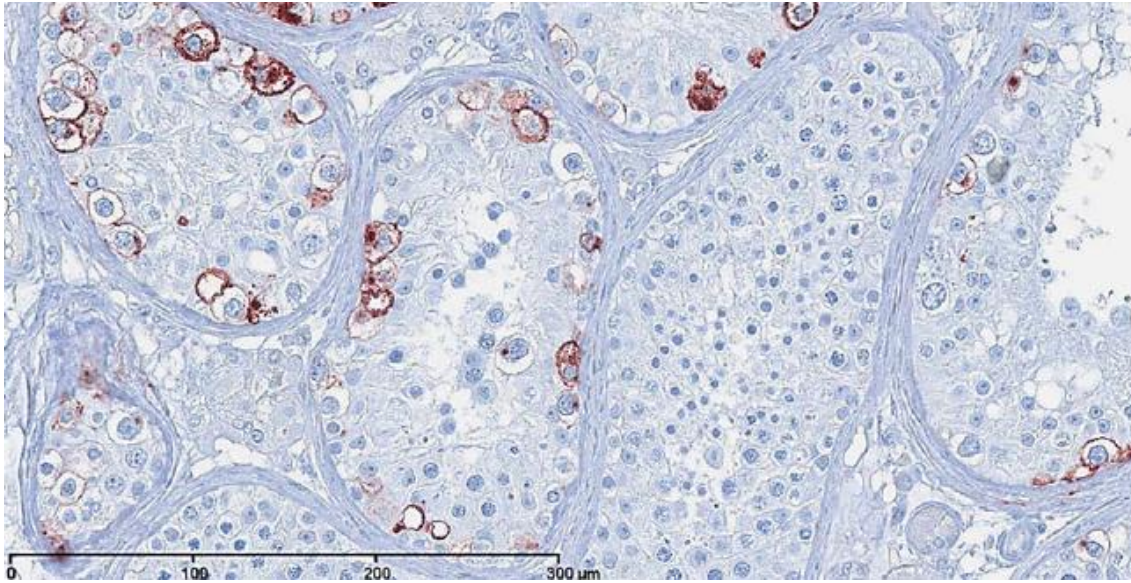


Figura 3.- Corte de testículo con múltiples túbulos seminíferos con NICG en una inmunohistoquímica contra el anticuerpo PLAP en color rojo. Se observan las principales alteraciones histológicas características de NICG tales como Presencia de gonocitos en animales adultos, Células en mitosis, Plegamiento y engrosamiento de la membrana basal y Desplazamiento de los núcleos de células sustentaculares. No se observa espermatogénesis en el centro por un proceso de degeneración celular en túbulos y cordones. (Tomado de Skakkebaek, 2016.)

1.4 Papel de los gonocitos en el desarrollo de neoplasia intratubular de células germinales

La localización de los testículos a nivel escrotal en un descenso testicular normal, permitiría una adecuada transformación de gonocitos a espermatogonias inmaduras; así como el inicio de la espermatogénesis en un futuro. En el caso de algunos individuos con CO esto no sucede de esa manera, por lo que se ha considerado al gonocito como la célula responsable de la malignización que se presenta dentro del túbulo seminífero (Gottlieb y cols., 2009, Viguera y cols., 2016).

Estas células son las primeras encargadas del desarrollo de la línea germinal del macho y en el testículo neonatal son las únicas células germinales dentro del túbulo seminífero; además se sabe que expresan proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación que se regulan a la baja con la edad, en el humano sano en los primeros 8 meses y en el cerdo en los primeros 2 meses de vida (Hughes y Varley, 1980). Las proteínas expresadas en los gonocitos, tales como PLAP (Skakkebaek y cols., 1987), c-Kit, POU5F1 y muchas otras; coinciden con las proteínas diagnósticas para NICG y han demostrado el origen fetal de esta lesión (Rajpert-De y cols., 2006, Sonne y cols., 2009 y Van der Zwan y cols., 2015).

Se ha documentado sobre la presencia de gonocitos en el cerdo hasta los 2 meses de edad (Hughes y Varley, 1980), momento en el que se considera que concluyen su diferenciación a espermatogonias.

1.5 Propuesta del cerdo como modelo animal

La Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; señala que un animal de laboratorio es un animal usado en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza.

Los animales de laboratorio y la experimentación animal conforman los cimientos y las condiciones base para las ciencias, en especial en la investigación médica. La experimentación con animales ha ayudado al desarrollo de vacunas, trasplantes, transfusiones sanguíneas, diálisis, técnicas quirúrgicas y pruebas de fármacos; entre muchas otras aportaciones (Momox, 2011).

Los modelos animales más utilizados en la actualidad para el estudio de patologías reproductivas son los lagomorfos y los murinos, a los cuales se les induce CO quirúrgicamente o mediante el uso de tratamientos farmacológicos. Esto debido a que la prevalencia de la enfermedad es del 2% en los conejos y en los roedores no existen informes de que se haya manifestado de manera natural (Amann y Veeramachaneni, 2007). Dicho lo anterior, se puede suponer que el inducir una patología de manera artificial podría estar afectando los resultados obtenidos durante el estudio de la misma; por lo que sería importante poder contar con un modelo de estudio que desarrolle CO de manera natural y pueda permitir su estudio con la finalidad de entender mejor su desarrollo e incluso generar nuevas técnicas de prevención y diagnóstico oportunos.

Una especie que desarrolla esta patología de manera natural con una prevalencia del 1 al 11% son los perros (Amann y Veeramachaneni, 2007). Anteriormente ha sido documentado que los perros desarrollan tumores de células germinales (TCG) de manera espontánea (Scully y Coffin, 1952), siendo clasificados en dicha especie como seminoma espermatocítico.

En el caso del cerdo, la CO se desarrolla de manera natural, con una prevalencia del 12% (Amann y Veeramachaneni, 2007). Además, existen datos que señalan que dicha especie desarrolla NICG (Wekerle y cols., 1987; Teankum y cols., 2008). Sin embargo en su momento la falta de herramientas como las técnicas actuales de genética molecular no permitieron generar suficiente evidencia que impactara para la justificación o descarte de su uso en investigación biomédica. Es por eso que en el presente estudio se propuso explorar la alternativa de que el cerdo podría ser un modelo animal confiable para el estudio de esta patología reproductiva en el humano.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La importancia de la CO radica en su alta incidencia en humanos, y en que aun cuando no existen datos estadísticos exactos en México, se considera un grave problema de salud ya que puede generar problemas de fertilidad a largo plazo e incrementar el riesgo de desarrollo de neoplasia intratubular de células germinales.

El manejo clínico de estos pacientes consiste en la corrección quirúrgica sin manejo farmacológico que prevenga los problemas en la fertilidad o el riesgo de NICG. Por tanto, se requiere realizar investigaciones que garanticen o reduzcan estos riesgos a largo plazo. Para lo cual se requiere contar con un adecuado modelo animal que se apegue a las características histológicas e inmunohistoquímicas de la CO humana.

Los principales modelos animales que se utilizan en la actualidad para el estudio de la CO en humanos son inducidos quirúrgicamente o farmacológicamente. Estudios realizados sobre CO de manera inducida o experimental resultan esenciales para comprender los efectos de una elevación en la temperatura testicular; sin embargo, no resultan apropiados para comprender las alteraciones testiculares en machos adultos con CO espontánea (Bernal- Mañas y cols., 2005).

Por lo que el presente estudio pretendió aprovechar las características del cerdo, ya que es una especie que desarrolla esta patología de manera natural y con una frecuencia relativamente alta. Debido a lo anterior y a sus similitudes

con el humano en términos de morfología reproductiva que comprenden morfología espermática, estructura del gubernáculo, estructura testicular y momento del descenso testicular, entre otros aspectos, se espera que el cerdo sea un mejor modelo para el estudio de alteraciones desarrolladas a consecuencia de la CO (Bernal- Mañas y cols., 2005).

Con la confirmación en la viabilidad de dicho modelo, se pretende apoyar a futuro en el campo de la medicina preventiva, pues podría ser utilizado en estudio y comprensión de la relación existente o no de la CO y la generación de NICG, la descripción de los mecanismos de desarrollo de esta patología, el desarrollo de diagnósticos cada vez más oportunos y un posible tratamiento poco invasivo.

III. HIPÓTESIS

Por ser el cerdo una especie que desarrolla CO de manera natural y espontánea, que además comparte semejanzas morfofuncionales reproductivas con el humano; es posible que esta especie se utilice como modelo alternativo para el estudio de esta patología.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir en cuatro diferentes edades el desarrollo histológico, así como la expresión de proteínas de pluripotencialidad en testículos de cerdo con CO, con la finalidad de proponer al cerdo doméstico como un modelo animal alternativo para el estudio de CO en humanos.

4.2 Objetivos particulares

Determinar en cuatro edades de corte:

- a) Las alteraciones histológicas presentes en los testículos de cerdos con CO y su semejanza con la histopatología descrita en la literatura sobre el testículo criptorquídico humano.
- b) Si la maduración del epitelio seminífero se ve afectada en el testículo del cerdo con CO y si se comporta como en el humano.
- c) La presencia de biomarcadores inmunohistoquímicos en el testículo del cerdo con CO y si la expresión de estos es semejante a lo documentado en humanos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia general

El presente proyecto se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), el cual se encuentra ubicado en el Km. 2 de la carretera Jilotepec-Corrales, en Jilotepec, Estado de México y en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la torre de investigación “Dr. Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría, ubicado Av. Del IMAN, No. 1. Colonia Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530. México, D.F.

Con base al cálculo bioestadístico para el tamaño de la muestra, se determinó emplear a un total de 32 cerdos machos, 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 CICUAE-FMVZ/UNAM.

Se alojaron a los animales en los corrales habituales de la granja, los cuales varían dependiendo de la edad del animal.

Animales de 1 mes: Se encontraban en el área del destete. La iluminación consistió en luz natural, el agua de bebida fue por bebedero de chupón proveniente de las tuberías del Centro, la alimentación fue basada en concentrado comercial de tipo preiniciador. También se les suplementó con yogurt natural hecho en la granja. Los animales permanecieron en esa área

durante cinco semanas.

Animales de 3, 6 y 10 meses: Se ubicaron en los corrales del área de engorda del CEIEPP. Dichos corrales fueron de piso de concreto con *slats* para el manejo de excretas. Los *slats* contaban con una separación de 18 mm de anchura de la abertura y 80 mm de anchura de la vigueta. En estos corrales se les agrupó por edad y peso. El número de animales en cada corral también varió dependiendo de la edad y el peso de los mismos. La iluminación consistió en luz natural, el agua de bebida fue recibida por bebedero de chupón proveniente de las tuberías del Centro, la alimentación consistió de alimento balanceado elaborado en la granja de acuerdo a la etapa de crecimiento (iniciador, crecimiento, desarrollo y finalización).

Las medidas de los corrales y de las diferentes áreas dentro de la granja eran muy variables, sin embargo, se respetaron los requerimientos de espacio sugeridos por la legislación en bienestar animal de la comunidad económica europea (Cuadro 3).

Se comenzó identificando a los cerdos de la granja que cumplieron con las características necesarias para formar parte del presente proyecto. La selección se realizó en base al sexo (machos) y a la presencia de CO en animales no castrados. Una vez seleccionados los individuos, no se les tuvo en un aislamiento específico y se ubicaron en los corrales habituales y junto con el resto de los animales de la granja; teniendo anotado en los registros el número de corral en el que se encontraban los sujetos de estudio. Lo anterior con la finalidad de mantener el control sobre el momento en el que los animales cumplieron las edades requeridas para el experimental y para poder realizar el procedimiento quirúrgico en el momento establecido.

Peso (kg)	Espacio por animal (m²)
Hasta 10	0,16 (0,15)
10-20	0,28 (0,20)
20-30	0,36 (0,30)
30-50	0,50 (0,40)
50-85	0,72 (0,55)
85-110	0,85 (0,65)

Cuadro 3.- Medidas de los corrales para cerdos según el peso de los animales. (Tomado de la legislación en bienestar animal de la comunidad económica europea).

5.2 Formación de grupos experimentales

Se formaron 2 grupos principales, uno de animales con CO y un grupo testigo con individuos sanos. Dentro de cada uno de estos 2 grupos, hubo 4 animales de cada de una de las siguientes 4 edades:

1 mes, 3 meses, 6 meses y 10 meses; con un total de 32 animales (Cuadro 4).

