



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

EFFECTO PROTECTOR DE LA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO EN UN
MODELO MURINO CON CRIPTORQUIDIA EXPERIMENTAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
ESTEFANIA REYES CRUZ

Tutor Principal
Rosa María Viguera Villaseñor-INP

Comité Tutorial
María Elena Trujillo Ortega-FMVZ
Santiago René Anzaldúa Arce-FMVZ

Ciudad Universitaria Cd. Mx.

Agosto 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría y financiado con el Recurso Fiscal para Investigación del Programa E022 del Presupuesto de Egresos de la Federación (48/2015).

Dedicatorias

A Dios:

Por permitirme llegar a este momento tan especial de mí vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.

Agradecimientos

A Dios, por ayudarme a terminar este proyecto.

A la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, gracias por todo tu apoyo y gran tutoría para la realización de ésta tesis.

A la Dra. María Elena Trujillo y al Dr. Santiago René Anzaldúa Arce, por confiar en el proyecto y por brindarme su apoyo.

Al Instituto Nacional de Pediatría.

Al Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Pedro Medina Granado, gracias por transmitirme tus conocimientos en el laboratorio y por ser un gran maestro de vida.

A los integrantes del laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría: Dra Margarita, Dr. Julio, Dr. Francisco, Silvia, Irene, Arely, Fabiola, Tania, Daniel, Luis, Alan, gracias por brindarme su ayuda y por ser unas personas increíbles.

A mí padre, un gran hombre y parte fundamental en mí vida, gracias por tú amor y apoyo incondicional.

A mí abuelita paterna, gracias por todo tu apoyo y motivación.

A mis amigos, gracias por escucharme, aconsejarme y apoyarme durante este tiempo.

A mí madre, gracias por ser una gran mujer y ejemplo de perseverancia.

Al CONACYT por el financiamiento durante el primer año, con número 713389/588510

Resumen

La criptorquidia (CO) se define como una condición en la que uno o ambos testículos no se encuentran en el escroto al nacimiento. Se presenta en el 2 al 5% de los niños nacidos a término y en el 30% en los niños prematuros, con una frecuencia <1% a los doce meses en donde se puede presentar el descenso testicular espontáneo. Durante el periodo en el que el testículo permanece por arriba del escroto, se somete a estrés oxidante afectando, probablemente la sobrevivencia y diferenciación de las células germinales y sustentaculares, alterando la espermatogénesis futura. Se ha señalado que la Epigallocatequina-3-galato (EGCG) es un estabilizador de radicales libres (RL) y activador de enzimas antioxidantes. No se han realizado estudios que permitan reducir los daños provocados por el estrés oxidante en un modelo animal con criptorquidia y descenso espontáneo tardío. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto protector de la EGCG en un modelo murino con criptorquidia y descenso espontáneo tardío. Los grupos experimentales fueron machos controles, controles con EGCG, criptorquídicos y criptorquídicos tratados con 15 mg y 25 mg de EGCG respectivamente. Se determinaron parámetros espermáticos, alteraciones morfológicas testiculares características de la criptorquidia, la apoptosis y proliferación de células germinales, la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa) y la concentración sérica de testosterona. Los resultados paramétricos fueron analizados por ANOVA y comparación múltiple de Tukey; mientras que los resultados no paramétricos fueron analizados por Mann-Whitney. Los datos obtenidos mostraron que el tratamiento con 15 mg de EGCG favorece algunos parámetros espermáticos, disminuyendo alteraciones morfológicas testiculares y en consecuencia aumentando la proliferación de células germinales; esto posiblemente debido a que la EGCG disminuye el proceso de lipoperoxidación. En cambio, con el tratamiento de 25 mg de EGCG, los parámetros evaluados no se vieron favorecidos, mostrando un aumento significativo en la apoptosis. Por lo tanto concluimos que la administración de 15 mg de EGCG favorece los parámetros de fertilidad analizados en un modelo con CO y descenso espontáneo tardío.

Palabras clave: criptorquidia, descenso espontáneo, EGCG, estrés oxidante

Abstract

Cryptorchidism (CO) is defined as a condition in which one or both testicles are not found in the scrotum at birth. It occurs in 2 to 5% of children born at term and 30% in premature children, with a frequency <1% at twelve months where spontaneous testicular descent may occur. During the period in which the testis remains above the scrotum, it undergoes oxidant stress affecting, probably the survival and differentiation of the germ and sustentacular cells, altering the future spermatogenesis. It has been pointed out that Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a free radical stabilizer (RL) and activator of antioxidant enzymes. No studies have been conducted to reduce the damage caused by oxidative stress in an animal model with cryptorchidism and late spontaneous descent. Therefore, the objective of this work was to evaluate the protective effect of EGCG in a murine model with cryptorchidism and late spontaneous descent. The experimental groups were control males, controls with EGCG, cryptorchid and cryptorchid treated with 15 mg and 25 mg of EGCG respectively. Spermatogenic parameters, testicular morphological alterations characteristic of cryptorchidism, apoptosis and proliferation of germ cells, the activity of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase) and serum testosterone concentration were determined. The parametric results were analyzed by ANOVA and Tukey's multiple comparison; while the non-parametric results were analyzed by Mann-Whitney. The data obtained showed that the treatment with 15 mg of EGCG could benefit some sperm parameters, decreasing testicular morphological alterations and consequently increasing the proliferation of germ cells; this is possibly since EGCG decreases the lipoperoxidation process. On the other hand, with 25 mg of EGCG treatment, the evaluated parameters were not benefited, showing a significant increase in apoptosis. These results suggest that the administration of 15 mg of EGCG benefits the fertility analyzed parameters in a model with CO and late spontaneous descent.

Key words: Cryptorchidism, spontaneous descent, EGCG, oxidant stress

Contenido

Dedicatorias.....	3
Agradecimientos.....	4
Resumen	5
<i>Abstract</i>	6
Contenido	7
Lista de Cuadros	8
Lista de Figuras	9
Abreviaturas y siglas usadas.....	10
ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	
Descenso Testicular	122
Fase transabdominal	122
Fase inguinoescrotal	133
Criptorquidia	155
Descenso espontáneo.....	155
Etiología.....	166
El descenso espontáneo tardío y sus implicaciones a futuro	177
Estrés oxidante en la criptorquidia	199
Antioxidantes	20
Antioxidantes endógenos	221
La Epigallocatequina-3-galato como un antioxidante exógeno	21
Biodisponibilidad de la EGCG	233
Justificación	244
Objetivo general	255
Objetivos específicos.....	255
Hipótesis	255
Material y Métodos	25
Resultados.....	34
Discusión	46
Conclusión	53
Referencias.....	54
Anexos.....	64

Lista de Cuadros

1. Parámetros de valoración espermática

Lista de Figuras

1. Distribución de los grupos y su manejo experimental
2. Índice gonadosomático
3. Imágenes histológicas de los tubos seminíferos de los diferentes grupos experimentales
4. Área del epitelio seminífero
5. Índice histopatológico
6. Índice de Maduración
7. índice Apoptósico
8. Imágenes de apoptosis
9. Proliferación
10. Imágenes de proliferación
11. Concentraciones séricas de Testosterona
12. Actividad de catalasa
13. Actividad de SOD

Abreviaturas y siglas usadas

AE: Área del epitelio seminífero

GAGs: Glicosaminoglicanos

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

CGRP: Péptido similar al gen de la calcitonina

Cs: Célula de Sertoli

CO: Criptorquidia

CS: Control sano

CS/V: Control sano con administración de vehículo

CS/EGCG: Control sano con administración de EGCG

CS/V/EGCG: Control sano con administración del vehículo del estradiol y EGCG

CO/V: Criptorquidia desarrollada por la administración de 17β -estradiol y solución salina como vehículo

CO/EGCG15: Criptorquidia desarrollada por la administración de 17β -estradiol y administración de 15 mg de EGCG

CO/EGCG25: Criptorquidia desarrollada por la administración de 17β -estradiol y administración de 25 mg de EGCG

De: Descamación

DE: Disruptores Endocrinos

dpp: días posparto

EGCG: Epigallocatequina-3-galato

ERO: Especies reactivas de oxígeno

G: Gubernáculo

GHST: Glutation-S-transferasa

GHS-rd: Glutation reductasa

GHS-px: Glutación peroxidasa

HDF: Fibroblastos diploides humanos

IA: Índice apoptósico

IGF: Factor de crecimiento de insulina

IG: índice gonadosomático

IH: Índice histopatológico

IM: Índice de Maduración

INSL3: Hormona similar a la insulina 3

IP: Índice de proliferación
LSC: Ligamento suspensor craneal
NF- β : factor nuclear- β
P: Plegamiento de la lámina basal
RA: Receptor de andrógenos
RL: Radicales libres
SOD: Superóxido dismutasa
Sc: Espermatocito
Se: Espermátide elongada
Sr: Espermátide redonda
SS: Espermatogonia
SSF: Solución salina fisiológica
Sz: Espermatozoide
TLR4: Receptor Toll-like 4
v.s.c: vía subcutánea
v.i.p: vía intraperitoneal
V: Vacuolización

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Descenso Testicular

El descenso testicular es un proceso importante para el desarrollo de la espermatogénesis, ha sido estudiado durante siglos, con gran interés en los conceptos anatómicos en los siglos XVIII y XIX con una comprensión gradual de la regulación hormonal en el siglo XX.

El descenso testicular generalmente se describe en dos etapas (transabdominal e inguinoescrotal), regulado por diferentes factores anatómicos (ligamento suspensor craneal y el ligamento genitoinguinal caudal o gubernáculo) (Kubota y col. 2001; Ferlin, 2007; Szarek y col. 2014; Hutson y col. 2015) y hormonales (eje hipotálamo- hipófisis- gónada) (Ferlin, 2007; Hughes y Acerini, 2008; Hutson y col. 2015).

Antes de la migración transabdominal, los testículos se desarrollan sobre la superficie antero-medial del mesonefros en la cresta urogenital (Fiegel y col. 2011), que está anclado por el ligamento suspensor craneal (LSC) y caudalmente por el ligamento genitoinguinal o gubernáculo (G), este último fue nombrado por primera vez en el siglo XVIII por el cirujano escocés John Hunter, quien sugirió que podría dirigir el testículo hacia el escroto.

Cerca del momento de la diferenciación sexual en el humano (7-8 semanas de gestación), el mesonefros regresa, dejando el desarrollo testicular en un mesenterio, ahora llamado mesorquio (Hutson y col. 2015).

Fase transabdominal

Esta etapa se presenta entre las semanas 10 a la 15 de la gestación en humanos y en roedores entre los días 13 al 17 de la gestación. En un principio la gónada indiferenciada se ubica en una posición perirrenal, y es sostenida por el LSC hacia la pared abdominal posterior y por el ligamento genitoinguinal caudal o gubernáculo, el cuál conecta al testículo, vía epidídimo, al futuro anillo inguinal interno del canal inguinal. El G está compuesto de una matriz extracelular hidrofílica rica en glicosaminoglicanos (GAGs), células mesenquimatosas, fibroblastos y células de músculo liso, así como fibras de colágena y elásticas. Este ligamento es la principal estructura encargada del descenso testicular.

Adyacente a la gónada indiferenciada, de origen mesonefrónico, se encuentran los conductos de Wolff y de Müller (Fiegel y col. 2011).

Entre las semanas 10 y 15 de gestación, los testículos en el feto humano se quedan más cerca de los futuros canales inguinales, mientras que los ovarios se alejan más de la ingle. El descenso de los testículos cerca de la ingle se logra mediante la reacción de "sobrecrecimiento" por el gubernáculo, el cual se somete a división celular y aumento en la matriz extracelular, principalmente por GAGs y ácido hialurónico, que se hidratan. La conexión gubernacular próxima al testículo, se queda corta. La dilatación distal del bulbo gubernacular, que está incrustado en la parte anterior de la pared abdominal, ejerce tracción a través del cordón gubernacular en la cresta urogenital para ayudar a anclar el testículo en posición durante el crecimiento abdominal fetal y dilatar el canal inguinal. Además, algunos estudios sugieren que el aumento en el volumen del G, está bajo control de la hormona similar a la insulina 3 (INSL3), causando la dilatación del canal inguinal, y en consecuencia la migración del testículo hacia la región inguinal (Szarek y col. 2014).

Fase inguinoescrotal

Después de completar la primera fase de descenso, hay una pausa en la migración testicular hasta aproximadamente la semana 25 en humanos, ocurriendo posteriormente la fase inguinoescrotal a partir de las semanas 25-35 de la gestación en humanos y desde el nacimiento hasta alrededor del día 21 posnatal en roedores. El proceso general es similar en la mayoría de los mamíferos, aunque hay diferencias importantes en la remodelación del G, migración y elongación a través del pubis para permitir el descenso testicular en el escroto. En roedores, la mayor parte del G se reabsorbe con una extensa remodelación para permitir al G evertirse antes de la migración inguinoescrotal, mientras que en cerdos y humanos no ocurre la eversión y resorción obvias sino hasta después de la migración escrotal (Hutson y col. 2015).

La migración testicular de la región inguinal hacia el escroto es predominantemente controlada por los andrógenos. En el tercer tercio de la gestación, y después del nacimiento en los roedores, el G se contrae hacia el escroto. Sin embargo, algunos autores han sugerido que la influencia de los andrógenos sobre la migración del G es vía indirecta a través del nervio

genitofemoral (Guzmán y col. 2007). Como anteriormente se mencionó, los fibroblastos expresan receptores de andrógenos (RA) lo que permite durante la fase inguinoescrotal, una pérdida de la matriz extracelular y de numerosos fibroblastos a partir del incremento en la secreción de fosfatasa ácida y colagenasas. Esto resulta en la involución del ligamento y bulbo del gubernáculo, convirtiéndose este progresivamente en una estructura fibrosa con pocas células, rica en fibras de colágeno y elásticas. Tales cambios disminuyen el tamaño del G, el ligamento tiende a acortarse y se incorpora al bulbo gubernacular, lo que obliga al testículo a descender (Vigueras y col. 2004; Hutson y col. 2015). Simultáneamente, el proceso vaginal y el músculo cremáster se alargan dentro del gubernáculo creando una extensión de la cavidad abdominal para formar el escroto, de esta manera, se permite el paso del testículo desde el anillo inguinal externo hasta su posición final. Posteriormente, el proceso vaginal se cierra con la finalidad de evitar la formación de hernias inguinales (Fiegel y col. 2011).

Además de las hormonas testiculares antes mencionadas, parece haber una función muy importante atribuída al nervio genitofemoral y su neurotransmisor principal el péptido similar al gen de la calcitonina (CGRP). El efecto de los andrógenos en el G, durante ésta fase inguinoescrotal, podría estar mediado por el CGRP, producido por el nervio genitofemoral (Ferlin, 2007).

En conclusión, el modelo de descenso testicular es un proceso complejo y de dos etapas, requiriendo la interacción de múltiples factores, los cuales involucran la diferenciación de la gónada testicular. La presencia de los andrógenos; así como un eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada normal durante la segunda etapa, sugirieren un papel primordial en el descenso testicular, puesto que alguna alteración en los mecanismos antes mencionados ocasiona la inhibición del descenso testicular llamado criptorquidia (CO) o un descenso tardío.

Este último puede resolverse durante la oleada postnatal de LH, logrando el descenso testicular y con ello la diferenciación de las células germinales (Ferlin, 2007).