Se requirió de 4 animales de cada edad en cada grupo, debido a que dicho número se considera como el mínimo estadístico para una experimentación confiable.

Las edades fueron elegidas en base a que a los 2 meses de edad los gonocitos del cerdo se diferencian a espermatogonias, por lo que se necesita contar con animales de una edad previa a dicha diferenciación (1 mes) y de una edad posterior (3 meses), los animales de 6 y 10 meses tienen una espermatogénesis establecida por lo que con su estudio se puede ver el daño testicular ocasionado por la CO, así como la posibilidad de encontrar gonocitos persistentes; por lo que en el caso de encontrarlos, el modelo alternativo para

el estudio de NICG estaría justificado ya que se ha documentado que en el humano con CO los gonocitos no se diferencian a espermatogonias .

EDAD	GRUPO CON CO	GRUPO TESTIGO
1 mes	1c-1	1m-1
	1c-2	1m-2
	1c-3	1m-3
	1c-4	1m-4
3 meses	3c-1	3m-1
	3c-2	3m-2
	3c-3	3m-3
	3c-4	3m-4
6 meses	6c-1	6m-1
	6c-2	6m-2
	6c-3	6m-3
	6c-4	6m-4
10 meses	10c-1	10m-1
	10c-2	10m-2
	10c-3	10m-3
	10c-4	10m-4

Cuadro 4.- Elaboración de grupos experimentales, grupo con CO espontánea y grupo testigo (animales sanos con descenso testicular acorde a la especie). Cada grupo cuenta con 4 animales de cada una de las 4 edades seleccionadas para el estudio; 1, 3, 6 y 10 meses de edad.

5.3 Orquiectomías

Debido a que las instalaciones y el flujo de animales del CEIEPP no lo permitieron, no se restringió agua ni alimento previo al procedimiento quirúrgico.

Se mantuvo a los cerdos en los corrales del CEIEPP agrupados de la manera habitual utilizada en el centro porcino hasta la fecha del procedimiento y en el momento en el que los animales llegaron a las edades requeridas para este estudio se procedió a realizarles la orquiectomía.

Antes de comenzar la cirugía, se pesó a los sujetos de estudio para poder calcular la dosis de los fármacos que se administraron (un preanestésico, anestésico y antimicrobiano con antiinflamatorio).

Una vez calculadas las dosis se llevó a los animales a un corral vacío y previamente lavado con agua y detergente para inicial la tranquilización con Azaperona (Sural®) a una dosis de 2mg/kg vía intramuscular (Sumano H y Ocampo L, 2006). Transcurridos entre 15 y 20 minutos, se revisó el estado de tranquilización del animal y se procedió a su contención mediante el uso de una cuerda de algodón, gracias a esto se logró administrar vía endovenosa el anestésico compuesto por Tiletamina y Zolazepam (Zoletil® 50 o 100) a una dosis de 0.2mL/kg (Sumano H y Ocampo L, 2006). Inmediatamente se comenzó a lavar al animal con agua y detergente en toda el área cercana al sitio donde se realizaría la incisión, para después colocar cloruro de benzalconio 50% (dilución 1%) y embrocar.

Una vez que el paciente se encontró en plano quirúrgico; se comenzó la orquiectomía inguinal con tunicas intactas (testículos retirados con todo y las

túnicas que lo recubren y sin incidir en las mimas), tanto en los testículos del grupo testigo, como en los del grupo experimental. Dicha técnica quirúrgica fue elegida con la finalidad de tener la herida lo más alejada posible del trayecto de las heces. Para retirar los testículos criptorquídicos fue necesario incidir en cavidad abdominal haciendo una incisión paralela a la línea media, dependiendo del lado donde se encontrara el testículo no descendido.

Una vez extraído el testículo no descendido se suturó con material absorbible (ácido poliglicólico 2-0) cerrando primero fascias y músculos utilizando un patrón de súrgete continuo y puntos en "U" para cerrar la piel. (Tista, 2007).

Terminada la cirugía se administró vía intramuscular un antiinflamatorio esteroideo con antimicrobiano a base de penicilina G y dexametasona (Dexabiopen®) a una dosis de 40,000 UI/kg/día y .5-5mg/kg respectivamente (Sumano H y Ocampo L, 2006) y se dejó a cada cerdo solo en un corral durante las próximas 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se les reincorporó al hato porcino. Se continuó con la administración de antiinflamatorio con antimicrobiano durante los 3 días posteriores a la cirugía. Se tomó en consideración el tiempo de retiro de los fármacos, el cual en este caso fue de 21 días (Sumano H y Ocampo L, 2006) y se reincorporó a los animales al flujo de la granja.

5.4 Procesamiento de muestras

5.4.1 Procesamiento en EPON

Los testículos de cada animal fueron cortados en bloques de aproximadamente 2mm^3 y posteriormente fueron fijados en Karnovsky modificado durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se prosiguió a lavar las muestras cada 30 minutos con buffer de Cacodilatos de sodio al 0.1M, durante 2 horas. Posteriormente se post-fijaron los tejidos durante una hora con Tetróxido de Osmio al 1% (Zelterquist), se realizaron 3 lavados con agua destilada para retirar el post-fijador y posteriormente se continuó con la deshidratación de la muestra; la cual consistió en la utilización de alcoholes sucesivos que iban del 60 al 100%, para finalizar con 4 lavados con óxido de propileno.

Una vez deshidratadas las muestras, se continuó con la impregnación de la resina; para lo cual se inició agregando diluciones de Epon en óxido de propileno hasta llegar a colocarlo en Epon puro. Después de esto se colocaron en un molde y se dejaron en estufa a 60°C para su polimerización.

Para finalizar se realizaron cortes semifinos de $1\mu\text{m}$ de grosor en ultramicrotomo (Leica modelo Ultracut-UTC), se montaron en un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% (SIGMA-ALDRICH, México), posteriormente se les colocó un cubreobjetos para su posterior observación al microscopio.

5.4.2 Análisis histológico

Éste análisis fue realizado por un solo observador con el uso de un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 6.0). Se observaron 30 secciones transversales de tubos seminíferos en los que se determinó:

- 1) El área del epitelio seminífero, con un objetivo de 20x.
- 2) El grado de maduración del epitelio seminífero, mediante el Índice de Johnsen (1970) (Anexo 1); con un objetivo de 60x.
- 3) El índice histopatológico con base en criterios morfológicos normales y bajo los criterios de la OMS, con la finalidad de determinar características histológicas presentes (Anexo 2) con un objetivo de 60x.

En el testículo existen diferentes asociaciones celulares dentro del epitelio germinal, estas asociaciones se clasifican como etapas, las cuales dan origen al Ciclo del Epitelio Seminífero (CES). Cada etapa se caracteriza por diferentes formas del núcleo de las espermatidas y el tipo de divisiones meióticas (Castellanos, G; 2015); con lo que en el caso específico del cerdo se han podido identificar ocho diferentes etapas (Franca y cols., 2005). Por lo que en este estudio y con la finalidad de homogenizar los resultados durante el Análisis histológico, en individuos de 6 y 10 meses de edad, se tomaron en consideración únicamente los túbulos que se encontraban en la etapa 8 del CES, la cual se caracteriza por la presencia de espermatoцитos en paquiteno, espermatidas redondas en fase de capuchón en cuatro capas, espermatidas elongadas y cuerpos residuales (Almeida y cols., 2006).

5.4.3 Procesamiento en parafina

Cada uno de los testículos fue cortado en bloques de aproximadamente 5mm^3 y se fijaron en paraformaldehído al 4% (SIGMA-ALDRICH, México) durante 24 horas. Posteriormente se realizaron lavados con PBS y se colocaron las muestras en el histoquinete para su deshidratación. Una vez que salen del histoquinete se procede a incluirlas en parafina.

Para finalizar, se realizaron cortes de $5\mu\text{m}$ de grosor en el micrótomo (LEICA RM2155) y en montaron en un portaobjetos para su posterior realización de las inmunohistoquímicas.

5.4.4 Inmunohistoquímica para determinar proteínas de pluripotencialidad (PLAP, c-Kit, Sall4 y POU5F1)

Una vez obtenidos los cortes y colocados en los portaobjetos cargados con adherente de Poly-L-lisina, estos se desparafinaron y se inició con el desenmascaramiento de los epítopes utilizando citrato de sodio (BioSB®). Se marcó el contorno alrededor de los tejidos con un lápiz hidrofóbico y se colocaron las laminillas en una cámara húmeda, se lavaron con PBS Twin 20 al 0.1% (Sigma-Aldrin®), se enjuagó con PBS y se incubaron durante 2 horas con BSA al 5%. Una vez transcurrido el tiempo se dejaron incubar los diferentes anticuerpos primarios Monoclonal Mouse Anti-Rat para PLAP, c-Kit y Sall4 Antigen, Clone MIB-5 (Santa Cruz®); diluidos 1:50 en PBS Twin durante 24 horas.

Para POU5F1 se utilizó el anticuerpo primario (Goat Anti-Mouse-HRP Secondary Antibody, PolymerDetection Component (MACH 2 Mouse HRP-

Polymer, BiocareMedicals, Concord, CA, USA, MHRP520 L); diluido 1:50 en PBS Twin durante 24 horas.

A partir de este punto se enjuagó 3 veces con PBS Twin 20 al 0.1% durante 5 minutos entre lavado para todos los anticuerpos y se agregó el anticuerpo biotinilado diluido 1:200 en PBS Twin, se dejó actuar durante 2 horas y posteriormente se enjuagó otras 3 veces con PBS twin. Se agregó el complejo Avidina-HRP Biotinilada (AB) (Vectastain®), el cual se dejó actuar durante 1 hora. Se enjuagaron las muestras una vez más con PBS Twin y se revelaron con diaminobencidina (DAKO, Dinamarca), para finalmente ser contrastadas con hematoxilina-eosina (HE) dejadas secar y montadas con un cubreobjetos.

5.4.5 Densidad celular positiva a PLAP, c-Kit, Sall4 y POU5F1

La densidad celular positiva a las proteínas PLAP, c-Kit, Sall4 y POU5F1; se calculó primero midiendo el área de al menos 30 cortes de túbulos seminíferos y posteriormente determinando el número de células positivas a cada anticuerpo en relación al área los túbulos medidos por medio del sistema de análisis de imágenes (Image- Pro Plus 6.0). Estos resultados fueron expresados en número de células inmunoreactivas/1000 μm^2 , debido a que el número de los túbulos utilizados en la cuantificación celular, dependió de que las suma de las áreas de los túbulos fuera aproximadamente de 1000 μm^2 .

5.4.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de la prueba “T de *student*” con una $p < 0.05$ como diferencia significativa. Los datos se procesaron mediante el programa estadístico Minitab 15.

Metodología: Procesamiento y análisis de muestras

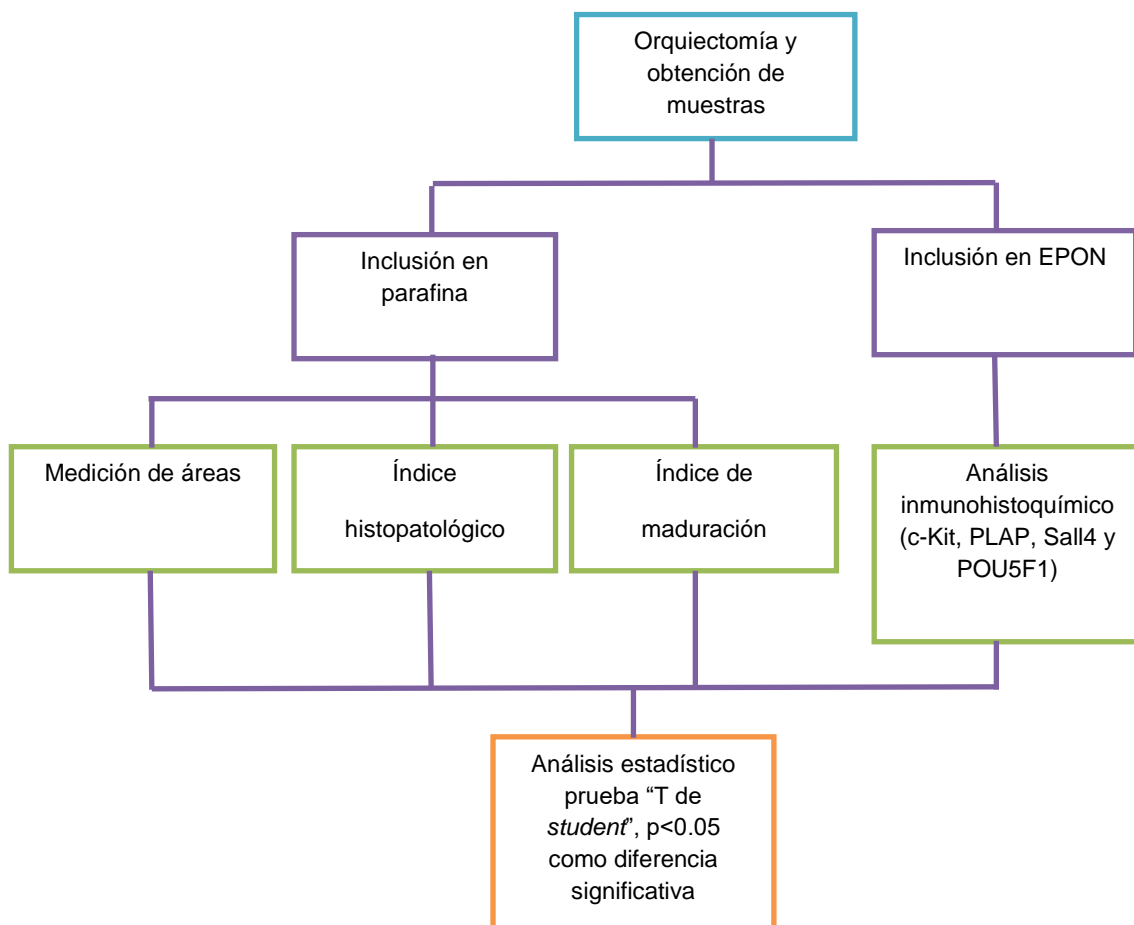


Figura 4.- Esquema que muestra el procesamiento y análisis de las muestras que se tomaron con las 4 edades de corte, tanto del grupo testigo, como de los animales con CO. Una vez que se realizó la orquiectomía y se obtuvieron los testículos, estos se procesaron para su inclusión en EPÓN y parafina. Los resultados fueron evaluados por un análisis estadístico mediante el uso de la prueba “T de *student*”, $p < 0.05$ como diferencia significativa. Los datos se procesaron mediante el programa estadístico Minitab 15.

VI. RESULTADOS

6.2 Análisis anatómico

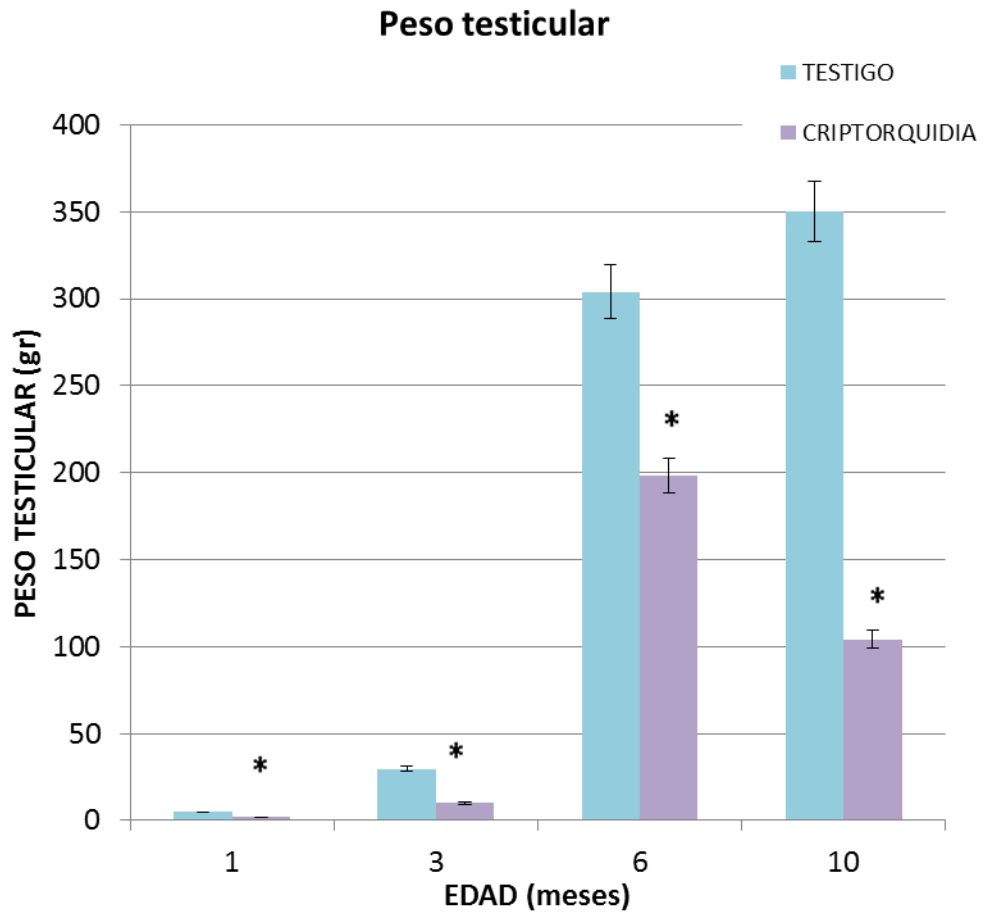
GRUPO TESTIGO

Este grupo mostró ambos testículos perfectamente escrotados y con anatomía testicular acorde a cada edad de corte experimental para esta especie.

GRUPO CON CO

En estos 16 animales uno de los testículos se encontraba en posición abdominal (CO unilateral, abdominal), ya que no hubo descenso testicular. Los testículos con CO presentaban una coloración roja siendo visiblemente más oscura que la del grupo testigo, debido a una congestión del órgano. El testículo contralateral fue observado en posición escrotal.

También se observó una notable disminución en el peso testicular, el cual en los animales de un mes fue del 60.93% menor con respecto al grupo testigo, en los de 3 meses del 74.9% a los 6 meses de edad fue del 34.21% y en los de 10 meses del 70.29%(Gráfica 1).



Gráfica 1.- Peso testicular representado como medias +/- error estándar con $p < 0.05$ al comparar el grupo testigo y el de CO.

6.3 Análisis histológico

GRUPO TESTIGO

En este grupo se observó desarrollo histológico normal correspondiente a los testículos sanos de individuos de 1, 3, 6 y 10 meses de edad. En los testículos de un mes de edad se encontraron gonocitos en fase de migración y algunos en proceso de degeneración. Varios estaban al centro de los cordones seminíferos y otros ya en contacto con la lámina basal. Las células sustentaculares se encontraron desplazadas a la periferia y algunas en fase de citocinesis. El área tubular fue de $3764.81\mu\text{m}^2$ sin ninguna alteración histológica. Los testículos de individuos de 3 meses de edad presentaron gonocitos en proceso de degeneración y en contacto con la membrana basal. El área tubular fue de $9821.74\mu\text{m}^2$.

Se observó el establecimiento de una espermatogénesis completa en los cerdos de 6 y 10 meses de edad. Esta se caracterizó por la presencia de espermátidas elongadas en el ápice del epitelio y espermátidas redondas por debajo. También se observaron espermátocitos distribuidos en dos capas y algunas espermatogonias. Las áreas tubulares fueron de $14557.08\mu\text{m}^2$ y

$27099.43\mu\text{m}^2$ respectivamente a la edad, con un índice de maduración (Johnsen) de 10 y 10 y con un índice histopatológico de 6 y 8 respectivamente, Las alteraciones histológicas consistieron en plegamiento ligero de la membrana basal, descamación y vacuolización principalmente.

GRUPO CON CO

Se observó diferencia ($p < 0.05$) con un área menor en los testículos con CO respecto a los de los individuos testigo (Gráfica 2). También se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el índice histopatológico (Gráfica 3) Presentándose alteraciones como plegamiento abundante de la membrana basal, descamación celular, vacuolización, sincitios celulares, núcleos picnóticos, ausencia de espermáticas y espermatogonias. EL índice de maduración (Índice de Johnsen) (Gráfica 4) indicó que a mayor edad de los individuos, el número de células germinales y sustentaculares disminuyó progresivamente (Figura 5); hasta que en 2 de los animales de 10 meses se observó una atrofia e involución del tejido con desaparición por completo de túbulos (Figura 6).

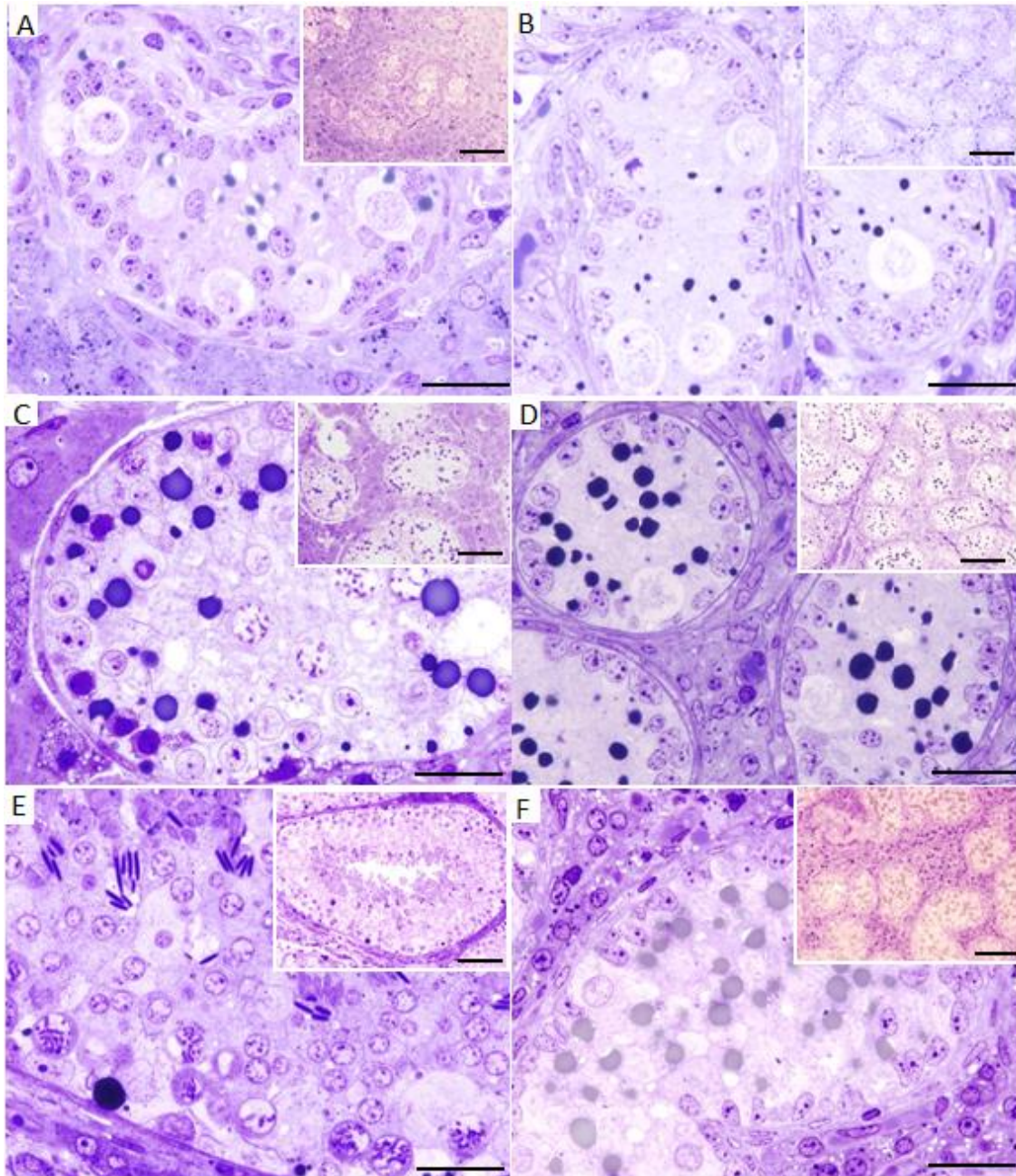


Figura 5.- Tejido testicular de individuos de los grupos Testigo y Experimental (CO) de 1 a 6 meses de edad. **A) Testigo 1 mes de edad**, Gonocitos en proceso de degeneración y migración hacia la periferia. Células sustentaculares a la periferia. **B) CO 1 mes**, Características similares al grupo testigo. **C) Testigo 3 meses**, Los gonocitos en contacto con membrana basal. Presencia de células sustentaculares a la periferia. Presencia de espermatocitos. Células de Leydig con gotas lipídicas **D) CO 3 meses**, Características similares al grupo testigo. **E) Testigo 6 meses**, Espermatogénesis completa. Se observaron cuatro capas de espermatidas redondas en fase de Capuchón, espermatocitos en fase de Paquiteno; características de la etapa 8 del CES. **F) CO 6 meses**, Gran cantidad de gotas lipídicas. Membrana basal (MB) engrosada, hay núcleos de células sustentaculares y células parecidas a gonocitos en apoptosis. Imágenes en microscopía óptica, Azul de toluidina. 200 aumentos. Barras de escala: ___ 1000 μ m² y ____ 100 μ m².