Criptorquidia

La CO se define como una condición en la que uno o ambos testículos no se encuentran en el escroto al nacimiento (Organización Mundial de la Salud, 2012). La clasificación puede basarse en la localización del testículo criptorquídico y puede variar, localizándose en cavidad abdominal, canal inguinal, o ectópico y puede afectar a uno o a ambos testículos (Virtanen y col. 2007). Se presenta con una frecuencia alrededor de 2-4% a nivel mundial de los niños nacidos a término y 30% en los niños prematuros, con una frecuencia <1% hacia los nueve meses de edad (Wenzler y col. 2004; Ferguson y Agoulnik, 2013) y permanece constante a lo largo de la niñez (Heredia, 2008), considerándose un importante factor de riesgo para infertilidad y aumento en el riesgo de desarrollar cáncer testicular (Ferguson y Agoulnik 2013).

Descenso espontáneo

Se sabe que pacientes con CO al nacimiento pueden tener una alta tendencia de descenso espontáneo (Scheiber y col. 1986); llegando a tener una proporción de entre 57% y 71% (Brakel y col. 2017); disminuyendo la incidencia de CO a <1% a los 9 meses de edad y permaneciendo constante a lo largo de la niñez (Abney y col. 1989; Wenzler y col. 2004; Gomez 2004). Esto se puede presentar porque durante la gestación no se produce suficiente hormona Gonadotropina coriónica humana (hCG) materna o porque existen factores gestacionales que ocasionan retardo en el descenso testicular, los cuales al ya no estar presentes en el nacimiento, ocasionan el descenso espontáneo, junto con un alto pico postnatal de gonadotropinas y testosterona (Wenzler y col. 2004).

Existe evidencia previa de descenso testicular espontáneo, desde 1918, lo cual fue reportado por un médico de Wellington College, Berkshire, en el periódico *Guy's Hospital Gazette*, el cual inició sus investigaciones desde 1900 (Smith y col. 1939).

Posteriormente surgieron otros investigadores como Williams y Drake; este último informó la presencia de descenso testicular espontáneo en veinticuatro de treinta y ocho casos en edades de hasta diez años de edad. Por otro lado, Williams observó a 2,104 niños, en los cuales se presentó descenso testicular espontáneo en veinticuatro (sesenta y tres por ciento) de treinta y ocho

unilateralmente no descendidos, y en catorce (sesenta y siete por ciento) de veintiún pacientes no descendidos bilateralmente (Smith y col. 1939).

Algunos estudios sugieren que los efectos secundarios observados en los testículos donde ocurre el descenso espontáneo tardío, radican en que durante el tiempo en que los testículos permanecen por arriba del escroto están sometidos a elevada temperatura, en periodos críticos de diferenciación y proliferación de células testiculares conduciendo a atrofia celular (Hutson y col. 2015).

Se han realizado estudios en varios modelos animales que muestran los efectos del aumento de la temperatura sobre las células germinales, causando alteraciones en su transformación, maduración, así como en los mecanismos de apoptosis. Es posible que algunas células germinales que sobreviven al estrés térmico, una vez que ocurre el descenso espontáneo puedan diferenciarse a espermatogonias o permanecer indiferenciadas, aumentando el riesgo de desarrollo de neoplasia a futuro. Esta lesión térmica es mediada por especies reactivas de oxígeno y ciertas proteínas de choque térmico, que dañan las células germinales así como las células de Sertoli (Cs) (Hutson y col. 2015); en consecuencia afecta la regulación hormonal testicular (Virtanen y col. 2007).

Etiología

El crecimiento fetal normal está regulado por factores maternos, fetales y placentarios. El normal comportamiento de estos tres factores permite al feto obtener un adecuado desarrollo testicular (Sepúlveda y col. 2014).

El descenso testicular a través del canal inguinal comienza en la semana 25 posconcepción y se completa a la semana 35. La mayoría de los casos de CO se producen después de la semana 25 de gestación. El descenso testicular está determinado por una adecuada concentración de andrógenos y un eje hipotálamo- hipofisario-testicular funcional (Wenzler y col. 2004).

Estudios epidemiológicos han identificado a la desnutrición, tabaquismo, alcoholismo, diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertiroidismo como factores gestacionales que pueden ocasionar retraso en el descenso testicular (Campoy y col. 2001). También se han estudiado hormonas, como la LH, la hCG y los andrógenos, los cuales juegan papeles importantes en el mecanismo de descenso testicular hacia el escroto. El bajo nivel de estrógenos maternos y la

insuficiencia placentaria con disminución de la secreción de hCG también pueden ocasionar falla en el descenso testicular. Asimismo, casos de CO con síndrome de Prader-Willi, síndrome de Kallman, hipoplasia pituitaria y la anencefalia indica el papel crítico del eje hipotálamo-hipofisario (Wenzler 2004).

Por otra parte, algunos estudios han indagado la posible asociación con factores ambientales, estudiando la exposición a disruptores endocrinos (p.ej., pesticidas organoclorados), aumentando el riesgo de desarrollar anomalías en el desarrollo intrauterino del aparato genital masculino (Guzmán y col. 2007).

Los compuestos disruptores endocrinos (DE) se encuentran en el medio ambiente y presentan actividad estrogénica, antiestrogénica o antiandrogénica; son altamente lipofílicos y se almacenan por periodos prolongados en el tejido adiposo. La exposición materna a DE durante el embarazo permite su paso al producto a través de la placenta, lo que podría afectar el eje reproductivo fetal (Guzmán y col. 2007).

El descenso espontáneo tardío y sus implicaciones a futuro

El testículo no descendido se asocia con efectos adversos en la salud reproductiva masculina, es decir, un aumento de 4-5 veces de riesgo de desarrollar cáncer testicular y riesgo de infertilidad (Virtanen y col. 2007; Plas y col. 2015; Brakel y col. 2017).

Así mismo, estudios sugieren que los hombres con descenso testicular tardío tienen menos problemas de fertilidad que aquellos pacientes con no descenso testicular. Sin embargo, el estudio de seguimiento a largo plazo no encontró diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de fertilidad entre ambos grupos (Brakel y col. 2017).

La infertilidad en pacientes con CO tiene relación con la falla en el inadecuado descenso testicular, la edad en el momento de la corrección quirúrgica y las consecuencias del tratamiento (Vignera y col. 2009). Se ha citado que alrededor del 90% de los pacientes con CO bilateral sin tratar en última instancia desarrollan azoospermia, frente al 0,4 - 0,5% en la incidencia de la población general (Goel y cols. 2015). Por otra parte, la incidencia de la azoospermia se reduce hasta 32% en los pacientes tratados farmacológicamente

e inclusive existe una disminución de hasta el 46% después de la orquidopexia bilateral; sin embargo, en la CO unilateral, la incidencia de la azoospermia es de un 13%, (Goel y col.2015).

En pacientes con CO, las alteraciones en la fertilidad se han atribuido a la reducción en el número total de células germinales y a una defectuosa maduración de las mismas (Vignera y col. 2009; Goel y col. 2015). Así también, la diferenciación de los gonocitos (pre-espermatogonias) en espermatogonias se retrasa y es ineficaz. Además de esto, se presenta una reducción en el número de células germinales por tubo seminífero (Goel y col.2015).

Algunos estudios han demostrado mediante la toma de biopsias testiculares durante la orquidopexia que en los pacientes con CO con una edad mayor de dos años, resultan en una disminución en el recuento de células germinales por túbulo en un 10-40% en comparación con el grupo de niños sanos (Goel y col. 2015). En otro estudio se analizaron 178 biopsias testiculares de 89 niños que fueron sometidos a orquidopexia y biopsia testicular bilateral, indicando tres grupos: alto, medio y bajo riesgo de infertilidad, con base a la presencia de espermatogonias. Todos los hombres en el grupo de alto riesgo de infertilidad resultaron con oligospermia después de la pubertad, y el 20% de ellos presentaron azoospermia. Estos pacientes tenían recuentos de espermatozoides 25 veces menor en comparación con el grupo control. De igual modo se realizó una correlación entre la histología testicular y las concentraciones hormonales confirmando una deficiencia de gonadotropinas en la mayoría de estos pacientes (Goel y col. 2015). También se ha observado una tendencia a la azoospermia en biopsias testiculares de pacientes con CO con hipoplasia de las células de Leydig en los testículos con CO, ocasionando una estimulación hormonal deficiente de las células de Leydig debido al eje hipotálamo-hipófisis-testículo defectuoso. Es probable que las células de Leydig no sean capaces de provocar una oleada de testosterona de magnitud suficiente para efectuar la maduración de las células germinales (Vignera y cols. 2009; Goel y cols.2015).

Estrés oxidante en la criptorquidia

El oxígeno es un elemento que presenta un doble efecto fisiológico; es esencial para el desarrollo de la vida aerobia y posee efectos tóxicos inherentes a su estructura. Del oxígeno se derivan moléculas inestables denominadas radicales libres (RL) que pueden causar daño a nivel celular, generando así lo que se denomina como estrés oxidante. Este, resulta de un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y su eficiente eliminación al sobrepasar la capacidad del sistema antioxidante, (Corrales y Muñoz, 2012).

En el ser humano, las ERO participan en los mecanismos etiopatogénicos primarios o en sus consecuencias en más de cien enfermedades de gran importancia clínica, como la CO, varicocele, enfermedades neurodegenerativas entre otras (Corrales y Muñoz, 2012; Mayorga y col.2015).

En la CO, el aumento de temperatura testicular ocasiona un estrés oxidativo dentro del testículo (Turner y col. 2008)

La mitocondria, a través de la cadena respiratoria, constituye la principal fuente de generación de las ERO producidas en la CO, las cuales son moléculas de oxígeno altamente reactivas transitorias con un alto grado de reactividad química, debido a electrones desapareados en su último orbital (Turner y Lysiak 2008). Éstas pueden estimular la lipoperoxidación, la cual es una reacción de oxidación en cadena y es asociada con pérdida de la función e integridad de la membrana (Sanocka y Kurpisz 2004). El primer paso del proceso de lipoperoxidación, consiste en la abstracción de un átomo de hidrógeno al grupo metilo adyacente al doble enlace, posteriormente ocurre la propagación, ocasionada por la rápida reacción con el oxígeno para formar al radical peroxil, el ciclo de propagación puede continuar indefinidamente hasta que uno de los sustratos es consumido o terminado en la reacción radical-radical (Chihuail y col. 2002; Sanocka y Kurpisz, 2004).

Las ERO más importantes involucradas en la CO son el anión superóxido, el ion hidroxil y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último es el principal ERO y, aunque no es un RL, es la molécula que sugiere estar involucrada en un mayor daño celular, causando un cambio deletéreo en las lipoproteínas de las membranas celulares, además de daño testicular, que afecta a las espermatogonias, la producción de espermatozoides y la fertilidad masculina (Vigueras y col. 2009). También ocasionan que las células presenten un

aumento en la transcripción de genes (Ced-9, bCL-2, Bax, Bcl-x forma alargada), los cuales provocan la apoptosis de las células germinales. Durante la espermatogénesis, la apoptosis es un proceso normal, pero cuando esto sobrepasa las condiciones normales se presenta un cuadro patológico. Esto aumenta la síntesis de las proteínas de choque, ocasionando una saturación del sistema antioxidante endógeno de las células germinales que incluye a la superóxido dismutasa (SOD) y un reducido sistema para glutatión (GHS) que incluye a glutatión peroxidasa (GHS-px), glutatión reductasa (GHS-rd) y glutatión-S-transferasa (GHST). También se sabe que los espermatozoides y las espermátidas son capaces de convertir O_2^- a H_2O_2 , pero con mayor dificultad metabolizan H_2O_2 y llevan a la saturación de un sistema protector contra peróxido. Por lo tanto el peróxido formado puede convertirse en radical hidroxilo (Sandstrom y col. 1994).

Los tratamientos antioxidantes pueden aumentar el sistema antioxidante endógeno, y en consecuencia inhibir la producción de ERO e impedir la lipoperoxidación.

Antioxidantes

En la actualidad existe gran interés en contribuir con un aporte que enriquezca el conocimiento sobre los antioxidantes y su papel en la salud humana. Estos incluyen los antioxidantes endógenos y los exógenos que se pueden encontrar en los alimentos (Coronado y col. 2015) y que en general, pueden aumentar el sistema de defensa antioxidante endógeno en las células, así como inhibir vías que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno o funcionar como estabilizadores de RL. De igual manera, asociado a la función antioxidante se considera el proceso de óxido-reducción, el cual consta de dos momentos básicos: a) oxidación que implica pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno en la molécula, b) reducción, en donde se ganan electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno. Así el oxidante se reduce al reaccionar con aquella molécula que oxida. Este proceso es cotidiano en el organismo humano y representa el conocido par óxido-reductor o balance redox (Coronado y col. 2015).

Antioxidantes endógenos

Las ERO se generan constantemente durante el metabolismo normal de cualquier célula corporal. Sin embargo, la acción sinérgica del sistema de defensa antioxidante endógeno es esencial para proteger contra los daños ocasionados por los RL en las células. Las principales enzimas del sistema antioxidante endógeno son SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (GHS-px), que más tarde necesitan de otras enzimas para lograr reducir el O₂ (Zini y Schlegel, 1997; Turner y Lysiak, 2008).

Se ha propuesto que las células germinales cuentan con un eficiente sistema endógeno antioxidante de SOD y reducido sistema para GHS-px, pero presentan dificultad para metabolizar el H₂O₂, lo que resulta en la saturación de su sistema protector contra el peróxido y este se convierte a radicales OH^{*}, que son altamente tóxicos. En el caso de un descenso testicular tardío el sistema antioxidante endógeno pudiera estar disminuido y los niveles de EROs en el testículo estar aumentadas (Ikeda y col. 1999). Éstas EROs son moléculas transitorias con un alto grado de reactividad química (Vigueras y col. 2011), causando daño extenso al ADN, peroxidación lipídica y degradación de proteínas (Diemer y col. 2003), lo que puede afectar a las espermatogonias de por vida y reducir la producción de espermatozoides y la fertilidad masculina (Vigueras y col. 2011).

La Epigallocatequina-3-galato como un antioxidante exógeno

En la actualidad se han realizado una cantidad considerable de estudios sobre la actividad antioxidante y compuestos bioactivos de plantas, realizando su extracción mediante varios procedimientos, mostrando en su mayoría una alta correlación entre la actividad antioxidante y el contenido polifenólico total. Esto indica que los principales contribuyentes para la actividad antioxidante parece deberse principalmente a la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas y alcaloides, siendo flavonoides y ácidos orgánicos los más reportados (Fernandes y col. 2017).

Recientemente, dentro de los flavonoides se ha estudiado un componente del té verde, la Epigallocatequina-3-galato (EGCG), la cual es producida a partir de las hojas de la planta *Camellia sinensis* (Chowdhury y col. 2016), demostrando ser benéfica en la salud para una amplia variedad de enfermedades, debido a su

potente actividad antioxidante e inclusive anti-inflamatoria (Chowdhury y col. 2016), superando el efecto de la vitamina E (Sevilla y Mach 2014; Afzal, 2015).

La EGCG es el más abundante de los compuestos polifenólicos pertenecientes a las catequinas en el té verde, representando el 50%-80% del total de las catequinas (Kapoor y col. 2017). Una taza de té verde puede contener de 200 a 300mg de EGCG. La EGCG también puede encontrarse en otros vegetales como las manzanas, las moras, los duraznos y las nueces; sin embargo, la principal fuente es el té verde (Harnly y col. 2006).