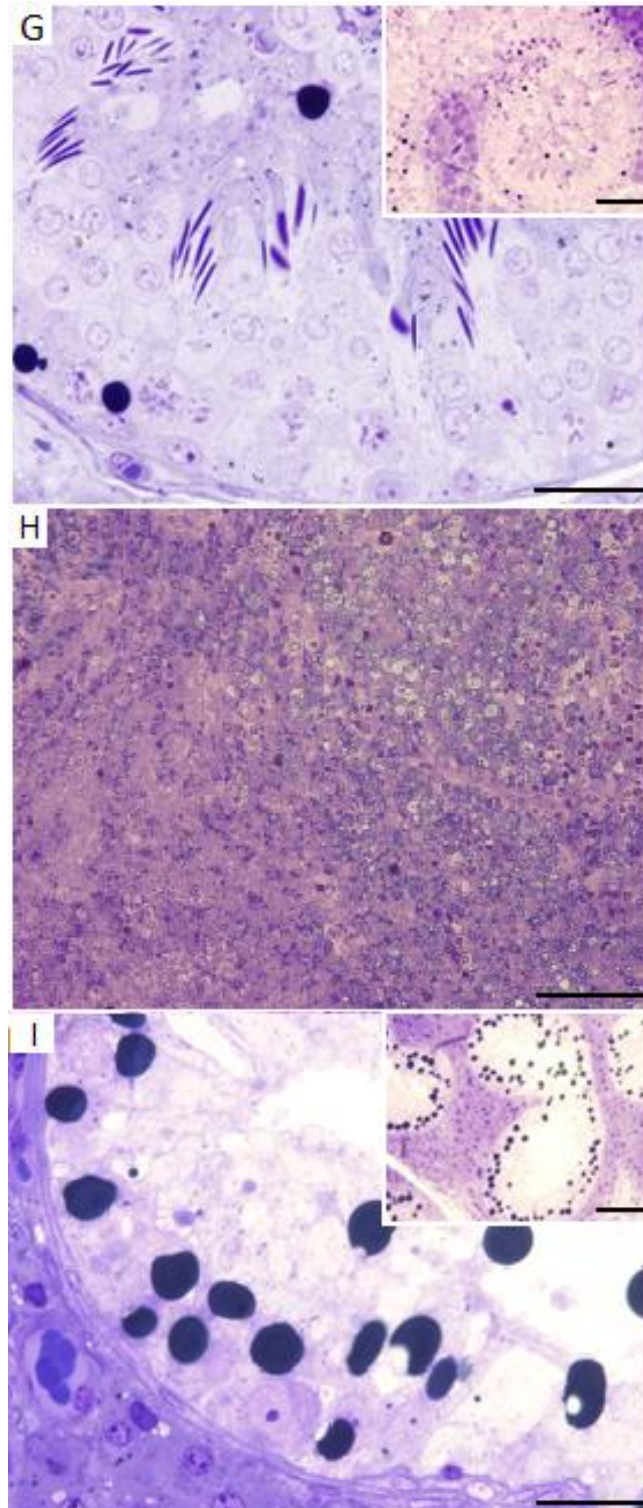
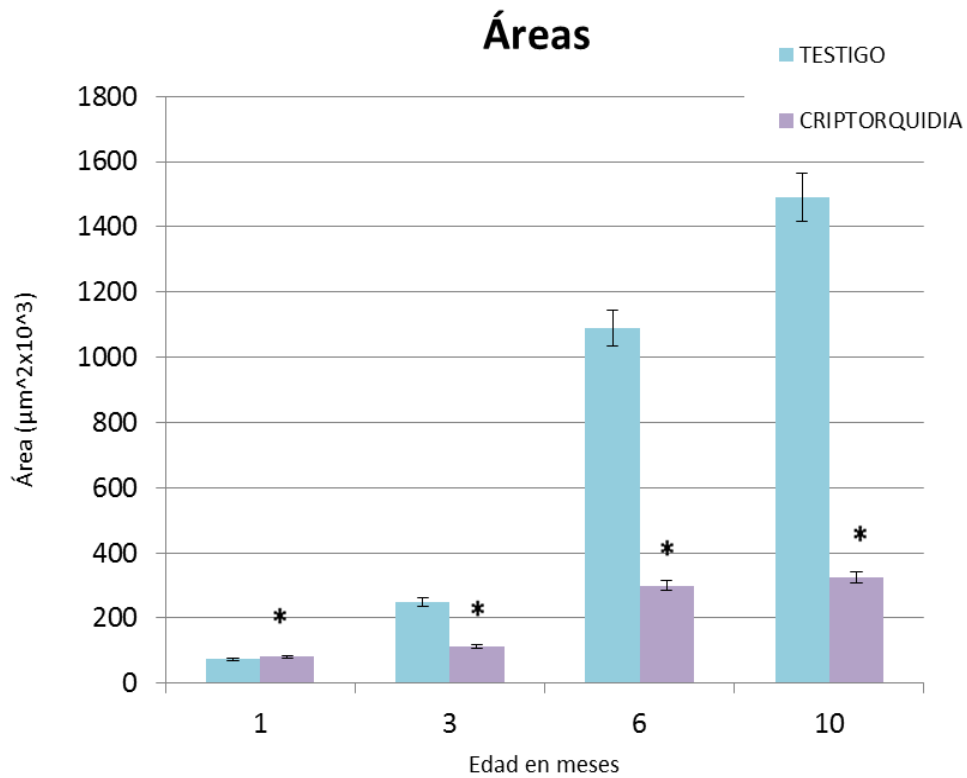
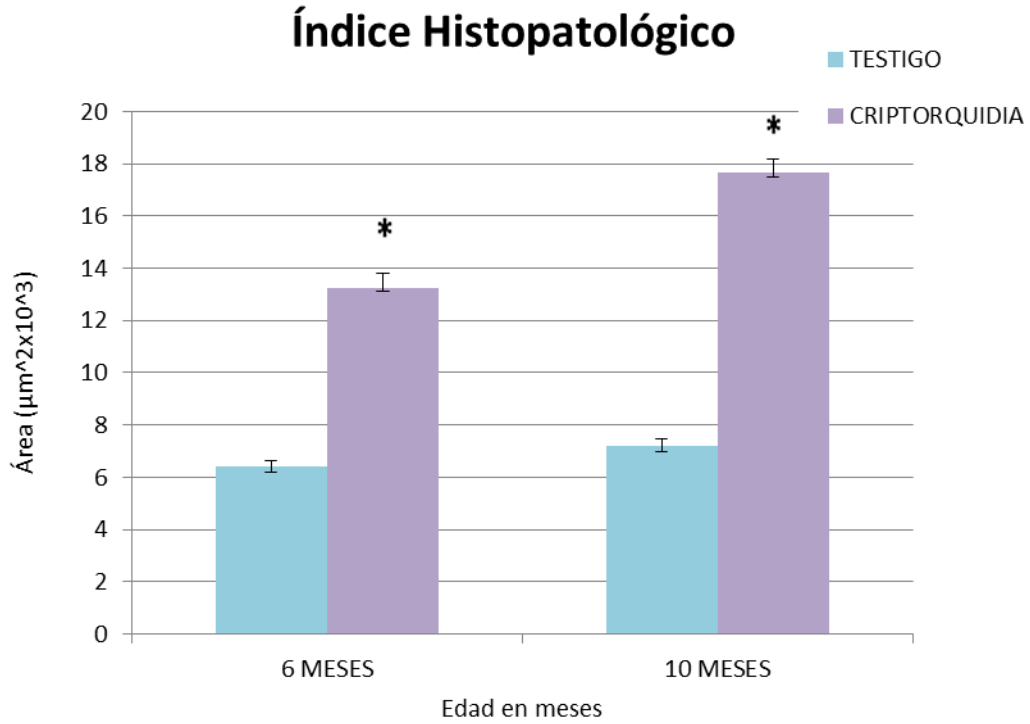


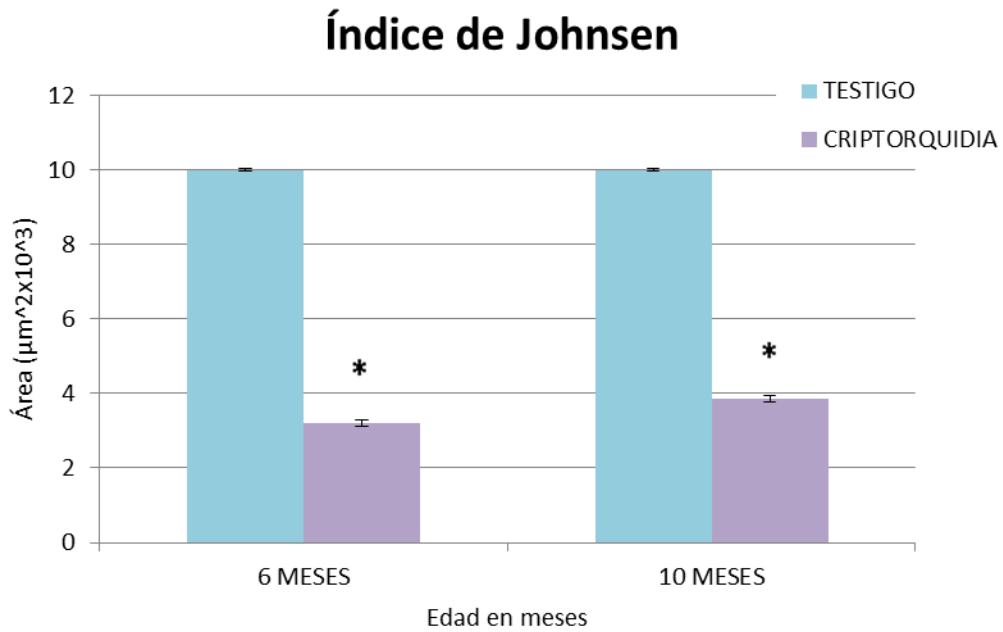
Figura 6.- Tejido testicular en individuos de los grupos Testigo y Experimental (CO) de 10 meses de edad. **G) Testigo 10 meses de edad,** Se observó una espermatogénesis completa con espermátidas elongadas. Gran cantidad de descamación celular y cuerpo residual en la luz de los túbulos. Se observaron cuatro capas de espermátidas redondas en fase de Capuchón, espermatoцитos en fase de Paquiteno; características de la etapa 8 del CES. **H) CO 10 meses,** En dos de los sujetos de estudio se observó una completa atrofia del tejido con una involución de los túbulos seminíferos, ya que no se encontraban presentes. **I) CO 10 meses,** Membrana basal engrosada. Gran cantidad de liposomas en el interior de los túbulos. En la mayoría de los túbulos no hubo presencia de células germinales y en otros se observaron espermatoгонias de manera escasa. Presencia de células sustentaculares y Leydig de manera escasa. Imágenes en microscopía óptica, Azul de toluidina a 20x. Barras de escala: ___ 1000 μ m² y ___ 100 μ m².



Gráfica 2.- Áreas de los túbulos seminíferos representadas como medias \pm error estándar con $p < 0.05$ al comparar el grupo testigo y el de CO de la misma edad.



Gráfica 3.- Índice histopatológico en individuos de 6 y 10 meses de edad, representadas como medias \pm error estándar con $p < 0.05$ al comparar el grupo testigo y el de CO.

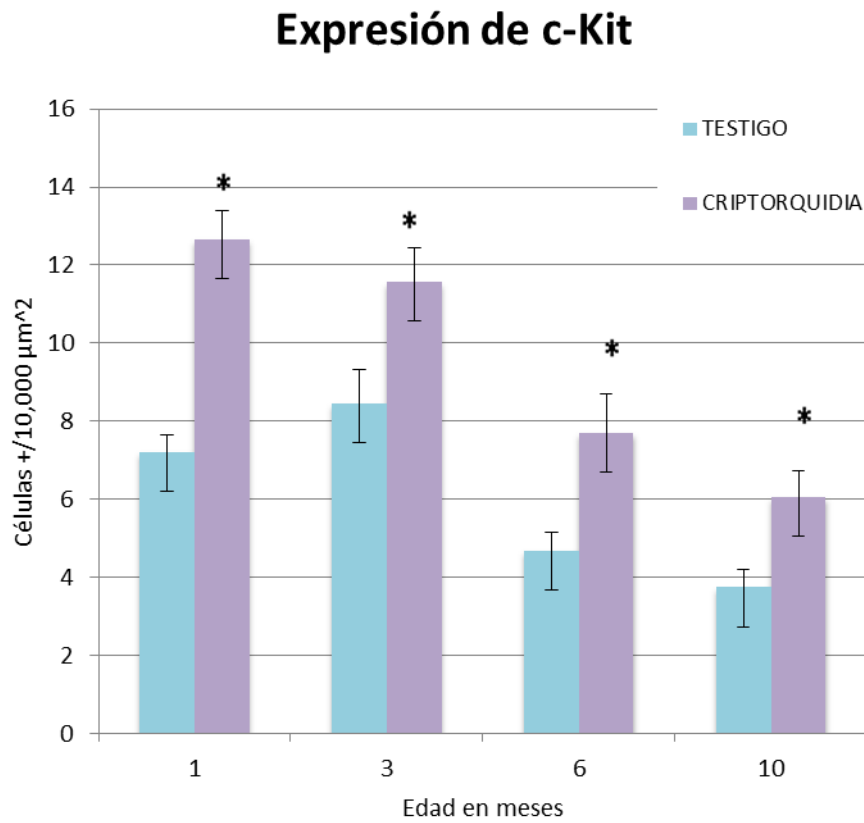


Gráfica 4.- Índice de Johnsen en individuos de 6 y 10 meses de edad, representadas como medias \pm error estándar con $p < 0.05$ al comparar el grupo testigo y el de CO.

6.4 Análisis inmunohistoquímico

6.4.1 Densidad celular de c-Kit

La expresión de este marcador mostró una tendencia a la baja en ambos grupos, siendo mayor ($p < 0.05$) su expresión en los individuos con CO de todas las edades estudiadas (Gráfica 6, Figura 9).



Gráfica 5.- Número de células positivas a c-Kit en relación al área de tubos seminíferos, representados como medias y error estándar. Se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos.

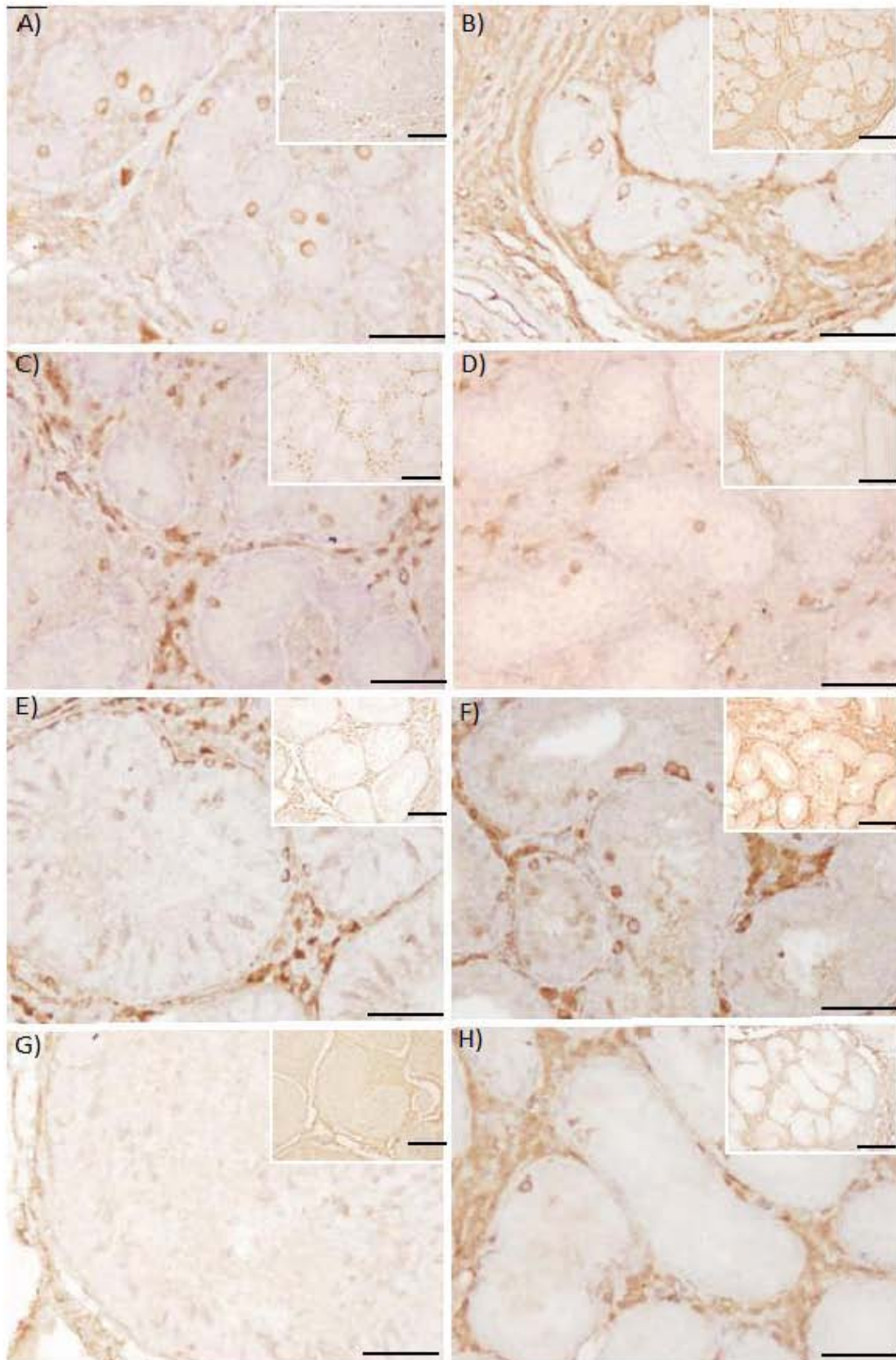


Figura 7.- Imágenes de cortes de testículo con prueba de inmunohistoquímica para determinar expresión de c-Kit en individuos de los grupos Testigo y Experimental (CO) de 1, 3, 6 y 10 meses de edad. **A) Testigo 1 mes de edad, B) CO 1 mes, C) Testigo 3 meses, D) CO 3 meses, E) Testigo 6 meses, F) CO 6 meses G) Testigo 10 meses H) CO 10 meses de edad.** Barras de escala: $\underline{\hspace{1cm}}$ 1000 μm^2 y $\underline{\hspace{1cm}}$ 100 μm^2 .

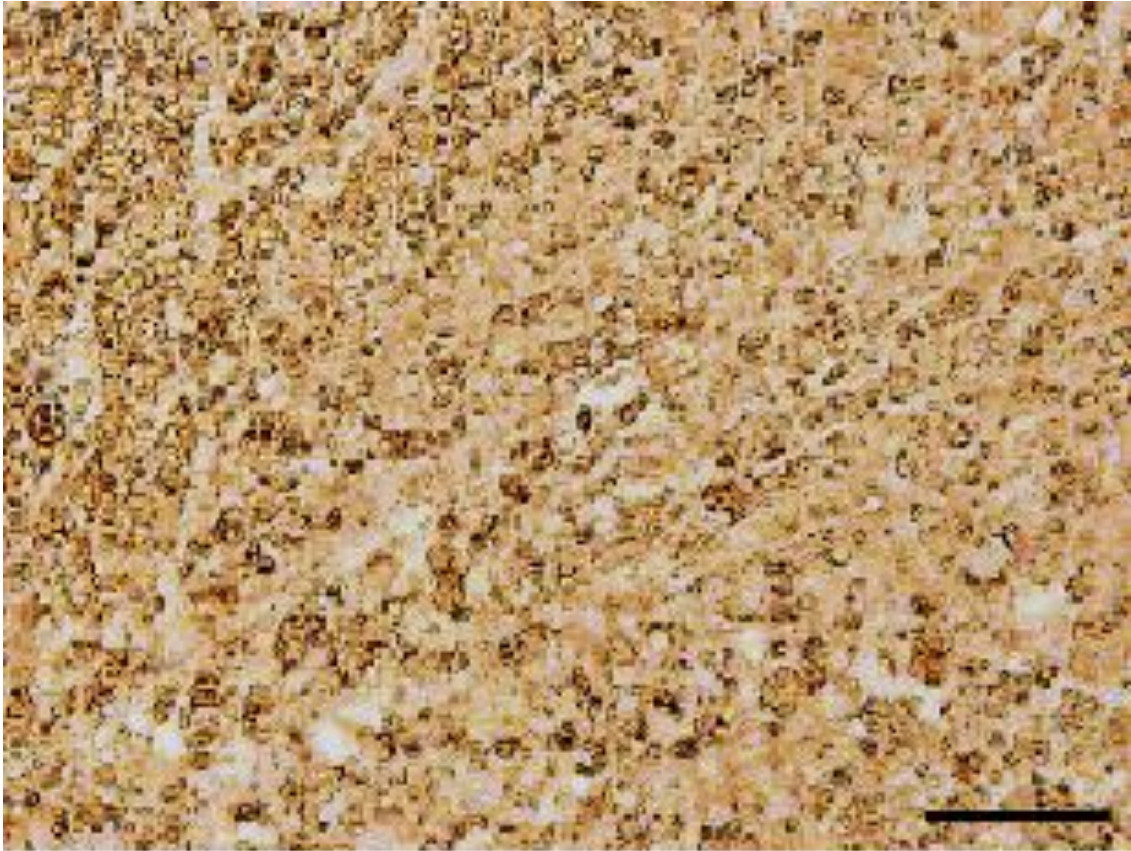
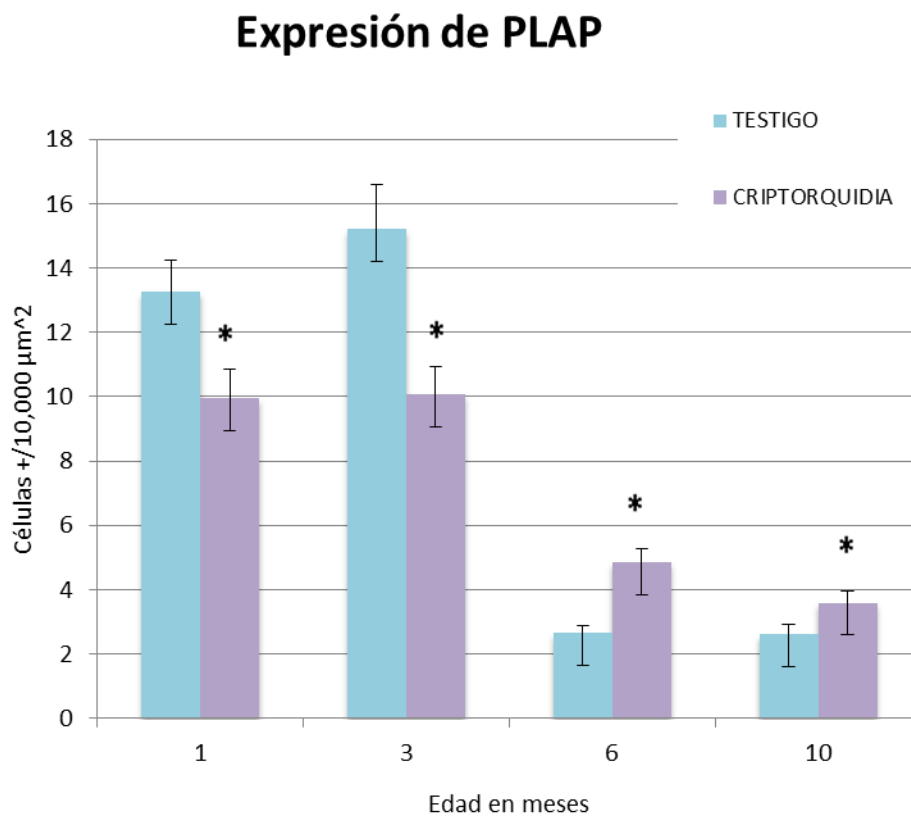


Figura 8.- Imagen de testículo de cerdo de 10 meses de edad con CO y atrofia de tejido. Ya no se observan túbulos seminíferos ni ningún tipo celular representativo del testículo. Las imágenes de inmunohistoquímica de este tipo de testículos no fueron útiles para la evaluación de expresión de ningún anticuerpo debido al daño tisular. Por lo que no se siguieron integrando en el resto del trabajo escrito. Barra de escala: ____ 100 μ m².