Los estudios realizados para evaluar el efecto del consumo de EGCG muestran las actividades antioxidantes y antiinflamatorias. Esto aumenta los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes e inhibe vías de activación del receptor Toll-like 4 (TLR4) y el factor nuclear-B (NF- β), lo que conduce al aumento de la producción de citoquinas inflamatorias (Oliveira y col. 2016).

Se ha observado que la presencia de grupos fenólicos sensibles a la oxidación y que pueden generar quinona en la estructura de la EGCG son responsables de la actividad antioxidante y neutralización de RL. La actividad antioxidante se incrementa adicionalmente por la presencia de grupos hidroxilo en sus anillos A, B y en su grupo galato (Johnson y Loo 2000; Zaveri, 2006; Oliveira y col. 2016; Singh y col. 2016). Se ha identificado que el anillo B es el principal sitio para las reacciones antioxidantes de la EGCG (Valcic y col. 1999).

En general los antioxidantes fenólicos interfieren con la oxidación de lípidos y otras moléculas, como el ADN, mediante la rápida donación de átomos de hidrógeno a los radicales estabilizándolos y por tanto, evitando su interacción con otras moléculas. Como resultado se genera una molécula oxidante que es relativamente estable, por lo que no promueve reacciones adicionales como radicales; además de estimular el sistema endógeno antioxidante (Valko y col. 2006).

Algunos estudios han investigado los efectos de la EGCG sobre las mitocondrias desde los niveles subcelulares hasta el organismo completo y han planteado importantes hallazgos con respecto a la capacidad de este polifenol para modular la función mitocondrial, con consecuencias que van desde el control

bioenergético hasta alteraciones celulares (Oliveira y col. 2016).

Otros estudios, informan que la EGCG inhibe más eficazmente la actividad de la ATPasa en las mitocondrias obtenidas de cerebro de rata más que otras catequinas. Este es un hallazgo importante, ya que la regulación de ATPasa puede conducir a un aumento de los niveles de difosfato de adenosina (ADP) o monofosfato de adenosina (AMP), posiblemente influyendo en la modulación de las vías de señalización implicadas en el metabolismo celular y el destino celular, así como en el control de la biogénesis mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual la EGCG podría modular la ATPasa sigue siendo incierto (Oliveira y col. 2016).

La eliminación de los RL, atribuida a la EGCG, se manifiesta en la eliminación de moléculas como radicales aniónicos superóxidos e hidroxílicos, ERO, capaces de inducir daños al ADN y a otras estructuras de las células. Además la EGCG reacciona con los radicales peróxidos y, de esta forma, interrumpe la cadena de reacciones que lleva a la peroxidación lipídica (Valko y col. 2006).

Biodisponibilidad de la EGCG

La EGCG se absorbe principalmente en el yeyuno y el íleon, a través de difusión en las células epiteliales. Se encuentra presente en el plasma en una forma libre en gran medida (más del 77%). Estudios sugieren que la EGCG parece difundir bien a través de los tejidos en el cuerpo e inclusive se distribuye a nivel fetal, placentario y atraviesa la barrera hemato-encefálica (Oliveira y col. 2016).

La EGCG se metaboliza en formas metiladas en diferentes órganos por catecol-O-metiltransferasa (COMT), produciendo casi di-metoxil-EGCG. Por otro lado, la EGCG puede ser glucurono y/o sulfo-conjugada y puede ser metabolizado por la microbiota intestinal. Sus metabolitos se han identificado en el plasma y la orina de voluntarios tras la digestión del té verde. Los metabolitos de EGCG son excretados tanto a través de vías biliares como urinarias. Sin embargo, sólo los rastros de EGCG se detectan en la orina después de la administración oral, mientras que la excreción biliar de EGCG se ha informado

previamente en ratas. La vida media para la EGCG es alrededor de 3 horas, en una forma purificada o de infusión de té (Oliveira y col. 2016).

Ahora bien, los mecanismos de la EGCG, así como sus beneficios están comenzando a descubrirse. Los mecanismos implican interacciones con un número de vías de señalización celular, que son importantes para las funciones celulares. Tales interacciones parecen modificar éstas vías de señalización, que a su vez previenen la progresión de las enfermedades; sin embargo, una mejor comprensión de cómo interactúa la EGCG a nivel celular queda aún por establecerse (Chowdhury y col. 2016).

Justificación

La CO en humanos es la anomalía genital masculina más común al nacimiento; afecta a nivel mundial alrededor del 2% al 4% de los recién nacidos a término y hasta un 30% de los bebés prematuros, con una frecuencia <1% hacia los nueve meses de edad y permanece constante a lo largo de la niñez. Ésta anomalía es de sumo interés, debido a que el testículo que no desciende entra en un desbalance entre las ERO y antioxidantes, ocasionando estrés oxidante. Existen condiciones en las cuales se impide la segunda fase del descenso testicular intrauterino y que posterior al nacimiento en los primeros seis a doce meses se presenta este proceso de forma espontánea tardía. Sin embargo, durante el periodo en el que el testículo se ubica por arriba de la zona escrotal se somete a estrés oxidante afectando, probablemente la sobrevivencia y diferenciación de las células testiculares alterando, posiblemente la espermatogénesis futura, proceso que no ha sido investigado hasta el momento. Desde 1996 algunos estudios han discutido las actividades antioxidantes totales de componentes polifenólicos de los tés, vinos, jugo de frutas y vitaminas (C y E), con el fin de identificar alimentos apropiados que son ricos en componentes de protección con propiedades antioxidantes, dichos estudios han señalado el uso de los polifenoles con mayor actividad antioxidante. Algunos otros estudios, en la actualidad, han planteado el uso de componentes polifenólicos como una estrategia terapéutica y protectora basada en neuroprotectores naturales, después de haber administrado diferentes tipos de antioxidantes a diferentes dosis en la evolución del desarrollo del glaucoma (Aranda y col. 2017). En los últimos años numerosos estudios han

avalado los efectos beneficiosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, siendo la EGCG, el polifenol con gran actividad antioxidante, atrapadora y estabilizadora de RL. Esto es importante porque los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes, presentando efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenuar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Presentan efectos antiinflamatorios, siendo capaces de modular procesos de apoptosis (Quiñones y col. 2012). Aun así, dichos resultados representan importantes hallazgos que deben ser estudiados; pues el conocimiento de la EGCG como protector en un modelo experimental con CO con descenso espontáneo tardío, podría aportar las bases de un tratamiento terapéutico.

Objetivo general

Evaluar el efecto protector antioxidante de la epigallocatequina-3-galato en un modelo con criptorquidia y descenso espontáneo tardío.

Objetivos específicos

Determinar el papel de EGCG sobre:

1. La morfología testicular característica de la criptorquidia
2. La apoptosis y proliferación de células germinales
3. La actividad del sistema endógeno antioxidante
4. Los parámetros endócrinos
5. Valores espermáticos

Hipótesis

El estrés oxidante generado en la criptorquidia puede provocar alteraciones en la espermatogénesis futura de manera que la administración de un antioxidante reducirá dichos efectos en un modelo de CO con descenso espontáneo tardío.

Material y Métodos

Se emplearon 28 ratas macho Wistar a partir del 3er día post parto (dpp) provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría. El manejo de los animales se realizó con 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 los reglamentos internos de principios de ética y trato a los animales del Instituto Nacional de Pediatría (CICUAL).

Para la obtención de las crías se contó con hembras gestantes que se mantuvieron en cajas individuales de policarbonato en ciclo de 12 horas luz-12 horas oscuridad. Temperatura ambiente entre 17 a 24 °C. Alimento en *pellets* (TEKLAD GLOBAL 18% PROTEIN RODENT DIET®) y agua a libre acceso. El destete se realizó a los 21dpp.

La CO se desarrolló por la administración de 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich USA) disuelta en 50 μ l de aceite de soya (0.1 μ g vía subcutánea (v.s.c)) del 3 al 33 dpp de acuerdo a lo reportado por Viguera y col. 2004.

La EGCG (Cayman Chemical, USA) se administró al grupo control a la misma dosis empleada en los grupos con CO (25 mg/kg) debido al elevado costo del producto se preparó en los grupos control a una dosis de 25 mg/kg. En los grupos criptorquídicos se usaron una dosis de 15 mg/kg y la otra a 25 mg/kg, administrándose del 34 al 85 dpp vía intraperitoneal (v.i.p). Las dosis de EGCG administradas se tomaron como base de un estudio donde se sugiere que la EGCG puede ser considerada como un antioxidante (Meng y col. 2008).

Las 28 ratas se distribuyeron en 7 grupos y con el fin de descartar el efecto en el uso del vehículo del estradiol para inducir CO, así como el efecto de la EGCG se asignaron 4 grupos controles, y 3 grupos con CO, con cuatro unidades experimentales cada una, como se muestra a continuación (Figura 1):

Grupo 1: Control sano sin manipulación alguna y eutanasia a los 86 dpp denominado **CS**.

Grupo 2: Control sano con administración v.s.c de vehículo (aceite de soya) del 3 al 33 dpp y eutanasia a los 86 dpp, denominado **CS/V**.

Grupo 3: Control sano con administración v.i.p. de EGCG a partir del 34 al 85 dpp (25 mg/kg) y eutanasia a los 86 dpp, denominado **CS/EGCG**.

Grupo 4: Control sano con administración del vehículo del estradiol (aceite de soya) + EGCG. Administración del vehículo v.s.c del 3 al 33 dpp con administración v.i.p. de EGCG del 34 al 85 dpp y eutanasia al 86 dpp, denominado **CS/V/EGCG**.

Grupo 5: Con CO desarrollada por la administración de 17β -estradiol v.s.c del 3 al 33 dpp con el vehículo de la EGCG del 34 al 85 dpp y eutanasia al 86 dpp, denominado **CO/V**.

Grupo 6: Con CO desarrollada por la administración v.s.c de 17β -estradiol, como se mencionó anteriormente y administración v.i.p de EGCG (15 mg/kg) del día 34 al 85 dpp y eutanasia al 86 dpp, denominado **CO/EGCG15**.

Grupo 7: Con CO desarrollada por la administración v.s.c de 17β -estradiol, como se mencionó anteriormente y administración v.i.p de EGCG (25 mg/kg) del día 34 al 85 dpp y eutanasia al 86 dpp, denominado **CO/EGCG25**.

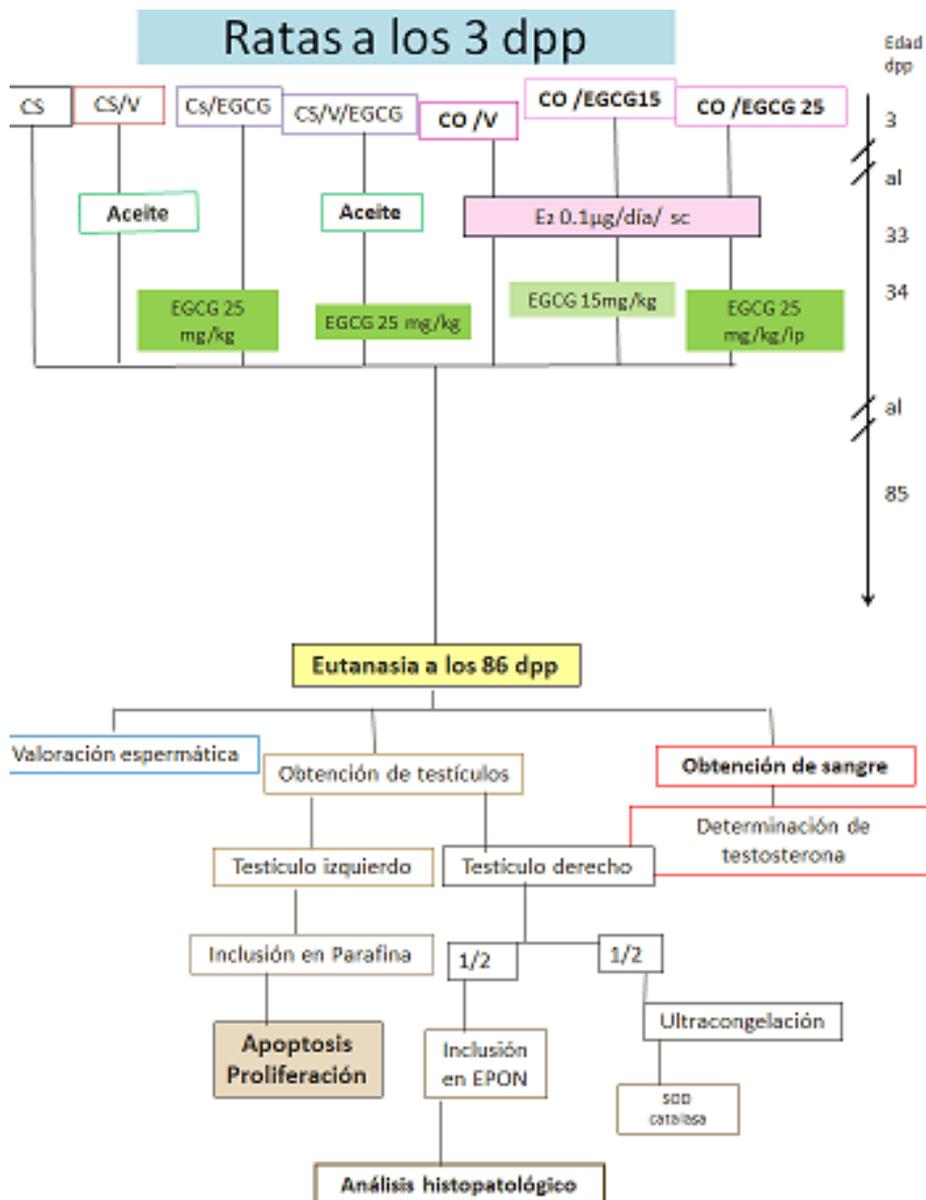


Figura 1. Distribución de los grupos y su manejo experimental

Realización de la eutanasia:

Una vez que los animales cumplieron los 86 dpp se realizó la eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (PISA Agropecuaria, México) v.i.p a una dosis de 40 mg/kg, posteriormente se continuó con el procesamiento del material biológico. En la exploración *postmortem* se corroboró la ubicación de los testículos. Posteriormente cada testículo se disecó y pesó para obtener la relación con respecto al peso corporal (índice gonadosomático). El testículo izquierdo se fijó en paraformaldehído al 4% para su inclusión en parafina. Mientras que el testículo derecho se cortó a la mitad, empleando una mitad para inclusión en EPON y la otra mitad para ultracongelación a -70°C, para evaluar SOD y catalasa.

Valoración espermática: Las muestras se obtuvieron del conducto deferente y se recolectaron en recipientes de plástico estériles; para determinar la concentración y motilidad, 50 μ L de cada muestra se colocaron en 5 ml de solución salina (SSF) a 37°C, para realizar el análisis de la concentración (expresada en espermatozoides/ml) y movilidad (expresada en porcentaje), para lo cual se utilizó 10 μ L de cada muestra, que fueron colocados en una cámara de *Neubauer*. La plataforma de conteo de la cámara tiene nueve grandes cuadros con diferente número de divisiones, para la cuenta de la concentración espermática, se tomaron los cuatro extremos que contienen 16 cuadros pequeños, iniciando el conteo de izquierda a derecha. Para valorar la movilidad espermática, se colaron 10 μ L del semen diluido con SSF en una laminilla con un cubreobjetos, posteriormente se analizaron 200 espermatozoides; realizando el conteo de los espermatozoides móviles y los no móviles a 40x y los resultados se expresaron en porcentaje.