6.4.2 Densidad celular de PLAP

La expresión de este marcador mostró una tendencia a la baja en ambos grupos, siendo mayor ($p < 0.05$) su expresión en el grupo testigo a los meses 1 y 3 de edad y menos en el grupo testigo a los 6 y 10 meses de edad. (Gráfica 7, Figura 10).



Gráfica 7.- Número de células positivas a PLAP en relación al área de tubos seminíferos, representados como medias y error estándar. Se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos.

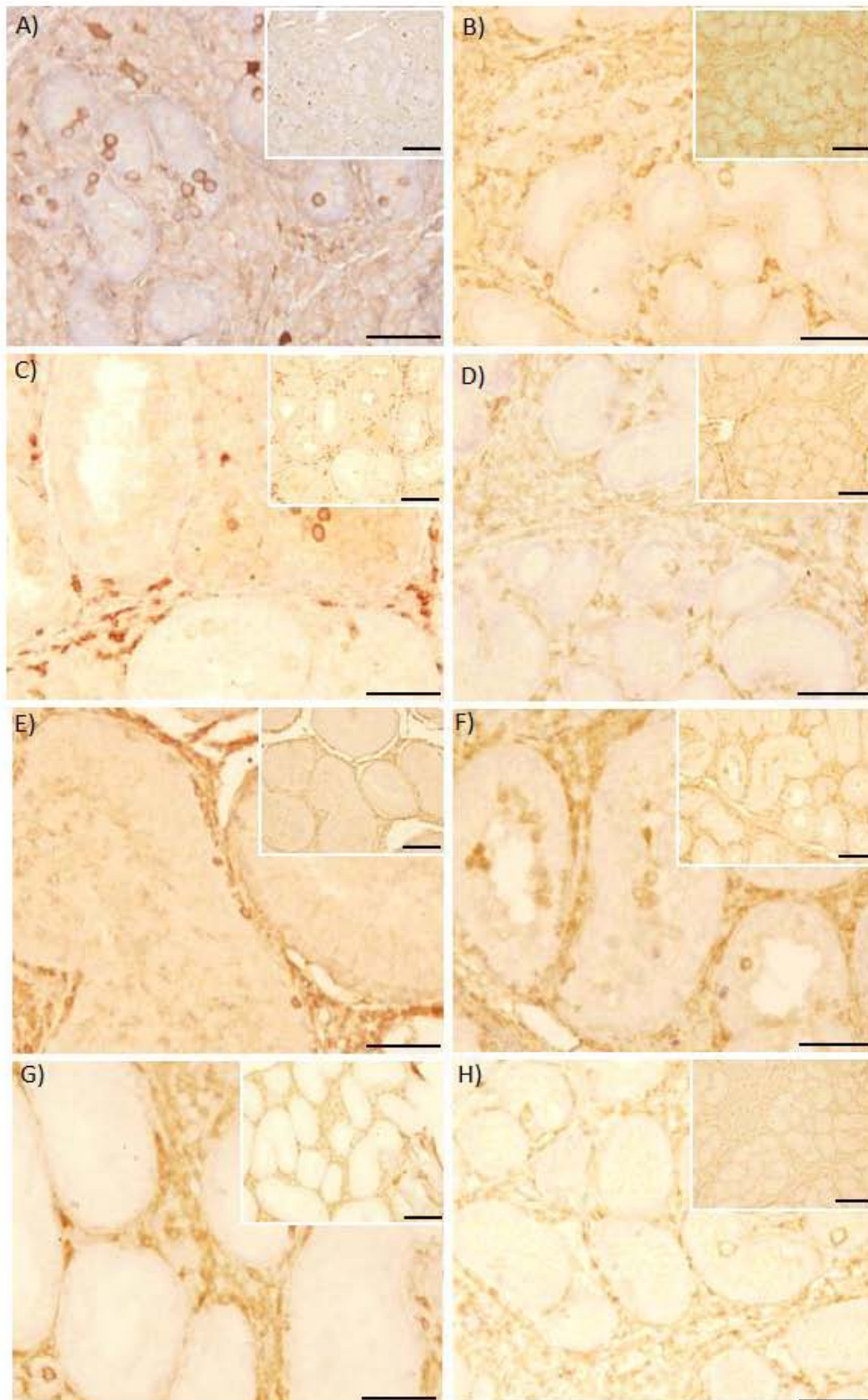
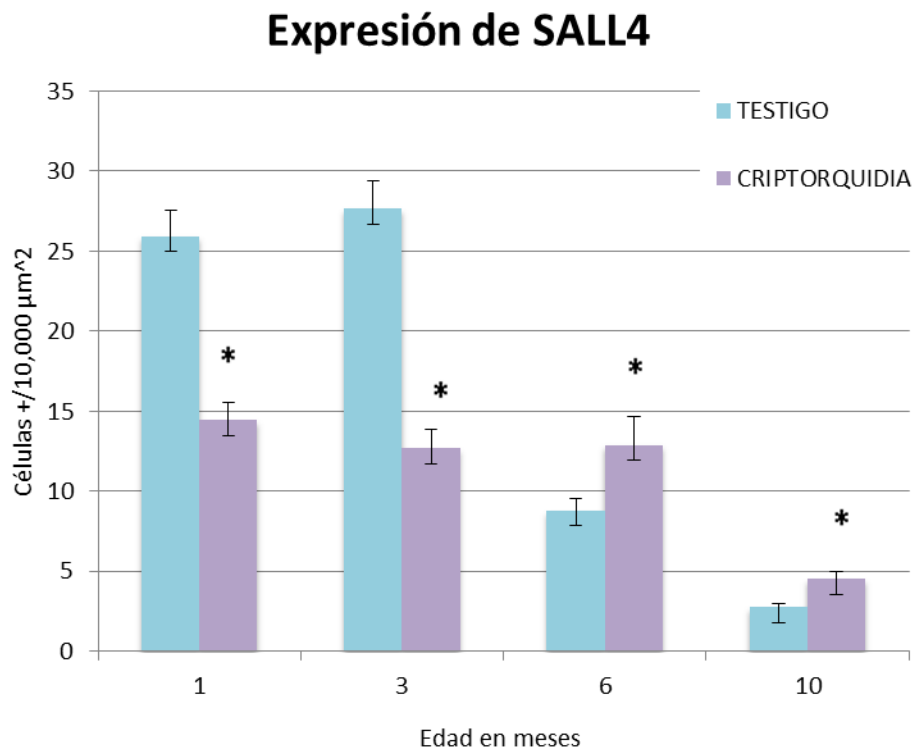


Figura 9.- Imágenes de cortes de testículo con prueba de inmunohistoquímica para determinar expresión de PLAP en individuos de los grupos Testigo y Experimental (CO) de 1, 3, 6 y 10 meses de edad. **A) Testigo 1 mes de edad, B) CO 1 mes, C) Testigo 3 meses, D) CO 3 meses, E) Testigo 6 meses, F) CO 6 meses G) Testigo 10 meses H) CO 10 meses de edad.** Barras de escala: $\underline{\hspace{1cm}}$ 1000 μm^2 y $\underline{\hspace{1cm}}$ 100 μm^2 .

6.4.3 Densidad celular de Sall4

La expresión de este marcador mostró una tendencia a la baja en ambos grupos, siendo mayor ($p < 0.05$) su expresión en el grupo testigo (Gráfica 8, Figura 11).



Gráfica 8.- Número de células positivas a Sall4 en relación al área de tubos seminíferos, representados como medias y error estándar. Se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos.

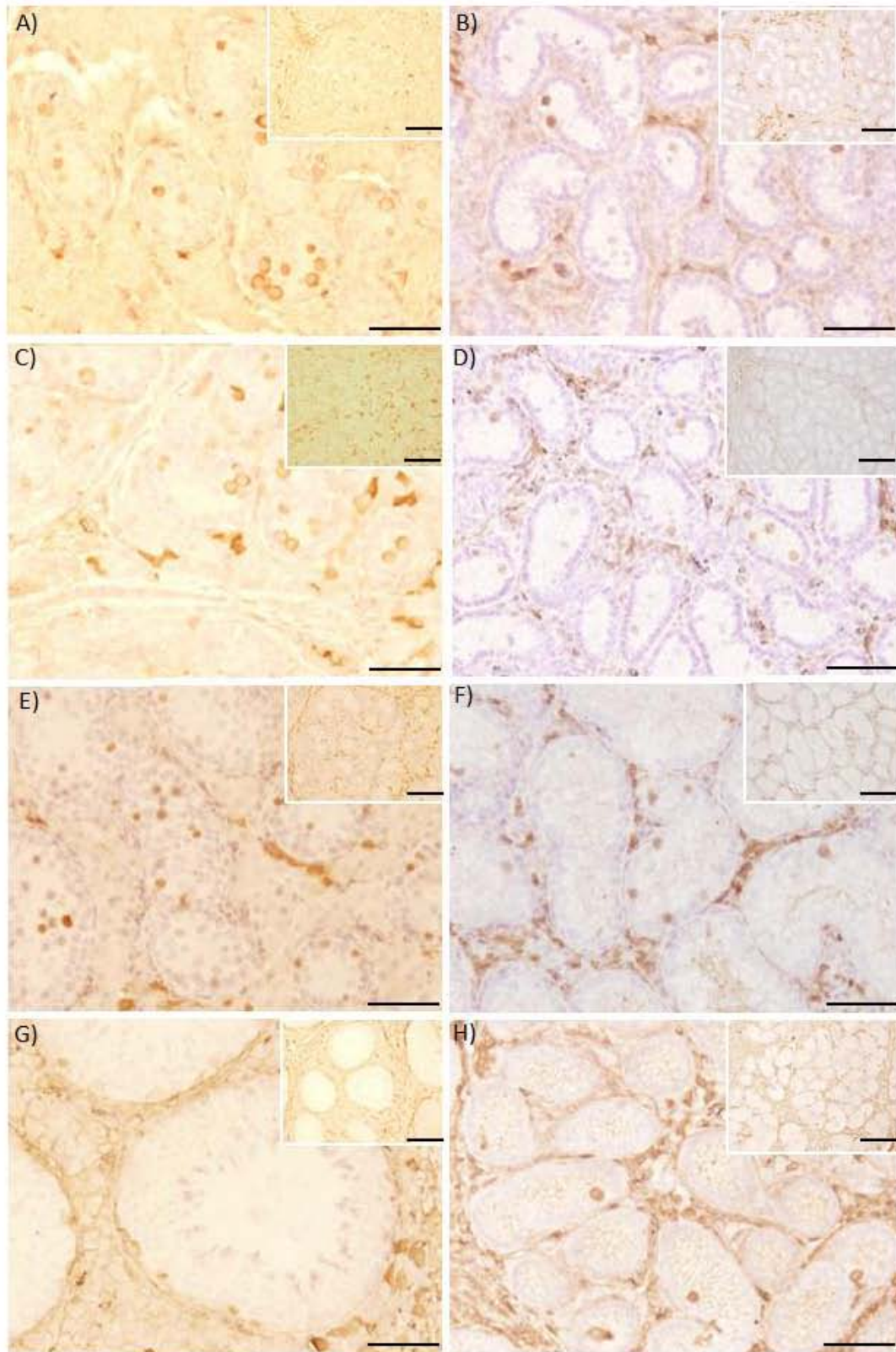


Figura 10.- Imágenes de cortes de testículo con prueba de inmunohistoquímica para determinar expresión de Sall4 en individuos de los grupos Testigo y Experimental (CO) de 1, 3, 6 y 10 meses de edad. **A) Testigo 1 mes de edad, B) CO 1 mes, C) Testigo 3 meses, D) CO 3 meses, E) Testigo 6 meses, F) CO 6 meses G) Testigo 10 meses H) CO 10 meses de edad.** Barras de escala: ___ 1000 μ m² y ____ 100 μ m².

6.4.4 Densidad celular de POU5F1 (OCT3/4) Los resultados de inmunopositividad correspondientes a POU5F1 no fueron concluyentes, puesto que a pesar de la expresión de marcas muy bien definidas en la mayoría de las muestras, algunas no expresaron positividad. Esta falta de contundencia nos sugirió no realizar la cuantificación de células positivas en el presente estudio y proponer opciones experimentales que presenten conclusiones más robustas en futuros trabajos de profundización. Dichas opciones se presentan en la discusión. La positividad se observó en el grupo testigo al mes y tres meses y posteriormente se reguló a la baja, en el grupo con CO, su expresión a los 6 y 10 meses fue mínima.

VII. DISCUSIÓN

El análisis anatómico del presente estudio reflejó una diferencia ($p < 0.05$) en el peso de los testículos. En los no descendidos el peso fue mucho menor que en el del grupo testigo. A su vez, se observaron diferencias tanto de coloración como de estructura macroscópica.

La disminución en el peso testicular puede interpretarse como una afección histológica de los tubos seminíferos y el tejido intersticial; que dio como resultado una significativa disminución en el número y diámetro de los túbulos seminíferos. Esta disminución del peso también ha sido reportada para el humano con CO (Bernal-Mañas y cols., 2005).

La interpretación ya mencionada también se ve reforzada por las diferencias evidentes encontradas entre las áreas de los túbulos seminíferos de los testículos con CO y los testigos ($p < 0.05$), donde a su vez, también la proliferación celular dentro de los túbulos con CO era menor que en individuos sanos ($p < 0.05$), es importante señalar que este aumento de la proliferación en el grupo con CO puede deberse a que el análisis de las muestras se realizó por área tubular, la cual estaba visiblemente reducida en individuos con CO.

Al menos dos informes han descrito previamente la presencia de NICG en el cerdo. En 1987 Wekerle y cols., describieron esta lesión por primera vez en 3 individuos de un grupo de 30 cerdos castrados a diferentes edades, observando NICG en animales de más de 5 años y medio de edad. Señalando la posibilidad de que esta especie animal pueda desarrollar tumores testiculares sólidos. A su vez en otro estudio del año 2008 por Teankum y cols., encontraron que de un grupo de 12 cerdos con hemangioma testicular, 1

presentaba además NICG. Con dichos antecedentes se esperaba encontrar al menos indicios del posible desarrollo de NICG en el presente estudio, sin embargo, en los resultados de esta tesis no se observaron alteraciones de la misma en los individuos adultos con CO espontánea. Por el contrario, en dos de los cerdos se observó una completa atrofia del tejido con involución de los túbulos seminíferos, los cuales desaparecieron por completo a los 10 meses de edad.

Las expectativas de encontrar NICG en cerdos se basó en el incremento del riesgo de desarrollar NICG cuando se tienen antecedentes de CO (Weir y cols., 2000 y Hardel y cols., 2006). Sin embargo en el cerdo con CO no encontramos características de neoplasia, La ausencia de la misma en los sujetos de estudio puede interpretarse de dos maneras. La menos factible es que aleatoriamente los sujetos analizados pertenecieran a un porcentaje de individuos que presentan CO pero que no desarrollan el NICG, lo cual puede debatirse aumentando el número de individuos analizados.

Una hipótesis mucho más interesante y que parece más adecuada se basa en la posibilidad teórica de la existencia de ciertos mecanismos presentes en los cerdos evaluados que evitaron la malignización de los tejidos y el desarrollo de tumores de células germinales y es por esa posibilidad que aun cuando se encontraron diferencias tanto anatómicas, histológicas e inmunohistoquímicas entre el grupo de animales con testículos no descendidos y el grupo testigo no se encontró evidencia de un desarrollo de NICG.

Esta teoría abre nuevas incógnitas a ser resueltas pues de ser posible que existan estos mecanismos deberán ser estudiados mediante su determinación,

explorando además bajo qué condiciones son capaces de funcionar. Para reforzar esta posibilidad retomemos la idea de que los mecanismos que regulan la espermatogénesis surgen de la interacción entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular en el epitelio germinal. Esto se expresa claramente cuando se ve que el epitelio seminífero es un tejido que sostiene células en división continua, donde la apoptosis es el principal mecanismo para regular el número de espermatozoides y para la eliminación de células germinales aberrantes (Bernal- Mañas y cols., 2005).

Estos mecanismos de regulación podrían explicar la atrofia del tejido observada en los individuos de 10 meses. De hecho con anterioridad se ha demostrado que la apoptosis puede verse aumentada gracias a diversos daños testiculares, incluyendo alguna baja en concentraciones hormonales, radiación, toxicidad, exposición a altas temperaturas o incluso por una CO inducida (Bernal- Mañas y cols., 2005). Se sabe también que en cerdos las concentraciones de testosterona a nivel testicular se ven disminuidas en casos de CO y que esa disminución puede inducir apoptosis de células germinales (Bernal- Mañas y cols., 2005); por lo que para entender mejor los mecanismos que provocaron los resultados del presente estudio sería necesario medir concentraciones hormonales mediante la extracción de suero en animales con CO natural, así como determinar si hay indicadores de apoptosis en los tejidos con involución.

Por otra parte y tomando en consideración las observaciones en individuos de 10 meses en donde no hubo involución del tejido; algunos estudios realizados por medio de la técnica de autoradiografía han demostrado que las espermatogonias presentan una disminución en la actividad proliferativa, lo

cual contribuye a una reducción en el número de estas células en testículos con CO (Bernal- Mañas y cols., 2005). Anteriormente ya se ha descrito que la CO genera apoptosis de células germinales y se ha sugerido que el sistema regulatorio Redox está involucrado en el proceso (Vigueras y cols., 2009). En este sentido las observaciones histológicas encontradas en los individuos donde no hubo involución del tejido son similares con lo descrito previamente por un grupo de colaboradores (Bernal- Mañas y cols., 2005); quienes aportaron que en este sentido, el testículo con CO en cerdos adultos se comporta de una manera similar a la del humano. Por lo que ellos concluyeron que el cerdo podría funcionar como un modelo adecuado para el estudio de la CO humana.

Otra característica observada en el estudio histológico fue la presencia de gonocitos en animales tanto sanos como en los individuos con CO a los 3 meses de edad. Estos gonocitos en individuos sanos ya se encontraban en contacto con la membrana basal y aun cuando en su mayoría reflejaban el estar en proceso de degeneración; dicha observación difiere con lo descrito en un trabajo realizado por Hughes y Varley, 1980, quienes señalaron que de manera normal los gonocitos concluyen su proceso de diferenciación a los dos meses de edad en cerdos domésticos. Por lo que los resultados del presente trabajo demostrarían una mayor semejanza con lo descrito en un estudio realizado con cerdos salvajes (Murta y cols., 2009) en donde encontraron gonocitos presentes hasta los 3 meses de edad, junto con la presencia de las primeras espermatogonias; sin embargo, en ese mismo estudio se señaló a manera de discusión que los gonocitos en cerdos de la raza Piau concluían su diferenciación a partir de los 3 meses de edad. Cabe mencionar que el cerdo

doméstico, independientemente de la raza cuenta con un total de $2n=38$ cromosomas, mientras que el cerdo salvaje europeo cuenta con $2n=36$ cromosomas; sin importar la diferencia en el número de cromosomas, estas dos subespecies cuentan con la misma composición genética, ya que forman parte de la misma especie y producen progenie fértil (Murta y cols., 2009); por lo que los resultados esperados en el estudio de cuestiones reproductivas en estas dos subespecies resultarían similares, haciendo que el cerdo salvaje sea a su vez un interesante modelo para la evaluación de la función testicular en cerdos domésticos (Almeida y cols., 2006). Las diferencias encontradas entre lo observado en el desarrollo de esta tesis y literatura en cuanto al momento en el que se diferencian los gonocitos, podrían estar relacionadas con la raza; ya que razas menos productivas suelen tener un desarrollo testicular más lento (Murta y cols., 2009).

En individuos con CO se considera normal el que los gonocitos permanezcan presentes aun después de la edad normal en la que ocurre la diferenciación de los mismos en la especie; sin embargo, en animales sanos los gonocitos debieron haber desaparecido por completo a dicha edad. Llama la atención el hecho de haberlos encontrado presentes en animales sanos a los 3 meses de edad, aun cuando sea en proceso de degeneración; sin embargo parece que dicha característica no tuvo consecuencias a futuro ya que en los animales de 6 y 10 meses de edad las observaciones histológicas coincidieron con las esperadas en individuos sanos de esa edad.

Por último, en el análisis inmunohistoquímico se encontró que en el grupo con CO hubo una diferencia significativa en la tendencia a mayor positividad celular de marcadores de pluripotencialidad como, c-Kit, PLAP y Sall 4 que en el grupo

testigo. Anteriormente se ha demostrado que la expresión de los demás marcadores (c-Kit, PLAP, Sall4 y POU5F1) representan un patrón de inmunoreactividad en las células germinales para el desarrollo de NICG (Emerson y Ulbright, 2010).

En el presente estudio la proteína c-Kit reflejó una disminución en su expresión en ambos grupos; sin embargo, en el grupo con CO, la expresión aun cuando iba disminuyendo, siempre fue significativamente mayor que en el grupo testigo. Esta proteína es considerada un factor antiapoptótico cuya sobreexpresión refleja la supervivencia de células que se mantienen pluripotentes e indiferenciadas (Bashamboo y cols., 2006). Por otra parte, se ha documentado sobre la expresión de la proteína PLAP en el tejido testicular en humanos con CO a los 15 años de edad (Kvist y cols., 2014). En el año 2014 Mitchell y cols. Demostraron que los tejidos con NICG eran a su vez positivos a PLAP en el 89% de los casos. En el desarrollo de esta tesis los resultados para PLAP mostraron una expresión de esta proteína ligeramente mayor hasta el tercer mes de edad en el grupo testigo y que a partir del sexto mes fue mayor en el grupo con CO.

En cuanto a Sall4, se sabe que es un factor de transcripción que ayuda a mantener a las células madre embrionarias, así como su pluripotencialidad (Wang y cols., 2009 y Emerson y Ulbright, 2010). Se le considera una proteína de alta sensibilidad y especificidad como marcador de TCGs (Cao y cols., 2009). En este trabajo se encontró que Sall4 se mantuvo con una expresión constante hasta el sexto mes de edad en testículos no descendidos, siendo mayor en el grupo testigo hasta el tercer mes y descendiendo drásticamente en el sexto mes de edad. Los cerdos con CO siempre expresaron esta proteína

Los resultados obtenidos en las inmunohistoquímicas indican que el desarrollo del testículo con CO ocurre más lentamente que en el caso de individuos sanos y que probablemente la pérdida de la pluripotencialidad y la indiferenciación de las células germinales se dan de manera retrasada. Siendo esta la posible causa del desarrollo de NICG en individuos que presentan testículos no descendidos. Se ha demostrado que en algunos pacientes con CO se conserva la expresión de estos marcadores, haciéndolos susceptibles a su malignización

El haber encontrado una tendencia a la positividad para c-Kit, PLAP y Sall 4 abre la puerta para continuar con el experimental pero con individuos de edades más avanzadas, puesto que la edad adulta y el pleno establecimiento de la madurez testicular en el cerdo se considera se alcanza a los 14 meses de edad (Hughes y Varley, 1980) y además como ya se mencionó anteriormente, los casos de NICG en cerdos encontrados en la literatura fueron en individuos de mayor edad.