Para estudiar la morfología se realizó un frotis, el cual se dejó secar y posteriormente se realizó la tinción con HE. La morfología se observó en 200 espermatozoides, mediante un microscopio fotónico. Los resultados se expresaron como porcentaje de espermatozoides normales y anormales (defectos en las cabezas, defecto en la pieza media y defectos en la cola).

La vitalidad espermática se analizó mediante la permeabilidad al colorante vital Eosina. Se analizaron un total de 200 espermatozoides haciendo uso del

microscopio fotónico con contraste de fase (400X), diferenciando los espermatozoides vivos (no coloreados) de los muertos (coloreados) y el valor se expresó en porcentaje del total de espermatozoides.

Análisis morfológico: Los testículos de cada animal se fijaron en Karnovsky modificado por 24 horas. Posteriormente se lavaron 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 se continuó con diluciones de epón-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; empleando un ultramicrotomo (Leica modelo Ultracut-UCT) y se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% (SIGMA-ALDRICH, México), finalmente se montaron en un portaobjetos.

Análisis histológico: El análisis histológico se realizó utilizando un microscopio fotónico, evaluando por cada animal 30 túbulos seminíferos, en etapa VIII, utilizando cuatro cortes en sus secciones transversales.

a) *Área del epitelio seminífero (AE)*: Se efectuó por un solo observador en un microscopio fotónico Olympus BX 51. Por cada unidad experimental, se analizaron 30 túbulos seminíferos, en etapa VIII, utilizando cuatro cortes en sus secciones transversales. Para obtener el AE se midió el área externa del túbulo y se le restó el área de la luz tubular; dichas secciones se midieron mediante el programa Image-Pro® Plus versión 5.1 (Media Cybernetics, INC, MD, USA).

b) *Índice de Maduración del epitelio seminífero (IM)*: Se determinó de acuerdo a lo reportado por Johnsen en 1970, en donde se estableció el grado de maduración, de acuerdo a una escala que va de 1 a 10, en donde 10 corresponde a una espermatogénesis completa con células en diferentes estadios de diferenciación con abundantes espermatozoides en la luz del epitelio seminífero y 1 a la ausencia de células en el túbulo seminífero (ANEXO I).

c) *Índice histopatológico (IH)*: Se evaluó de acuerdo al daño observado, en 30 túbulos seminíferos en etapa VIII, en cada unidad experimental, en sus secciones transversales (ANEXO II). Utilizando una escala que va de 1 a 6, asignando el valor de acuerdo a la alteración observada (Vigueras y col. 2009).

Determinación de la proliferación celular en espermatogonias por Inmunohistoquímica

Los testículos se fijaron en paraformaldehído al 4% (SIGMA-ALDRICH, México), durante 24 horas, se realizaron lavados con PBS y se colocaron las muestras en el histoquinete con la finalidad de deshidratarlas e incluirlas en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 μm de grosor en un micrótomo (Leica RM 2155, Alemania) y se montaron en laminillas cubiertas con grenetina. Posteriormente las muestras se desparafinaron en estufa a 60°C durante 30 minutos e hidrataron en alcoholes graduales de Xilol, alcohol absoluto al 100%, alcohol absoluto al 90%, alcohol absoluto al 80%, alcohol absoluto al 70%; subsecuentemente se realizó el desenmascaramiento de los epítopes colocando las muestras en citrato de sodio a 0.01M a un pH de 6 durante 15 minutos en baño maría en el horno de microondas. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario (PCNA Rabbit polyclonal sc-7907, USA) a una dilución 1:50 por 24 horas; después se enjuagaron con PBS-Twin al 0.1%, y se incubaron con el anticuerpo secundario (biotinylated goat anti rabbit igG, USA vector) a una dilución 1:200 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. Se determinó en 10 túbulos seminíferos por animal, cortados transversalmente en etapa VIII del ciclo del epitelio seminífero; la proporción de células en la periferia positivas al anticuerpo en relación al área del epitelio seminífero de cada uno de los túbulos observados se realizó con el sistema de análisis de imágenes (Image-Pro Plus 6.0).

Determinación de apoptosis por la técnica de TUNEL

La muerte celular por apoptosis se determinó mediante la técnica de TUNEL, usando el kit In Situ Cell Death Detection Kit (Sigma, México). Se realizaron cortes de tejido incluido en parafina de 4 μm de grosor, colocándose en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L- lisina (SIGMA, México). Las laminillas se desparafinaron en estufa durante 30 minutos a 60°C e hidrataron en alcoholes graduales de Xilol, alcohol absoluto al 100%, alcohol absoluto al 90%, alcohol absoluto al 80%, alcohol absoluto al 70%. Para lograr la identificación de las

células germinales, las laminillas se lavaron con la solución balanceada de Hanks (GIBCO, NY, USA) y se incubaron con DAPI (SIGMA, México) en una concentración de 1µg/ml, posteriormente se les colocó una solución de bloqueo de H₂O₂ al 0.3% en metanol. Se lavaron con una solución de fosfatos 0.1 M (PBS) (J.T. Baker, USA) e incubaron en una solución permeabilizadora de Triton X-100 al 0.1% (SIGMA- Aldrich, St. Louis Mo, USA). Posteriormente se lavaron con PBS e incubaron en la solución de TUNEL (Roche Diagnostic Corporation, USA). Se lavaron con PBS y se montaron con medio de fluorescencia (DAKO, USA, Fluorescent Mounting Medium).

El índice de apoptosis (IA) se determinó en cortes transversales considerando el número de células positivas con relación al área por túbulo seminífero. Se contaron al menos 30 túbulos seminíferos por animal.

Determinación de la actividad de SOD y catalasa

Para obtener la actividad enzimática de SOD y Catalasa, se realizó la valoración de la concentración de proteína. Esto se realizó mediante el método de Lowry, empleando el kit Protein, Micro Lowry, Modification (Sigma-Aldrich, México). El proceso se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La actividad de SOD se midió usando un kit de actividad de SOD (Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, New York). Este ensayo evalúa la capacidad de SOD para reducir la concentración de iones superóxido, generada a partir de la conversión de xantina y oxígeno en ácido úrico y peróxido de hidrógeno por xantina oxidasa. La actividad de SOD se determinó a partir del porcentaje de inhibición de la velocidad de formación de WST-1formazan, un producto coloreado que absorbe luz a 450 nm. Cada muestra se cargó en una placa de 96 pocillos. Inmediatamente después de la adición de xantina, la placa se transfirió a un lector de placas Modulus™ II Microplate Reader (Turner BioSystems, Inc. USA) y la absorbancia se midió a 450 nm cada minuto durante 10 minutos a temperatura ambiente. La actividad de SOD en las muestras se calculó correlacionando el porcentaje de inhibición de formación de WST-1formazán con el logaritmo de las unidades SOD en una curva de calibración estándar.

Para la determinación de Catalasa se utilizó el kit *Catalasa fluorometric detection* (Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, New York). En placas de 96 pozos se asignaron pozos curva, pozos muestra y pozos blanco. Se pipetearon 50

μl del estándar o de la muestra en los respectivos pozos, seguidos de 50 μl de H_2O_2 en cada pozo. La actividad de catalasa se evaluó mediante la reacción de degradación de H_2O_2 realizada por catalasa, a temperatura ambiente. Se utilizó un reactivo de detección no fluorescente para medir el sustrato de H_2O_2 sobrante de la reacción. Se midió la fluorescencia a 600 nm.

Determinación sérica de testosterona

Se obtuvo sangre por punción cardiaca el día 86 dpp, misma que se dejó reposar 1 h y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, para obtener el suero de cada muestra y se almacenaron en ultracongelación. Posteriormente, los sueros se depositaron en tubos de 1ml, se homogeneizaron e introdujeron en el equipo de quimioluminiscencia Architect i1000SR, analizador de Inmunoensayo completamente automatizado con una alta sensibilidad de hasta 12 ng/ml, especificidad, con CV intra ensayo de 3% e inter ensayo de 5%. Inicialmente el equipo combina muestras, diluyentes específicos de ensayo y micropartículas paramagnéticas recubiertas de anti-testosterona (oveja, monoclonal). Posteriormente, la testosterona presente en la muestra se une a las micropartículas recubiertas con anti-testosterona. Después de la incubación, se añade conjugado de testosterona marcado con acridinio a la mezcla de reacción. Después de una incubación y un lavado adicional, se añaden soluciones de Pre-Trigger y Trigger a la mezcla de reacción. La reacción quimioluminiscente resultante se mide como unidades de luz reactiva. Existiendo una relación inversa entre la cantidad de testosterona y las unidades de luz reactiva detectadas por la óptica del sistema ARCHITECT. La concentración final se expresó en ng/ml.

Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva para presentar los datos agrupados de acuerdo a las variables estudiadas en cada instancia (Anexo III), previa comprobación de homogeneidad de varianzas. Las variables que cumplieron con los supuestos del análisis de varianza se corrieron como muestras paramétricas y las variables que no cumplieron con los supuestos del análisis se corrieron como no paramétricas. Para el análisis de valores paramétricos del IH, IM, AE, IA, IP y SOD se empleó ANOVA, seguida de una comparación múltiple de Tukey (Anexo IV). Para el

análisis estadístico de valores no paramétricos de IG, concentración sérica de Testosterona, concentración espermática, espermatozoides normales, % de movilidad espermática, % de viabilidad espermática, alteraciones morfológicas del espermatozoide y catalasa, se realizó una comparación múltiple con la prueba de Kruskal Wallis y Mann-Whitney (Anexo V). Se consideró en todos los casos una significancia de $p < 0.05$. Los datos se procesaron de manera individual por grupo sin sacar promedios mediante el programa estadístico SSPS Statistics 22.

Resultados

Se observó en los animales controles que el descenso testicular se concluyó al día 21 dpp y en los animales con inducción de CO por la administración de 17β -estradiol, una vez retirado el esteroide a los 33 dpp, el descenso testicular espontáneo se llevó a cabo al 43 dpp.

Índice gonadosomático

En la variable del índice gonadosomático (Anexo V. tabla D) al comparar al CS con cada grupo control no se observaron diferencias significativas entre estos grupos ($p > 0.05$); al comparar al grupo CS con cada grupo con CO, se observó una tendencia a la baja sin diferencia significativa ($p > 0.05$). Al comparar el grupo CO/V con cada uno de los demás grupos con CO no mostró diferencias significativas entre estos grupos ($p > 0.05$), Figura 2.

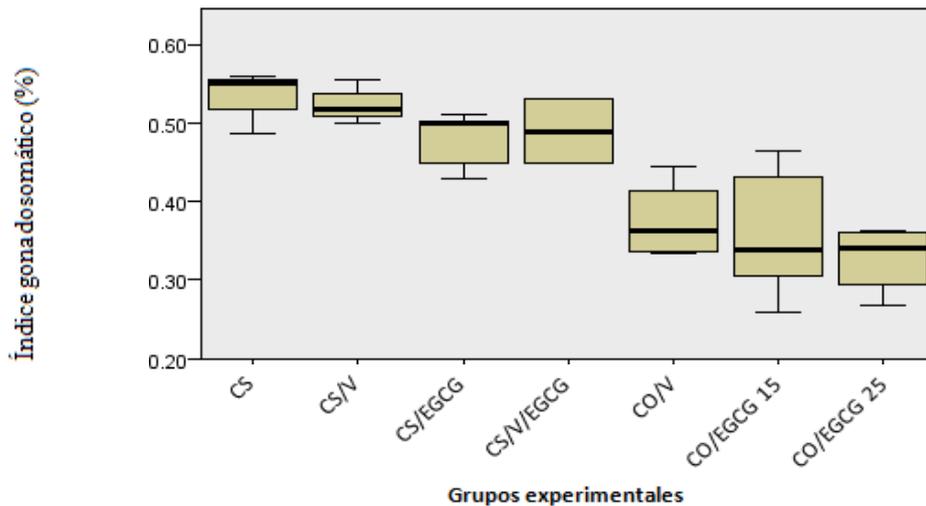


Figura 2. Índice Gonadosomático de la rata. a, $p < 0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos) y b, $p < 0.05$ (CO vs cada uno de los demás grupos). Control sano (CS), control sano- vehículo (CS/V), control sano con EGCG (CS/EGCG), control sano-vehículo-EGCG (CS/V/EGCG), CO- vehículo (CO/V), CO- EGCG a una dosis de 15 mg/kg, CO-EGCG a una dosis de 25 mg/kg. Se observa una tendencia a la baja en los grupos con CO en comparación con CS.

Valoración espermática

En cuanto a las variables de concentración espermática y espermatozoides normales, al comparar CS con cada uno de los demás grupos, se encontró diferencia significativa con CO/EGCG25, CO/EGCG15 y CO/V; también se observó diferencia significativa al comparar CO/V con los grupos controles y con CO/EGCG25, el cual tuvo diferencia con CO/EGCG15. En la variable de movilidad el grupo CO/EGCG25 presentó diferencia significativa al compararlo con CS, CO/V y CO/EGCG15. En el porcentaje de viabilidad el grupo CS al compararlo con cada uno de los demás grupos se observó diferencia significativa con CO/V, el cual presentó diferencia con los grupos controles.

Por otro lado a una dosis de 25 mg de EGCG (CO/EGCG25) se observó un aumento en las alteraciones del espermatozoide como dobles colas, con gota citoplasmática y con doble cabeza ($p < 0.05$) Cuadro 1.

Grupos experimentales	Concentración espermatozoides/ml	Espermatozoides normales (%)	Movilidad (%)	Viabilidad (%)
CS	68850(67 300, 69 400) ^b	100 (100, 100) ^b	86.75(79, 99)	87.25(82,95) ^b
CS/V	67900(60 000,75 800) ^b	99(98.5,95) ^b	98.5(96,100) ^b	88.5(86, 93) ^b
CS/EGCG	66250(59 000,69 500) ^b	92.5(90, 95) ^b	79.5(77,83)	93.5(87, 100) ^b
CS/V/EGCG	68350(56 800, 70 400) _b	91(75,92) ^b	97.5(95,99) ^b	93.5(86, 96) ^b
CO/V	40 900 (19 700, 70 300) ^a	76(62, 79) ^a	81(75,87)	60(42, 76) ^a
CO/EGCG 15	49 350 (40 600, 58 800) ^a	89(73, 95) ^a	86.5(46,97)	75.5(44.5, 87)
CO/EGCG 25	10500(4 500, 30 100) ^{a, b, c}	45.5(32, 63) ^{a, b, c}	1.5(0, 52.5) ^{b, c}	73.5(52, 97.5)

Grupos experimentales	Cabeza de alfiler (%)	Doble cabeza (%)	Doble cola (%)	Gota citoplasmática (%)
CS	0(0,0) ^b	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
CS/V	1.5(1, 5) ^b	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
CS/EGCG	7.5(5, 10) ^b	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
CS/V/EGCG	8.5(8,25) ^b	0(0,1)	0(0,0)	0(0,0)
CO/V	24(19, 38) ^a	0(0,1)	0(0,0)	0(0,1)
CO/EGCG 15	11(5,23) ^{a, b}	0(0,0)	0(0,5)	0 (0,0)
CO/EGCG 25	10.5(6, 28) ^a	9(2,11) ^{a, b, c}	33(3,47) ^{a, b, c}	2.5(1-6) ^{a, b, c}

Cuadro 1. Valores espermáticos representados como mediana (valor mínimo y máximo) de los diferentes grupos experimentales. a, p<0.05 (CS vs cada uno de los demás grupos) b, p<0.05 (CO/V vs cada uno de los demás grupos) c, p<0.05 (CO/EGCG15 vs CO/EGCG25). Tabla E- Tabla L.