Lo que respecta a POU5F1, también llamado OCT3/4; es que se le considera un factor de transcripción que se expresa en células embrionarias y primordiales en humanos y ratas (Okamoto y cols., 1990; Rosner y cols., 1990). Se le ha propuesto como un factor encargado de regular la capacidad de pluripotencia celular (Pesce y Scholer, 2000).

En nuestros resultados se encontró la expresión de dicho marcador de manera bien definida en la mayoría de las muestras, sin embargo no fue así en todas ellas. La positividad encontrada contradice lo publicado por Goel y cols, (2008) que documentaron la ausencia en la expresión de estos receptores en testículos de cerdo de 2 días a 3 semanas de edad. Sin embargo el que

algunas muestras no hayan expresado claramente la positividad, hace menos robusta nuestra interpretación de ahí que no podamos marcar de manera contundente la contradicción con el trabajo referido, por lo que los conteos de células positivas no se presentaron en este escrito. Con el fin de robustecer nuestras observaciones y disminuir la interpretación subjetiva se sugiere que en investigaciones futuras se analice la expresión de esta proteína mediante otras técnicas como PCR en tiempo real. Cabe mencionar que aun cuando el cerdo es un animal que desarrolla CO de manera natural y con una alta incidencia, es necesario refinar el modelo experimental con la finalidad de poder determinar con exactitud cuáles son las características que se desean estudiar acerca los testículos no descendidos y profundizar sobre el desarrollo de la CO de manera natural y los mecanismos con los cuales cuenta el organismo y que conllevan a la malignización del tejido y al desarrollo de NICG; o en su caso a la involución de los túbulos seminíferos y la atrofia de todo el tejido testicular. Para lo anterior, también resulta necesario el realizar pruebas complementarias como serología, PCR y de indicadores de apoptosis; que indiquen con una mayor exactitud qué es lo que ocurre a nivel testicular y hormonalmente en individuos con CO.

VIII. CONCLUSIÓN

En el presente estudio no se observaron alteraciones que sugieren que el cerdo con CO desarrollara NICG. Viéndose reflejada en las lesiones histológicas una atrofia del tejido y una involución de los túbulos seminíferos en los individuos de 10 meses de edad. Por otra parte, se observaron diferencias significativas entre el grupo testigo y los individuos con testículos no descendidos en cuanto a una tendencia mayor a inmunopositividad.

Con base en estos resultados se concluyó que a largo plazo el cerdo podría llegar a ser un buen modelo alternativo para el estudio de la CO en humanos, ya que demuestra semejanzas histológicas e inmunohistoquímicas. Sin embargo, se requiere ampliar el número de animales estudiados y refinar el modelo experimental; con la finalidad de poder determinar con mayor exactitud cuáles son las características que se desean estudiar acerca de la CO, así como profundizar sobre los mecanismos que conllevan a la malignización o involución del tejido.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abaci A, Çatli G, Anik A, Böber E. (2013). Epidemiology, Classification and Management of Undescended Testes: Does Medication Have Value in its Treatment? *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 5(2):65-72.
- Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, Horwich A, Laguna MP. (2009). Cáncer de Testículo. *European Urology* 53(3):478-496,497-513.
- Almeida F, Leal M, França L. (2006). Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*) *Biology of Reproduction* 29(5):560-580.
- Amann y Veeramachaneni. (2007). Cryptorchidism in Common Eutherian Mammals. *Reproduction, The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 133 (3) 541-561.
- Bashamboo A., Taylor A.H., Samuel K., Panthier J.J., Whetton A.D. and Forrester L.M. (2006). The survival of differentiating embryonic stem cell is dependent on the SCF-KIT pathway. *Journal of Cell Science*. 119, 3039- 3046.
- Bernal-Mañas C, Morales E, Pastor L, Pinart E, Bonet S, De la Rosa P, Briz M, Zuasti A, Ferrer C, Canteras M. (2005). Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. *Acta Histochemica*. 107 (5) 365-372.
- Berney D, Looijenga L, Idrees M, Oosterhuis2 JW, Rajpert-De Meyts E, Ulbright TM, Skakkebaek NE. (2016). Germ Cell Neoplasia *In Situ*

- (GCNIS). Evolution of the Current Nomenclature for Testicular Pre-invasive Germ Cell Malignancy. *Histopathology*. 69(1):7-10.
- Bonney T, Hutson J, Souhwell B, Newgreen D. (2008). Update on Congenital Versus Acquired Endescendend Testes: Incidence, Diagnosis and Management. *Journal of Surgery* 78: 1010–1013.
 - Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. (2009). SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 33:1065–1077.
 - Castellanos G. (2015). Efecto de la inmunocastración temprana con GnRH modificada en cerdos sobre la morfología testicular y el metabolismo químico. Tesis de maestría en ciencias Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
 - Cortés-Trujillo L. (2015). Factor de crecimiento epidermal en la diferenciación de gonocitos en un modelo animal con Neoplasia intratubular de células germinales y antecedente de. Tesis de maestría en ciencias Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
 - Costa WS, Sampaio FJB, Favorito LA et al. (2002): Testicular migration: Remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis. *Journal of Urology*. 167(5):2171-2176.
 - Emerson R y Ulbright T. 2010. Intratubular germ cell neoplasia of testis and its associated cancers: the use of novel biomarkers. *Pathology*, 42(4):344-355.
 - Fantasia J, Aidlen J, Lathrop W y Ellworth P. (2015). Undescendent testes: A clinical and surgical review. *Urologic Nursing*, 35 (3), 117-126.

- Ferguson L, Agoulnik AI. (2013). Testicular cancer and Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 4: 1-9.
- Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. (2008). Role hormones, genes and environment in human cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, 29: 560-580.
- França L, Avelar G, Almeida F. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2):300-318.
- Goel S, Fujihara M, Minami N, Yamada M, Imai H. 2008. Expression of NANOG, but not POU5F1, points to the stem cell potential of primitive germ cells in neonatal pig testis. *Reproduction*, 135(6):785-795.
- Gottlieb S, Suárez M, Stivel M, Vaian E. (2009). Criptorquidia: Controversias Diagnósticas y Terapéuticas Actuales. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 46(4): 1851-3034.
- Hardell L, van Bavel B, Lindstrom G, Eriksson M, Carlberg M. (2006). In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *International Journal of Andrology* 29:228–234.
- Hughes PE & Varley MA (1980). Puberty in the male. *Reproduction in the Pig* 1: 173–186.
- Hutson J, Li R, Southwell B, Petersen B, Thorup J y Cortes D. (2013). Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? *Frontiers in Endocrinology* 2012; 3: 176.
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística. [www. Inegi.org.mx](http://www.Inegi.org.mx)
- Ivell R y Hartung S. (2003). The molecular basis of cryptorchidism. *Molecular Human. Reproduction*, 9(4):175–181.

- Kvist K, Clasen-Linde E, Cortes D, Petersen BL, Thorup J. (2014). Adult immunohistochemical markers fail to detect intratubular germ cell neoplasia in prepubertal boys with cryptorchidism. *Journal of Urology*, 191:1084–1089.
- Looijenga H, Gillis A, Stoop H, Biermann K y Oosterhuis JW. (2011). Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumor pathogenesis; from initiation to treatment resistance. *International Journal of Andrology* 34(4 Pt 2):234-251.
- Manzoni G, Verlato G, Tomezzoli A, Pelosi G, Ricci F, Di Leo A, Cordiano C. (1998). Study on Ki-67 Immunoreactivity as a Prognostic Indicator in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Clinical Oncology*. 28 (9):534-537.
- Mitchell RT, Camacho-Moll ME, Macdonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolfenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH. (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Modern Pathology* 27:1255–1266.
- Momox L. (2011). Importancia, beneficios y ética de la experimentación animal. *Experimentación Animal*. Disponible en: <http://experimentaciondhtic.blogspot.mx/2011/12/importancia-beneficios-y-etica-de-la.html>
- Murta D, Costa D, Santos M, Faria F. (2010). Somatic and germ cell proliferation during post-natal development of the testis in the wild boar

(*Sus scrofa scrofa*). *Animal Reproduction Science*. Elsevier
DOI:10.1016/j.anireprosci.2009.11.2003

- Okamoto K., Okazawa H., Okuda A., Sakai M., Muramatsu M. and Hamada H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461-472.
- Pesce M. and Scholer H.R. (2000). Oct-4: control of totipotency and germ line determination. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 452-457.
- Pinart E, Sancho S, Briz M y Bonet S.(1999). Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *J Morphol* 239: 225–43.
- 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.
- Rosner M.H., Viganò M.A., Ozato K., Timmons P.M., Poirier F., Rigby P.W. and Staudt L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686-692
- Scully R.E. and Coffin D.L. (1952). Canine testicular tumors, with special references to their histogenesis, comparative morphology, and endocrinology. *Cancer* 5, 592-605.
- Shikone T, Billig H, Hsueh AJW. 2003. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 1994;51:865–72.
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J. 1987. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and

precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *International Journal of Andrology*, 10:19–28.

- Skakkebaek N. (2016). A Brief Review of the Link between Environment and Male Reproductive Health: Lessons from Studies of Testicular Germ Cell Cancer. *Hormone Research in Paediatrics*, ;86(4):240-246.
- Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, Ruban L, Harrison NJ, Schwager C, Abdollahi A, Huber PE, Brunak S, Gjerdrum LM, Moore HD, Andrews PW, Skakkebæk NE, 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 Research*, 69:5241–5250.
- Sumano H, Ocampo L, (2006). *Farmacología Veterinaria*. 3ª Edición, México. McGraw-Hill.
- Teankum H, Hauser B, Grest P, Pospischil A, Janett F, Bürgi E, Borel N. 2008. Capillary haemangiomas of the scrotum and testicle in boars. *Journal of Comparative Pathology*, 139:177-186.
- Tista Olmos, 2007 *Fundamentos de Cirugía en Animales*. 2ª Edición, México. Trillas.
- Van der Zwan YG, Biermann K, Wolffenbuttel KP, Cools M, Looijenga LH. (2015). Gonadal maldevelopment as risk factor for germ cell cancer: towards a clinical decision model. *European Urology*, 67:692–701.
- Viguera R, Molina D, Reyes G, Santamaría D, Moreno N, García M, Cuevas O, Rojas J. (2009). Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta Histochemica*. 111(2):127-137.

- Viguera-Villaseñor RM, Cortés-Trujillo L, Chávez-Saldaña M, Vázquez FG, Carrasco-Daza D, Cuevas-Alpuche O, Rojas-Castañeda JC. (2015). Analysis of POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2 γ and SALL4 in gonocytes of patients with cryptorchidism. *Acta Histochemica*, 117(8):752-61.
- Virtanen H, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-DeMeyts E, Thorsson A, Thorup J, Main K. (2007). Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Pædiatrica*, 96(5):611-616.
- Wang X., Zhao Y., Xiao Z., Chen B., Wei Z., Wang B., Zhang J., Han J., Gao Y., Li L., Zhao H., Zhao W., Lin H. and Dai J. (2009). Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. *Stem Cells* 27:1265- 1275.
- Weir HK, Marrett LD, Kreiger N, Darlington GA, Sugar L. (2000). Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell cancer. *International Journal of Cancer* 87:438–443.
- Wekerle L, Osvath S, Kiss F, Bajtai A. (1987). Intratubular germ cell tumours of pig testicles. *Andrología*, 19: 554-560.
- Wensing CJG. (1973). Abnormalities of testicular descent. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen. Series C. Biological and Medical Sciences*, 76(2):373–81.
- Zhang RD, Wen XH, Kong LS, Deng XZ, Peng B, Huang AP, Wan Y y Yang ZW. (2002). A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis. *Reproduction* 124:95–105.

X. ANEXO

Índice de Maduración Epitelial o Índice de Johnsen

Puntaje	Maduración
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 por tubo seminífero)
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 seminífero)
5	Gran cantidad de espermatoцитos presentes
4	Pocos espermatoцитos presentes (5 por tubo seminífero)
3	Presencia únicamente de espermatogonias
2	No hay células germinales, sólo están presentes las células sustentaculares
1	No hay células en el tubo seminífero

Índice Histopatológico

Puntaje	Alteración Histológica
1	Plegamiento de la membrana basal Descamación (ligera/abundante)
2	Vacualización Sincitio celular Núcleo picnótico (ligero/abundante)
3	Ausencia de espermatidas
4	Ausencia de espermatoцитos
5	Ausencia de espermatogonias
6	Ningún tipo celular