Análisis histológico

Los grupos controles (Figura 3 a, b, c y d), mostraron una espermatogénesis completa con la presencia de espermatozoides en la luz del túbulo y la presencia de células germinales en diferentes estados de desarrollo. En el caso del grupo CO/V, se observó descamación y vacuolización (Figura 3e). Al administrar 15 mg de EGCG, el grupo CO/EGCG15 se observó con un menor daño tubular e inclusive con espermatozoides en la luz del túbulo seminífero (Figura 3f); pero al administrar 25 mg de EGCG (CO/EGCG25) se observó un mayor daño al epitelio seminífero, con abundante descamación, vacuolización y plegamiento de la lámina basal (Figura 3g).

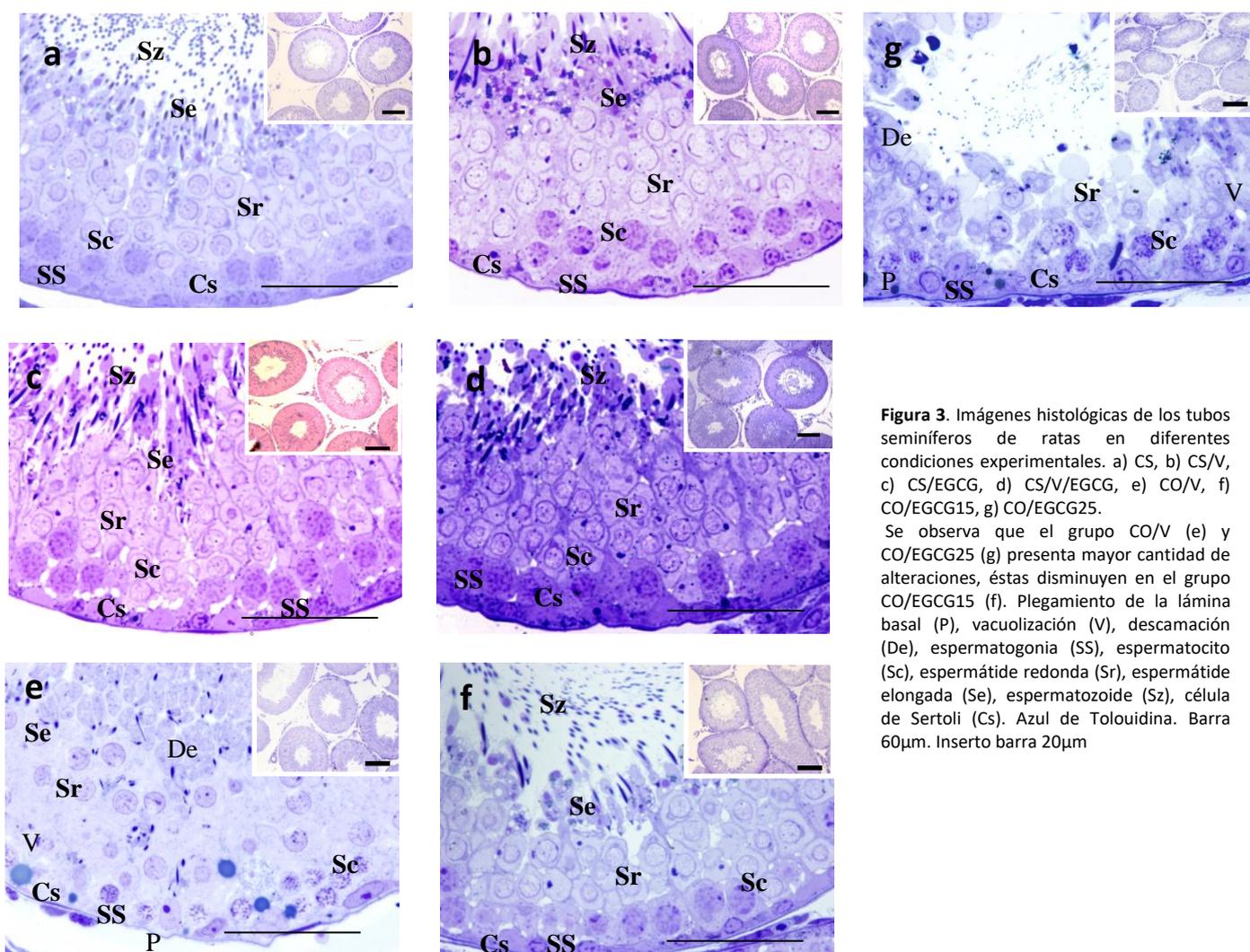


Figura 3. Imágenes histológicas de los tubos seminíferos de ratas en diferentes condiciones experimentales. a) CS, b) CS/V, c) CS/EGCG, d) CS/V/EGCG, e) CO/V, f) CO/EGCG15, g) CO/EGCG25.

Se observa que el grupo CO/V (e) y CO/EGCG25 (g) presenta mayor cantidad de alteraciones, éstas disminuyen en el grupo CO/EGCG15 (f). Plegamiento de la lámina basal (P), vacuolización (V), descamación (De), espermatogonia (SS), espermatocito (Sc), espermátide redonda (Sr), espermátide elongada (Se), espermatozoide (Sz), célula de Sertoli (Cs). Azul de Toluidina. Barra 60µm. Inserto barra 20µm

Área del epitelio seminífero, Índice de Maduración e Índice Histopatológico

En cuanto al AE (Anexo IV, tabla a), el grupo CS únicamente mostró diferencia significativa con CS/EGCG, CO/V y con CO/EGCG25. El grupo CO/V mostró una reducción significativa ($p < 0.05$) del AE al compararse con el grupo CS, y la administración de EGCG no favoreció este parámetro en los grupos con CO, observándose inclusive una tendencia a la baja significativa en el grupo CO/EGCG25.

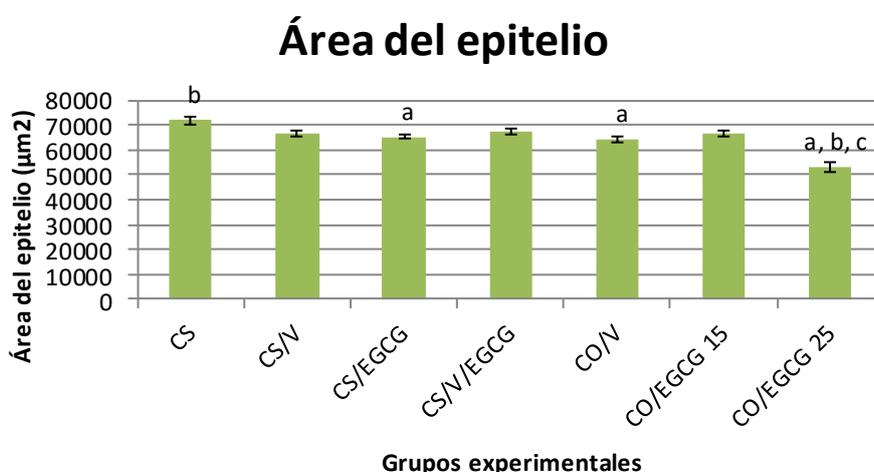


Figura 4. Área del epitelio seminífero representado por el valor de la media y el error estándar. a, $p < 0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos); b, $p < 0.05$ (CO/V vs cada uno de los demás grupos) y c, $p < 0.05$ (CO/EGCG15 vs CO/EGCG25). Se observa una diferencia significativa del grupo CS con los grupos CS/EGCG, CO/V y con CO/EGCG25. En los grupos con CO, el grupo CO/EGCG25 mostró una diferencia significativa con respecto al grupo CO/EGCG15.

En cuanto al IH (Anexo IV, tabla b), los grupos CO/V, CO/EGCG15 y CO/EGCG25 mostraron una tendencia a la alta con diferencia significativa respecto al CS (Figura 5), aumentando las alteraciones histológicas como descamación, vacuolización y plegamiento de la membrana basal (Figura 3 e, f y g), con un comportamiento inverso en el IM (Anexo IV, tabla c) con respecto al grupo CS (Figura 6). Al administrar la EGCG en dosis baja (CO/EGCG15), estos parámetros fueron significativamente ($p < 0.05$) favorecidos (el IH se redujo 33.56% y el IM incrementó 0.7% comparado con el CO/V) no sucedió así con la administración de alta dosis de EGCG (CO/EGCG25) en el cual se observó abundante descamación, plegamiento de la lámina basal, vacuolización moderada (Figura 3) y gran cantidad de apoptosis (Figura 7).

Índice histopatológico

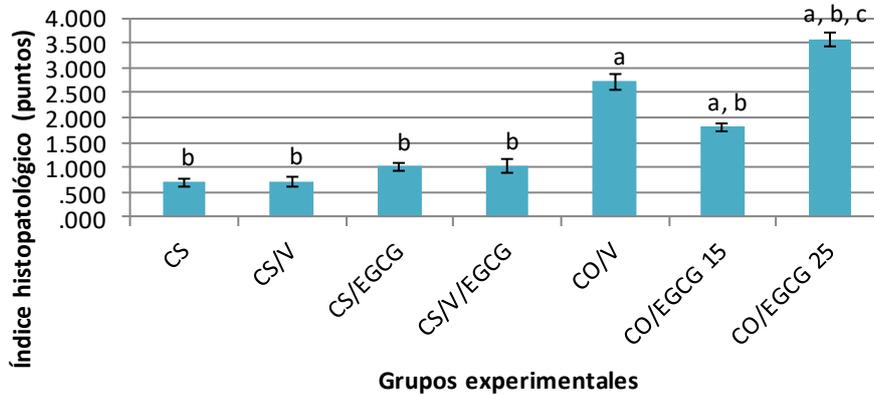


Figura 5. Índice histopatológico representado por el valor de la media y el error estándar. a, $p < 0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos); b, $p < 0.05$ (CO/V vs cada uno de los demás grupos) y c, $p < 0.05$ (CO/EGCG15 vs CO/EGCG25). Se observó un aumento significativo de las alteraciones histológicas en CO/V, CO/EGCG25, las cuales disminuyeron en el grupo CO/EGCG15.

Índice de Maduración

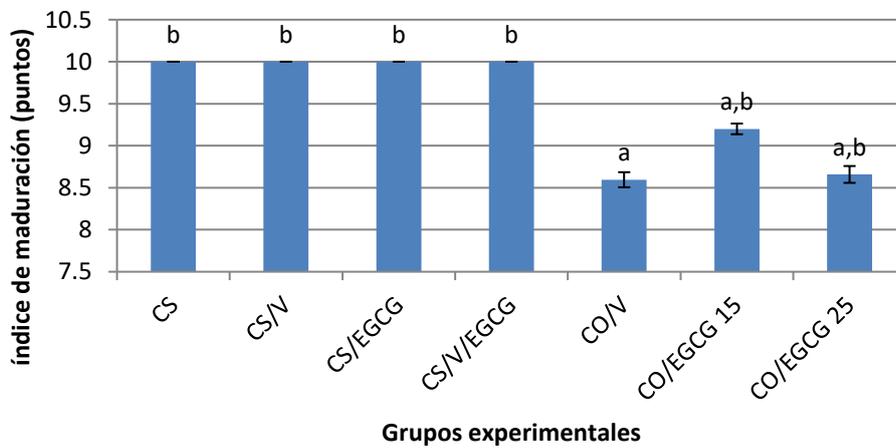


Figura 6. Índice de Maduración representado por el valor de la media y el error estándar. a, $p < 0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos); b, $p < 0.05$ (CO/V vs cada uno de los demás grupos) y c, $p < 0.05$ (CO/EGCG15 vs CO/EGCG25). Se observó una diferencia significativa en el grupo CO/V en su comparación con el CS. Al administrar 15 mg de EGCG se observó un aumento significativo (CO/EGCG15) que vuelve a disminuir con una dosis de 25 mg de EGCG (CO/EGCG25) comparándolos con el grupo CO/V.

Índice Apoptósico

En cuanto a la variable de células en apoptosis evaluada (Anexo IV, tabla e), al comparar CS con cada uno de los demás grupos, únicamente el grupo CO/EGCG25 se observó con un mayor número de células en apoptosis (Figura 8g) con una tendencia a la alta significativa (Figura 7) $p < 0.05$, misma que fue significativa cuando se comparó con el grupo CO/V e inclusive con el grupo CO/EGCG15 ($p < 0.05$); sin embargo, al administrar una dosis de EGCG de 15 mg, se observó una ligera tendencia a la alta no significativa por arriba del grupo CO/V ($p > 0.05$).

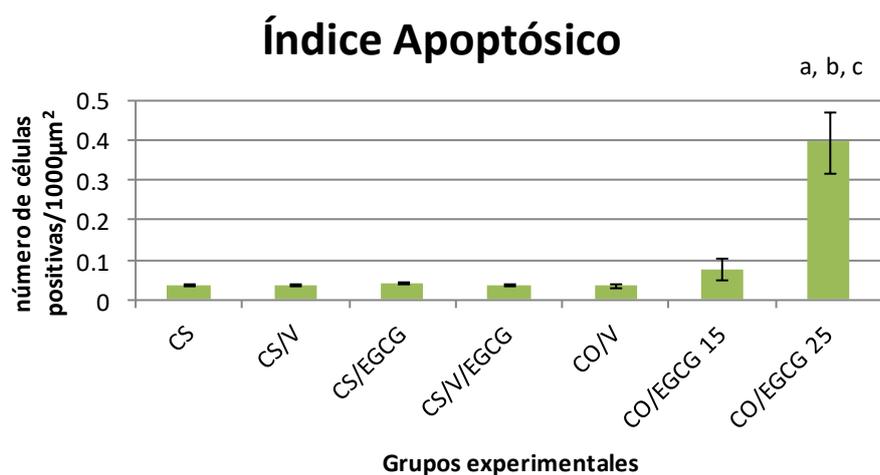


Figura 7. Cuantificación de células en apoptosis por cada 10, 000 µm² de tejido testicular, representado por el valor de la media y el error estándar. a, $p < 0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos); b, $p < 0.05$ (CO/V vs cada uno de los demás grupos) y c, $p < 0.05$ (CO/EGCG15 vs CO/EGCG25). Se observó un aumento significativo al administrar 25 mg de EGCG al compararlo con el grupo CS, CO/V y CO/EGCG15.

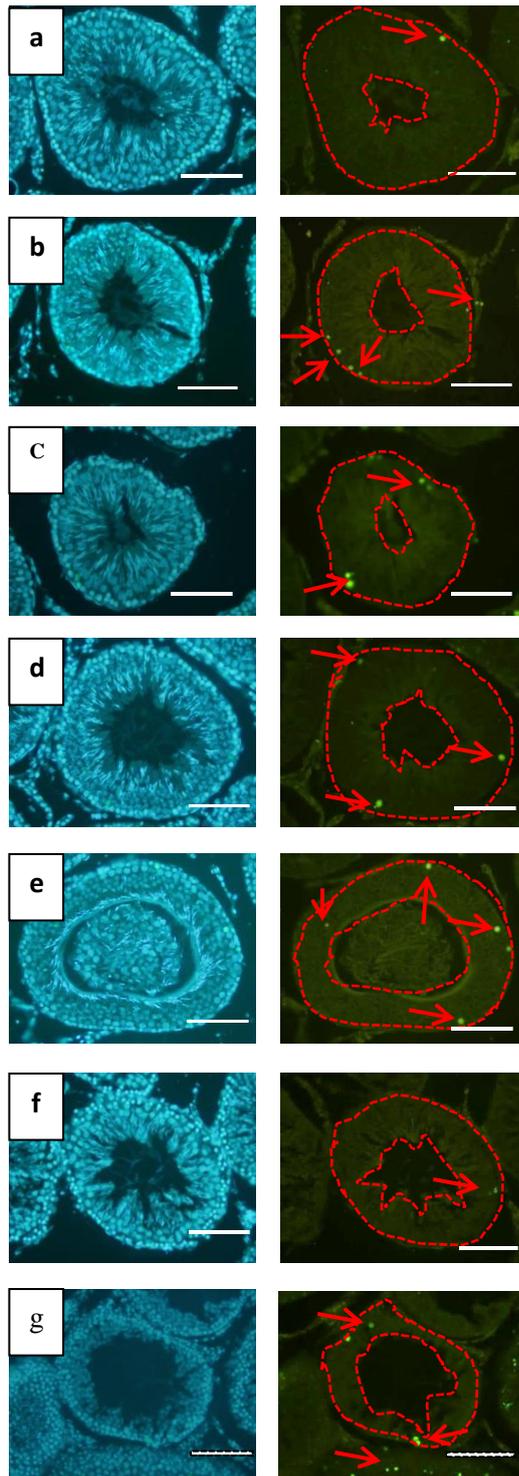


Figura 8. Imágenes en fluorescencia de tubos seminíferos de los diferentes grupos experimentales, en donde se observa la apoptosis. La primera columna tinción con DAPI y la segunda columna células en apoptosis marcadas por la reacción de Túnel (flechas rojas) dentro del AE (líneas rojas punteadas). a. Control sano (CS), b. control sano vehículo (CS/V), c. control sano-EGCG (CS/EGCG), d. control sano-vehículo EGCG (CS/V/EGCG), e. CO-vehículo (CO/V), f. CO- EGCG a una dosis de 15 mg/kg (CO/EGCG15), g. CO-EGCG a una dosis de 25 mg/kg (CO/EGCG25). Barra 20 μ m.

Índice de Proliferación

La proliferación celular (Anexo IV, tabla d) se vio favorecida al administrar EGCG a una dosis de 15 mg (CO/EGCG15), con respecto al CS y a CO/V ($p < 0.05$), observándose con un aumento del AE y mayor número de células positivas a la inmunoreactividad de la proteína PCNA (Figura 10c). Pero al administrar la dosis alta de EGCG a 25 mg tuvo una disminución significativa comparándola con CO/EGCG15 ($p < 0.05$). Por otro lado el grupo CS/V/EGCG, se observó con un aumento significativo con respecto a CO/V ($p < 0.05$). Figura 9.

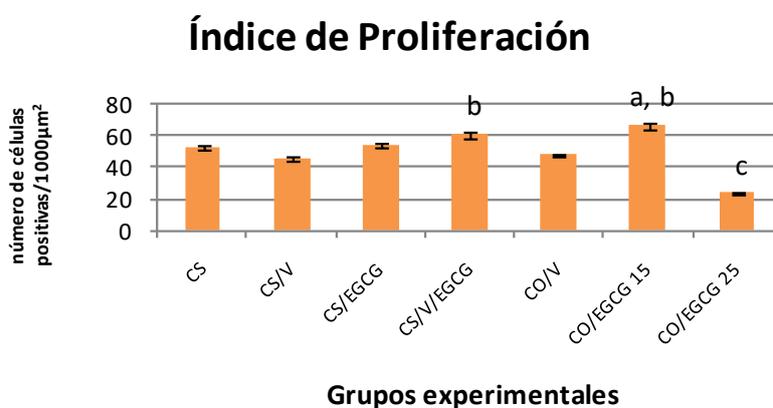


Figura 9. Proliferación representada por el valor de la media y error estándar. a, $p < 0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos); b, $p < 0.05$ (CO/V vs cada uno de los demás grupos) y c, $p < 0.05$ (CO/EGCG15 vs CO/GCG25). Se observó un aumento significativo en el grupo CO/EGCG15 en comparación con el grupo CO/V; así también, se observó una disminución significativa en el grupo CO/EGCG25 en comparación con CO/EGCG15.

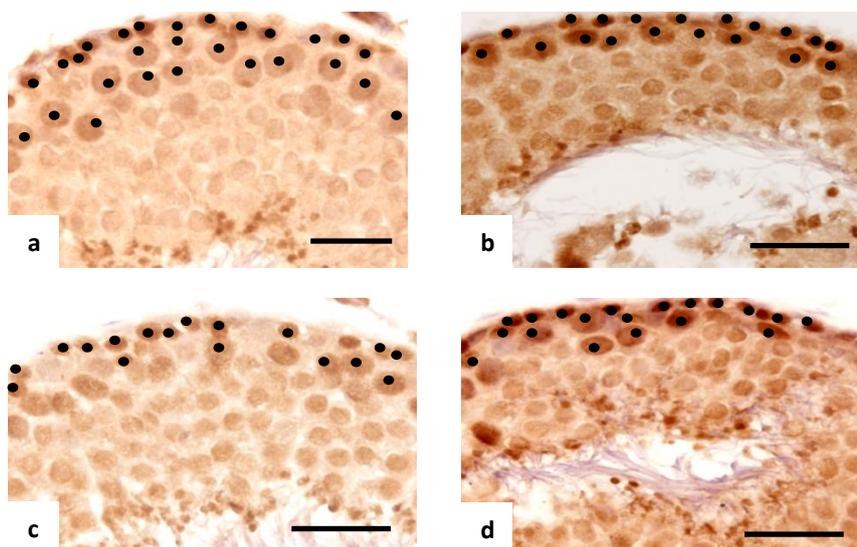


Figura 10. Imágenes histológicas de tubos seminíferos de las diferentes condiciones experimentales, en donde se muestra la inmunoreactividad a la proteína PCNA (puntos negros) característico de la proliferación. Se observan pocas células en proliferación en el grupo CO/EGCG25, además de una disminución del área del epitelio seminífero; mientras que en el grupo CO/EGCG15 se observa mayor cantidad de células en proliferación por arriba de CS con una $p < 0.05$. Técnica de Inmunohistoquímica. a. Control sano (CS), b. CO-vehículo (CO/V), c. CO con 15 mg de EGCG (CO/EGCG15), d. CO con 25 mg de EGCG (CO/EGCG25). Barra 60 μm esta barra.

Determinación sérica de Testosterona

En cuanto a la determinación sérica de testosterona (Anexo V, tabla C). Al comparar el CS con cada uno de los demás grupos, se observó que los grupos controles mostraron un comportamiento similar sin diferencia significativa, excepto el grupo CS/EGCG, el cual se observó con una tendencia a la alta no significativa ($p>0.05$); en cuanto a los grupos CO comparándolos con el grupo CS, mostraron una tendencia a la baja, siendo significativa en el grupo CO/EGCG25 ($p<0.05$). Al realizar la comparación del grupo CO/V con cada uno de los demás grupos, se observó una diferencia significativa a la alta con el grupo CS/V, CO/EGCG15 y CS/EGCG, siendo mayor en este último. Finalmente al comparar al grupo CO/EGCG15 con respecto al CO/EGCG25, se observó en este último grupo, una disminución significativa por la administración de dosis alta de EGCG ($p<0.05$) Figura 11.

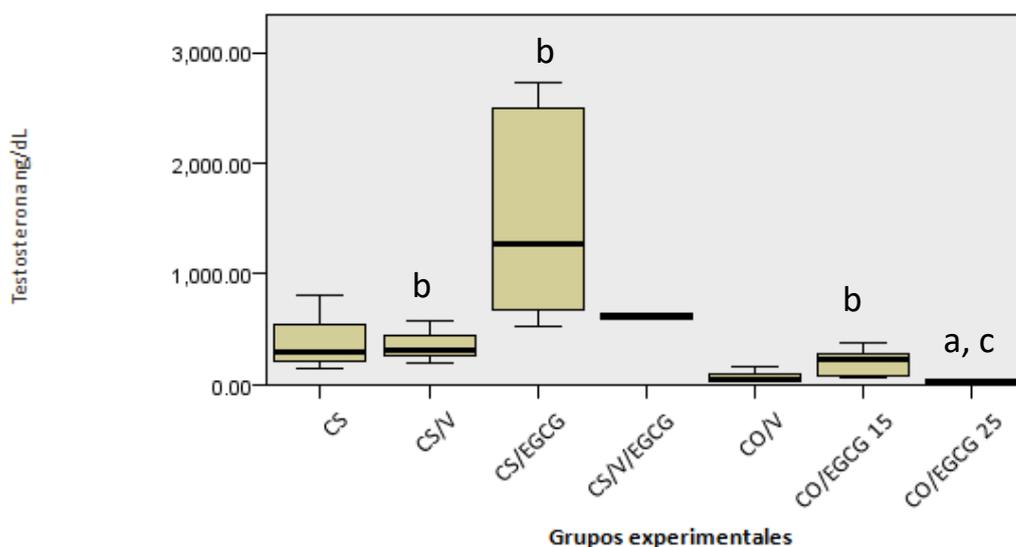


Figura 11. Gráfico en donde se observa las concentraciones séricas de Testosterona en los diferentes grupos. a, $p<0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos); b, $p<0.05$ (CO/V vs cada uno de los demás grupos) y c, $p<0.05$ (CO/EGCG15 vs CO/EGCG25). Se aprecia un aumento significativo en los grupos CS/EGCG y CO/EGCG15 con respecto al CS. En el grupo CO/EGCG25 se observa una disminución significativa con respecto a los grupos CS y CO/EGCG15.

Determinación de la actividad de catalasa

Al evaluar la actividad enzimática de catalasa (Anexo V, tabla B). Los grupos controles mostraron un comportamiento similar, sin diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$). El grupo CO/V mostró una tendencia a la baja no significativa ($p > 0.05$), con respecto a los grupos controles. Pero la administración de dosis baja de EGCG en el grupo CO/EGCG15, mostró un aumento significativo, el cual se incrementó también de manera significativa a dosis alta de EGCG en el grupo CO/EGCG25, ambos con respecto al grupo CO/V ($p < 0.05$).

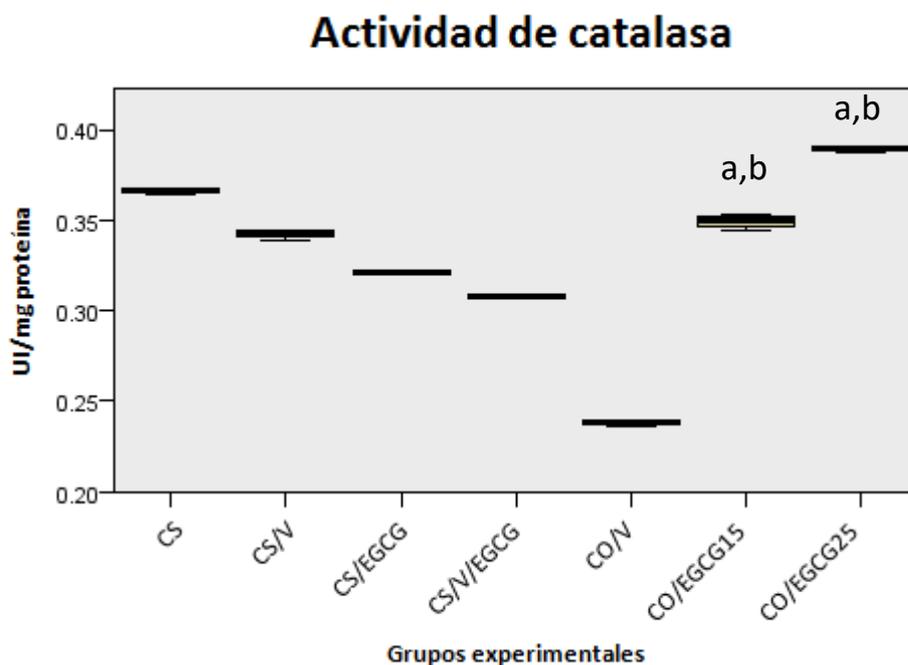


Figura 12. Actividad enzimática de catalasa testicular, representada por el valor de la media y error estándar, la escala se muestra en UI/mg de proteína. a, $p < 0.05$ (CS vs cada uno de los demás grupos); b, $p < 0.05$ (CO/V vs cada uno de los demás grupos) y c, $p < 0.05$ (CO/EGCG15 vs CO/EGCG25). Se observó una tendencia a la baja en la actividad de catalasa, en el grupo CO/V comparándolo con CS, que al administrar una dosis de 15 mg de EGCG aumentó significativamente; incrementándose aún más a una dosis de 25 mg de EGCG en el grupo CO/EGCG25, ambos con respecto al grupo CO/V.

Determinación de la actividad de SOD

Los resultados obtenidos (Anexo V, tabla A) no mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p < 0.05$).

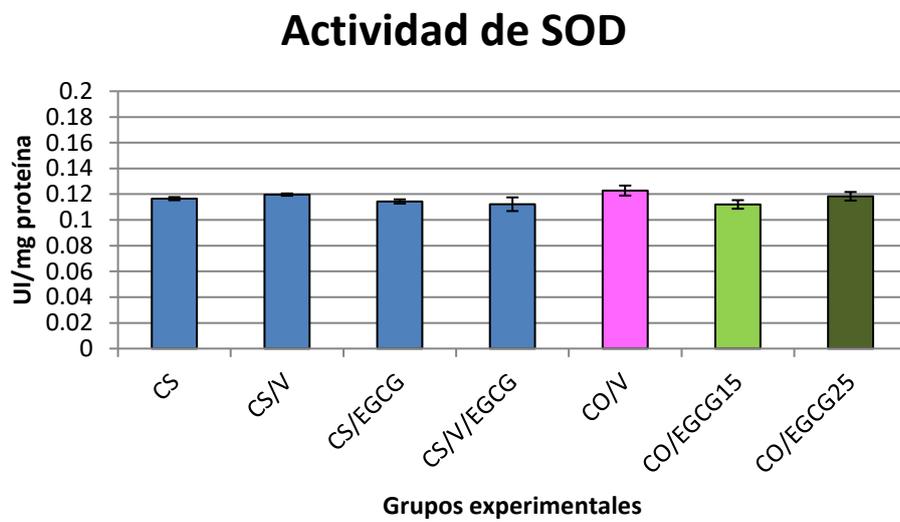


Figura 13. Actividad enzimática de Súper Óxido Dismutasa testicular, representada por el valor de la media y error estándar, los resultados se muestran en Units/ μ L.

Discusión

El descenso testicular es un proceso importante para el desarrollo de la espermatogénesis. Una alteración en su mecanismo, en pacientes con CO y orquidopexia a los 6 meses de edad, plantea que el 35% tendrá problemas de fertilidad, aún con la cantidad adecuada de células testiculares al momento de la cirugía (Hadziselimovic y col. 2005).

Actualmente, algunos estudios sugieren que la cirugía tiene un papel limitado en la preservación de la fertilidad en pacientes con criptorquidia. Por lo tanto, se recomienda la cirugía a una edad temprana (Rubenwolf y Stein 2013). Esto debido a que los resultados observados incluso en pacientes que se sometieron a cirugía a una edad temprana, enfatizan la necesidad de evaluaciones adicionales (histológicas, genéticas, etc.) y posiblemente de un tratamiento hormonal, con la finalidad de preservar la fertilidad en esos pacientes (Adomaitis y col. 2016). Aunque la orquidopexia temprana parece mejorar el desarrollo testicular y favorecer la espermatogénesis, existen pocos estudios sobre la fertilidad en pacientes con CO y cirugía, sugiriendo una disminución en los parámetros espermáticos por debajo del límite inferior reportado por la OMS. Se ha observado mayor afectación en aquellos pacientes que cursaron con CO bilateral que en pacientes con CO unilateral. Algunos otros estudios sugieren que en pacientes con CO unilateral y cirugía, sus parámetros espermáticos se mantienen en el límite inferior reportado por la OMS. Esto sugiere que inclusive el testículo contralateral no es capaz de mantener una espermatogénesis en cantidades favorables para beneficiar la fertilidad. Por otro lado, también se han evaluado los parámetros hormonales en pacientes con CO, sugiriendo que los parámetros hormonales se encuentran anormales solo cuando ambos testículos se ven afectados (Rusnack y col. 2003; Hadziselimovic y col. 2005; Kojima y col. 2009).

Por otra parte, también se encuentran aquellos pacientes que cursaron con CO y descenso espontáneo tardío. En donde en el periodo de CO temporal, sus testículos fueron sometidos a altas temperaturas en un periodo crítico de diferenciación y de proliferación de células testiculares. Estos individuos no han sido estudiados y pueden estar contribuyendo a las estadísticas de infertilidad, además de aquellos hombres infértiles que tuvieron una historia de CO y orquidopexia, los cuales acuden a las clínicas de infertilidad y son diagnosticados con infertilidad idiopática (Goel y col. 2015).

Al estar sometidos por un periodo que puede ser de unos meses hasta un año de edad, a una temperatura superior a la escrotal, el o los testículos se exponen a estrés calórico, lo que conduce a estrés oxidante. Esto produce daños a las células testiculares, ocasionando probablemente, un fracaso en su maduración, principalmente a nivel de Cs, en donde estudios sugieren que un estado criptorquídico probablemente ocasiona su desdiferenciación (Nistal y col. 2013).

En la actualidad, se han realizado estudios para disminuir el daño producido por las ERO en la CO (Kumagai y col. 2002; Viguera y col. 2009; Viguera y col. 2011; Azari y col. 2014; Kheradmand y col. 2014); sin embargo, no existen reportes de la administración de un antioxidante como tratamiento en el testículo no descendido en espera de su descenso espontáneo. Debido a esto, en este trabajo se analizó el efecto antioxidante de la EGCG como protector en testículos no descendidos temporalmente y con descenso espontáneo tardío.

Los datos obtenidos en este trabajo en los grupos con CO concuerdan con estudios previos en donde se observó una incompleta maduración a nivel de las células testiculares (Nistal y col. 2013), lo cual podría estar provocado por una incompleta maduración del eje hipotálamo- hipófisis- testicular, acompañado de anomalías citológicas a nivel testicular, incluyendo reducciones en el número de células de Leydig y el proceso de maduración de las células testiculares (Hadziselimovic y col. 2005). Así mismo se plantea, que la EGCG a una dosis de 15 mg, disminuye algunos de los daños en el testículo no descendido aumentando el IM del epitelio seminífero, el AE y en consecuencia el IG, así como los parámetros espermáticos (Cuadro 1) con respecto al grupo

CO/V.

Esto posiblemente se debió a que la EGCG disminuyó el proceso de lipoperoxidación, cediendo hidrógenos de su grupo hidroxilo para estabilizar a los RL, disminuyendo de ésta manera las ERO (Dias y col. 2017), deteniendo el daño histológico y mejorando la espermatogénesis. Esto atribuido a su actividad antioxidante en el metabolismo celular (Dias y col. 2017), lo que probablemente permitió la recuperación parcial de las lesiones testiculares. Por otro lado, a una dosis de EGCG de 25 mg se observó el efecto contrario, con un aumento en las alteraciones a nivel del espermatozoide como doble cabeza, doble cola, gota citoplasmática e índice apoptótico. Las diferencias entre los grupos experimentales, podrían sugerir que los efectos observados pueden ser dependientes de la dosis de EGCG, puesto que a una dosis alta usada en este estudio favorece las alteraciones a nivel del espermatozoide. También se incrementa el índice apoptótico, ocasionando una disminución en la concentración espermática, en los espermatozoides normales y en el porcentaje de movilidad; por lo que es empleada por su capacidad de favorecer la apoptosis, para diferentes tipos de cáncer y a dosis bajas parece beneficiar el efecto protector a nivel celular (Xu y col. 2016; Dias y col. 2017; Guo y col. 2017; Meng y col. 2017; Singh y col. 2016; Qi y col. 2017).

El hecho de haber presentado alteraciones ligeras en el área (Figura 4), en el IH (Figura 5) e IM (Figura 6) aún con descenso testicular tardío, demuestra que durante el tiempo que los testículos fueron criptorquídicos posiblemente las pre espermatogonias o también llamados gonocitos, no lograron su diferenciación y se condujeron a la apoptosis, a través de algunos de los siguientes escenarios hipotéticos: a) los gonocitos no respondieron a las señales de diferenciación enviadas por las Cs. b) las Cs no enviaron factores de diferenciación a los gonocitos como el factor de células troncales, las moléculas de adhesión celular neuronal, el ácido retinoico entre otros c) las Cs no enviaron factores antiapoptóticos o de sobrevida (familia de proteínas Bcl-2) ocasionando que se murieran gonocitos (Nistal y col. 2013), lo que condujo a una ligera reducción del número de espermatogonias que repercutió en el AE. También puede presentarse un daño directo y permanente a las espermatogonias (Virtanen y col. 2007). El hecho de no presentar apoptosis (Figura 7) incrementada en los grupos de estudio (excepto el grupo

CO/EGCG25) sugiere la participación de otro tipo de muerte celular como puede ser la autofagia, como recientemente se ha investigado, sugiriendo así mismo una sinergia de ambos mecanismos para inducir la muerte y degeneración de las células germinales (Zhang y col. 2012).

Cabe mencionar que estudios previos, en donde se ha evaluado la actividad anticancerígena de la EGCG en dos líneas celulares de cáncer de esófago (Eca109 y Ec9706) fueron seleccionadas para probar el efecto anticancerígeno de EGCG en células escamosas esofágicas de carcinoma. Los efectos supresores de tumores de EGCG contra las células de cáncer de esófago fueron investigadas *in vitro* a diferentes concentraciones y tiempo dependientes (Liu y col. 2017). Esto ha llevado a la conclusión que a una dosis baja la EGCG tiene un efecto protector y a una dosis alta activa la apoptosis. En otro estudio se investigó el efecto del tratamiento con EGCG en una línea celular de cáncer de esófago humano (ECa109), en donde fueron cultivadas y tratadas con concentraciones crecientes de EGCG, los resultados demostraron que después del tratamiento con EGCG, la viabilidad de las células ECa109 se redujo significativamente, mientras que la tasa de apoptosis se incrementó significativamente, de una manera dependiente de la dosis y del tiempo en comparación con las células no tratadas ($P < 0.01$). Con base a lo anterior concluyeron que la EGCG puede inducir la apoptosis de células ECa109 e inhibir el crecimiento celular (Meng y col. 2017). Esto es a través de vías que implican la modulación epigenética pro-oxidante de genes relacionados con la apoptosis como el de la caspasa 3 (Liu y col. 2017). Así mismo se sugiere que la Caspasa 3 es regulada a la alza en una dosis dependiente, después del tratamiento con EGCG al mismo tiempo que regula la disminución del potencial de membrana mitocondrial y en consecuencia disminuye la proliferación celular (Dias y col. 2017) a través de la modulación de la progresión del ciclo celular (Liu y col. 2017) y en consecuencia la espermatogénesis (Dias y col.2017).

Algunos estudios reportan que la EGCG posee un efecto modulador dosis dependiente en cultivo de Cs humana, en donde se mide la funcionalidad mitocondrial y el perfil oxidante, utilizando dos dosis de EGCG una a 5 mg y la otra a 50 mg. Sin embargo, a pesar de mantener la funcionalidad del ciclo de Krebs, la EGCG a una dosis de 50 mg disminuye el potencial de la membrana mitocondrial de Cs, lo que podría comprometer la producción de ATP; además

de aumentar el consumo de glucosa y de piruvato. Curiosamente, en la dosis de 5 mg, los daños oxidativos a las proteínas y los lípidos disminuyeron, siendo valiosa ésta información para el estudio de la infertilidad humana (Dias y col. 2017).

Algunos estudios demuestran que el uso de EGCG en ratones con radioterapia, es capaz de disminuir el estrés oxidativo a nivel de diferentes sistemas, encontrando que después de la radiación, en los pacientes con una dosis de EGCG se inhibieron vías apoptóticas, así como el daño oxidativo testicular, restaurándose la peroxidación lipídica casi a sus valores normales. Esto aumentó la supervivencia de las células germinales y favoreció el mantenimiento de las uniones con Cs, debido a lo cual posiblemente estén involucradas vías parácrinas de señalización entre Cs y células germinales (Feng y col. 2017). En este estudio la tendencia a disminuir las ERO por parte de la EGCG a una dosis de EGCG de 15 mg, provocó una disminución del IH y del IA, aumentando el número de células germinales, reflejándose en el AE, lo cual permite proponerla como tratamiento protector en los testículos no descendidos.

En cuanto a los resultados obtenidos en la concentración sérica de testosterona con respecto a los grupos CS y CO/EGCG15 (Figura 11), al aplicar una dosis de EGCG de 25 mg se observó una disminución en la concentración sérica de testosterona. Esto posiblemente se debe a que la EGCG es capaz de inhibir la producción de testosterona, por un efecto directo a nivel testicular en las células de Leydig regulando la secreción de testosterona (Figueroa y col. 2009) independientemente de cualquier efecto del fármaco sobre la secreción de gonadotropina; además de que contribuye a la reducción en la capacidad esteroidogénica celular. Sin embargo, al aplicar una dosis de EGCG de 15 mg se observó un aumento sérico de testosterona alcanzando inclusive a los controles, lo que sugiere que la inhibición puede ser dependiente de la concentración de EGCG (Figueroa y col. 2009).

Los resultados observados en cuanto a la determinación de la actividad enzimática de catalasa (Figura 12) concuerda con lo reportado en estudios previos en donde se investigaron los efectos antioxidantes de las vitaminas C y E sobre el estrés oxidativo inducido por la CO en ratas, observándose que cuando se administran por separado, las vitaminas C y E aumentan el recuento

de células germinales, así como la actividad enzimática de catalasa, en comparación con las ratas con CO. Por tanto sugieren que la administración separada de vitaminas E y C disminuyen la pérdida de células germinales y el estrés oxidativo en la CO, contrario a cuando se combinan; así mismo, se sugiere la actividad enzimática de catalasa como un indicador de estrés oxidante (Afolabi y col. 2012). En cuanto a la actividad enzimática encontrada en los grupos experimentales con la administración de EGCG, coincide con otros estudios, en donde se ha evaluado el efecto de EGCG en dicha actividad enzimática de SOD y catalasa. Se sugiere que la EGCG tiene efecto únicamente sobre la actividad de catalasa, probablemente dicha activación enzimática indica la participación en la regulación enzimática de Rel/NF- κ B, un factor de transcripción sensible a la oxido reducción celular. Por lo cual debido al aumento de EROS, el factor de transcripción podría ser estimulado, activando la primera línea de defensa del sistema antioxidante endógeno (Yamamoto y col. 2004; Meng y col. 2008).

En un estudio reciente (Qi y col. 2017) reportaron que la EGCG posee un efecto protector antioxidante, en la degeneración de la retina; en donde la estructura y función de la retina de ratas fueron evaluados mediante tomografía de coherencia óptica, histología, electroretinografía, la expresión de los ARNm de varios genes involucrados en el estrés oxidativo fueron cuantificados por PCR antes de someter a la retina a estrés y 24 h después. En ese estudio se concluyó que la EGCG administrada por vía sistémica protege la estructura y función de la retina de ratas contra el daño oxidativo provocado bajo diodo de emisión de luz blanca (LD) (10.000 lux) durante 5 h. Otro estudio también reporta el efecto de la EGCG en la integridad mitocondrial y la actividad enzimática antioxidante, determinantes de las ERO, en la acumulación de RL probablemente subyacente al mecanismo de envejecimiento en fibroblastos diploides humanos (HDF); en donde se evaluó la citotoxicidad de la EGCG, encontrando valores citotóxicos para HDF jóvenes y viejos; los HDF tratados con EGCG a 25 y 50 μ M durante 24 h, presentaron un aumento considerable de catalasa, SOD1, SOD2, y Glutación peroxidasa, así como sus actividades enzimáticas. Protegiendo así los HDF contra el daño oxidativo inducido por H₂O₂, acompañado con una disminución de la acumulación intracelular de ERO y un potencial mitocondrial bien mantenido. Por otra parte, los HDF tratados

con EGCG a 12.5 μ M mostraron menos ERO intracelular con mayor potencial mitocondrial, sin daño al DNA mitocondrial, elevada la actividad antioxidante, en comparación con los del grupo no tratado. En conjunto, en este estudio se investigaron los efectos de EGCG en la regulación de la integridad mitocondrial y la actividad enzimática antioxidante de los HDF, lo que sugiere que EGCG puede ser considerado uno de los posibles reactivos antienviejimiento en el futuro (Meng y col.2017).

Es de sumo interés considerar que los efectos de la EGCG reportados en este estudio a una dosis de 25 mg pueden ser de importancia clínica ya que la EGCG actúa como anticancerígeno. Algunos estudios sugieren que la EGCG tiene la capacidad de bloquear e inhibir varias señales moleculares que influyen en la cadena de eventos moleculares lo que lleva al inicio y la progresión del cáncer (Dhatwalia y col. 2018) inhibiendo la proliferación e induciendo la apoptosis de varios tipos de tumores (Feng y col. 2017; Meng y col. 2017; Liu y col. 2017). Casi todos los tipos de cánceres tienen transducción de señal alterada incluyendo las moléculas de señalización que conducen a la división celular incontrolada. Entonces, estas moléculas de señalización son reconocidas como blancos potenciales contra el cáncer. La EGCG tiene la afinidad de unirse a receptores de membrana e interfiere en el proceso de división celular durante la etapa de progresión del cáncer. La EGCG también ha sido conocida por regular las actividades de diversos receptores de factores de crecimiento, uniéndose específicamente al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y por lo tanto interfiere en la transducción de señales celulares. También tiene la capacidad de inducir la fosforilación mediada por peróxido de hidrógeno de los receptores de insulina que inhiben la tirosina, conduciendo a la interrupción de eventos favorables para la proliferación de células cancerosas. Además, aumenta la expresión del receptor de laminina (67LR) apuntando a las células tumorales específicamente a través de inducción de la apoptosis a través de 67LR (Dhatwalia y col. 2018).

Conclusión

Estos resultados sugieren que la administración de 15 mg de EGCG favorece algunos parámetros de fertilidad como la concentración, morfología, movilidad, viabilidad espermática, área del epitelio seminífero, índice de maduración, proliferación, concentración de testosterona, así como la actividad de catalasa en un modelo con criptorquidia y descenso espontáneo tardío.

Referencias

1. Abney TO, Keel BA. The cryptorchid testis. CRC Press. 1989; 176-186.
2. Adomaitis R, Vincel B, Eidukaite A, Ostaneviciute E, Kirka R, Bilius V, Malcius D, Hadziselimovic F. Consequences of bilateral cryptorchidism in adults. *Andrologia*. 2016; 48(9):933-938.
3. Afolabi AO, Olotu OO, Alagbonsi IA. Vitamins e and C alleviate the germ cell loss and oxidative stress in cryptorchidism when administered separately but not when combined in rats. *ISRN Pharmacology*. 2012; 2012.
4. Afzal M, Safer A, Menon M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology*. 2015; 23(4):151-161.
5. Aranda GA, Araque FA, Rodriguez CR, Aragues RA. Glaucoma y antioxidantes: revisión sistemática. *Revista Mexicana de Oftalmología*. 2017; 91(3):112-121.
6. Azari O, Gholipour H, Kheirandish R, Babaei H, Emadi L. Study of the protective effect of vitamin C on testicular tissue following experimental unilateral cryptorchidism in rats. *Andrologia*. 2014; 46 (5): 495-503.
7. Brakel J, Schrama S, Hazebroek F. INSL3 and AMH in patients with previously congenital or acquired undescended testes. *Journal of Pediatric Surgery*. 2017; 52(8):1327-1331.
8. Campoy L, Sancho LAM. Estudio funcional del eje hipotálamo-hipófisis-somatotropo. *Pediatric Endocrinology*. 2001; 14:377-382.

9. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 1997; 24(5): 287-296.
10. Chihuail RH, Contreras P, Wittwer F. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Revista Veterinaria México*. 2002; 33: 265-283.
11. Chowdhury A, Sarkar J, Chakraborti T, Pramanik PK, Chakraborti S. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 78:50-59.
12. Coronado HM, Vega S, León RGT, Vázquez FM, Radilla VC. Antioxidants: present perspective for the human health. *Revista Chilena de Nutrición*. 2015; 42(2): 206-2012.
13. Corrales LC, Muñoz AMM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas* 2012; 10(18):135-250.
14. Dhatwalia SK, Kumar M, Dhawan DK. Role of EGCG in Containing the Progression of Lung Tumorigenesis-A Multistage Targeting Approach. *Nutrition and Cancer*. 2018; 70(3): 334-349.
15. Dias TR, Alves MG, Silva J, Barnos A, Sousa M, Casal S, Silva BM, Oliveira PF. Implications of epigallocatechin-3-gallate in cultured human Sertoli cells glycolytic and oxidative profile. *Toxicology in vitro*. 2017; 41: 214-222.
16. Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Hauck EW, Weidner W. Urogenital and sperm motility. *Journal of Andrology*. 2003; 35(5): 283-287.

17. Fiegel HC, Rolle U, Metzger R, Gfroerer S, Kluth D. Embryology of the testicular descent. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2011; 20(3): 170-175.
18. Feng C, Ho Y, Sun C, Xia G, Ding Q, Gu B. Epigallocatechin gallate inhibits the growth and promotes the apoptosis of bladder cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017; 14(4): 3513-3518.
19. Ferguson L, AgoulNIK A. Testicular cancer and cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*. 2013; 4: 32.
20. Ferlin A. Hormonal and genetic control of testicular descent. *Reproductive Biomedicine*. 2007; 15(6): 659-665.
21. Fernandes L, Casal S, Pereira JA, Saraiva JA, Ramalhosa E. Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017; 60: 38-50.
22. Figueiroa MS, Vieira JS, Leite DS, Filho RC, Ferreira F, Gouveia PS, Udrisar DP, Wanderley MI. Green tea polyphenols inhibit testosterone production in rat Leydig cells. *Asian Journal of Andrology*. 2009; 11(3): 362-370.
23. Goel P, Rawat JD, Wakhlu A, Kureel SN. Undescended testicle: An update on fertility in cryptorchid men. *The Indian Journal of Medical Research*. 2015; 141(2): 163-171.
24. Gomez PR. Criptorquidia: Importancia del diagnóstico y Tratamiento Precoz. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 2004; 2(1): 14-17.

25. Guo Y, Zhao Y, Nan Y, Wang X, Chen Y, Wang S. (-)-Epigallocatechin-3 gallate ameliorates memory impairment and rescues the abnormal synaptic protein levels in the frontal cortex and hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cellular, molecular and developmental neuroscience*. 2017; 28(10): 590-597.
26. Guzmán C, Zambrano E. Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Revista de Investigación Clínica*. 2007; 59(1):73-81.
27. Hadziselimovic F, Zivkovic D, Bica DT, Emmons LR. The importance of mini-puberty for fertility in cryptorchidism. *The Journal of Urology*. 2005; 174(4): 1536-1539.
28. Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, Gebhardt S. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultura and food chemistry*. 2006; 54(26): 9966-9977.
29. Hutson JM, Li R, Southwell BR, Newgreen D, Cousinery M. Regulation of testicular descent. *Pediatric Surgery International*. 2015; 31(4): 317-325.
30. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of Reproduction*. 1999; 61(2): 393-399.
31. Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970; 1(1):2-25.

32. Johnson MK, Loo G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research*. 2000; 459(3): 211-218.
33. Kapoor MP, Sugita M, Fukuzawa Y, Okubo T. Physiological effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on energy expenditure for prospective fat oxidation in humans: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017; 43: 1-10.
34. Kheradmand A, Dezfoulian O, Alirezaei M, Hadian B. Ghrelin is a suppressor of testicular damage following experimentally induced cryptorchidism in the rat. *Journal of Pediatric Surgery*. 2014; 49(4): 593-598.
35. Kubota Y, Nef S, Farmer PJ, Temelcos C, Parada LF, Hutson JM. Leydig insulin-like hormone, gubernacular development and testicular descent. *The Journal of Urology*. 2001; 165(5): 1673-1675.
36. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J, Kawamura K, Tanikawa H, Sato Naoki, Tanaka T. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction*. 2002; 8(2): 118-123.
37. Kojima Y, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Advances in molecular genetics of cryptorchidism. *Urology*. 2009; 74(3): 571-578.
38. Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Marziani A, Cannizzaro MA, Lanzafame F, Vicari E. Cryptorchidism and its long-term complications. 2009; 13(5): 351-356.

39. Liu L, Zuo J, Wang G. Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in Ec9706 and Eca109 esophageal carcinoma cells. *Oncology Letter*. 2017; 14(4): 4391-4395.
40. Mayorga JM, Camargo M, Cadavid A, Walter D, Maya C. Estrés oxidativo: ¿un estado celular defectuoso para la función espermática? *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 2015; 80(6): 486-492.
41. Meng J, Tong Q, Liu X, Yu Z, Zhang J, Gao B. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth and induces apoptosis in esophageal cancer cells through the demethylation and reactivation of the p16 gene. *Oncology Letters*. 2017; 14(1): 1152-1156.
42. Meng Q, Veladar CN, Ruan R. Effects of epigallocatechin-3-gallate on mitochondrial integrity and antioxidative enzyme activity in the aging process of human fibroblast. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 44(6):1032-1041.
43. Nistal M, Gonzalez-Peramato P, De Miguel MP. Sertoli cell dedifferentiation in human cryptorchidism and gender reassignment shows similarities between fetal environmental and adult medical treatment estrogen and antiandrogen exposure. *Reproductive Toxicology*. 2013; 42: 172-179.
44. Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. D.O.F.22-VIII-2001.
45. Oliveira MR, Nabavi SF, Daglia M, Rastrelli L, Nabavi SM. Epigallocatechin gallate and mitochondria—A story of life and death. *Pharmacological Research*. 2016; 104: 70-85.
46. Organización Mundial de la Salud

47. Plas E, Brakel V, Vries M, Schrama M, Hazebroek W, Dohle H. Acquired undescended testes and fertility potential: is orchiopexy at diagnosis better than awaiting spontaneous descent?. *Andrology*. 2015; 3(4): 677-684.
48. Qi S, Wang C, Song D, Dunaief JL. Intraperitoneal injection of Epigallocatechin-3-gallate protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Molecular Vision*. 2017; 23:171-178.
49. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2012; 27(1):76-89.
50. Rubenwolf P, Stein R. Diagnosis and management of the undescended testis: an Update in the light of the current guidelines. *Aktuelle Urologie*. 2013; 44(6): 445-451.
51. Rusnack SL, Wu HY, Huff DS, Snyder HM, Carr MC, Bellah RD, Zderic SA, Canning DA. Testis histopathology in boys with cryptorchidism correlates with future fertility potential. *The Journal of Urology*. 2003; 169(2): 659-662.
52. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004; 23: 2-12.
53. Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM. Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994; 55(2): 221-226.
54. Scheiber K, Oefner PJ, Bartsch G. Cryptorchidism and fertility. *World Journal of Urology*. 1986; 4(2): 100-104.

55. Sepúlveda E, Crispi F, Pons A, Gratacos E. Restricción de crecimiento intrauterino. *Revista Clínica Médica* 2014; 25(6): 958-963.
56. Sevilla P, Mach N. Efectos del té verde sobre el riesgo de cáncer de mama. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. 2014; 18(1): 25–34.
57. Singh NA, Mandal AK, Khan ZA. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutrition Journal*. 2016; 15(1): 60.
58. Smith E, M A, MB. Observations on the descent of the testicle with special reference to spontaneous descend at puberty. *Archives of Disease in Childhood*. 1939. Vol. 77, 1-13.
59. Szarek M, Li R, Vikraman J, Southwell B, Hutson JM. Molecular signals governing cremaster muscle development: Clues for cryptorchidism. *Journal of Pediatric Surgery*. 2014; 49(2): 312-316.
60. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology*. 2008; 5: 488-498.
61. Valcic S, Muders A, Jacobsen NE, Liebler DC, Timmermann BN. Antioxidant chemistry of Green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-Epigallocatechin gallate with peroxil radicals. *Chemical Research in Toxicology*. 1999; 12 (4): 382-386.
62. Valko M. Rhodes CJ, Monocol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160(1): 1-40.

63. Verkauskas G, Malcius D, Eidukaite A, Vilimas J, Dasevicius D, Bilius V, Hadziselimovic F. Prospective study of histological and endocrine parameters of gonadal function in boys with cryptorchidism. *Journal of Pediatric Urology*. 2016; 12 (4): 238.
64. Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Marziani A, Cannizzaro MA, Lanzafame F, Vicari E. Cryptorchidism and its long-term complications. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2009; 13(5): 351–356.
65. Viguera RM, Molina OD, Reyes TG, Santamaría AD, Calderón JV, Muñoz EG, Quintanar MA. Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta Histochemica-Journal-Elsevier*. 2009; 111(2):127-137.
66. Viguera RM, Reyes G, Moreno-Mendoza N, Merchant-Larios H. Gubernacular fibroblast express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with human chorionic gonadotrophin. *Urological Research Journal*. 2004; 32(6):386-390.
67. Viguera RM, Ojeda I, Gutiérrez PO, Chávez SM, Cuevas O, Santa M, Rojas CJC. Protective effect of α -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. *Internal Journal of Experimental Pathology*. 2011; 92(2):131-139.
68. Virtanen H, Bjerknes R, Cortes Dina, Jørgensen N, Meyts E, Thorsson A, Thorup J, Main K. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Journal Compilation Foundation Acta Paediatrica*. 2007; 96(5): 611-616.

69. Wenzler DL, Bloom DA, Park JM. What is the rate of spontaneous testicular descent in infants with cryptorchidism?. *The Journal of Urology*. 2004; 171(2): 849-851.
70. Yamamoto T, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Ueta E, Osaki T, Athar M, Schuster G, Hsu S. Roles of catalase and hydrogen peroxide in green tea polyphenol-induced chemo preventive effects. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004; 308(1): 317-323.
71. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*. 2006; 78(18): 2073-2080.
72. Zhang M, Jiang M, Bi Y, Zhu H, Zhou Z, Sha J. Autophagy and Apoptosis Act as Partners to Induce Germ Cell Death after Heat Stress in Mice. *Plos One*. 2012; 7(7): 412.
73. Zini A, Schlegel PN. Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *The Journal of Urology*. 1997; 158(2): 659-663.

Anexos

Anexo I. Índice de Maduración del epitelio seminífero. Tomado de Johnsen, 1970

<i>Puntaje</i>	<i>Maduración</i>
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 espermatidas maduras en diferenciación.
7	Gran cantidad de espermatidas sin algún signo de diferenciación.
6	Presencia de pocas espermatidas (5 por tubo).
5	Gran cantidad de espermatocitos presentes.
4	Pocos espermatocitos 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.

Anexo II. Índice Histopatológico (Viguera y col. 2009)

Valor	Daño observado
1	Plegamiento de la lámina basal
2	Vacuolización, células multinucleadas y/o picnosis.
3	Ausencia de espermátidas
4	Ausencia de espermatoцитos
5	Ausencia de espermatogonias
6	Ausencia de todo tipo celular

Anexo III. Variables

Variable respuesta	Tipo	Escala de Medición
Actividad de SOD	Cuantitativa continua	UI/mg proteína
Actividad de catalasa	Cuantitativa continua	UI/mg proteína
Índice Histopatológico	Cuantitativa discontinua	Valores arbitrarios
Área del epitelio seminífero.	Cuantitativa continua	μm^2
Índice de maduración (Johnsen).	Cuantitativa discontinua	Valores arbitrarios
Concentración sérica de Testosterona	Cuantitativa continua	ng/dL
Concentración espermática	Cuantitativa discontinua	Espermatozoides/ml
Espermatozoides normales	Cuantitativa discontinua	porcentaje
Movilidad espermática	Cuantitativa discontinua	porcentaje
Viabilidad espermática	Cuantitativa discontinua	porcentaje
Espermatozoides con cabeza de alfiler	Cuantitativa discontinua	porcentaje
Espermatozoides con doble cola	Cuantitativa discontinua	porcentaje
Espermatozoides con doble cabeza	Cuantitativa discontinua	porcentaje
Espermatozoides con gota citoplasmática	Cuantitativa discontinua	porcentaje
Índice de Proliferación (IP)	Cuantitativa continua	Número de células positivas/10000 μm^2
Índice Apoptósico (IA)	Cuantitativa continua	Número de células positivas/10000 μm^2
Índice Gonadosomático (IG)	Cuantitativa continua	porcentaje

Anexo IV. Media y error estándar de variables respuesta paramétricas

Tabla a		
Variable respuesta: Área del epitelio seminífero (AE)		
Tipo: Cuantitativa continua		Escala de medición: μm^2
Grupo experimental	Media	Error estándar
CS	71971.6075	1671.57547
CS/V	66834.168	1318.78401
CS/EGCG	65287.4832	894.563289
CS/V/EGCG	67372.2876	1566.25198
CO/V	64177.6279	1116.7867
CO/EGCG 15	66743.5789	1207.71062
CO/EGCG 25	53059.412	1743.64004

Tabla b		
Variable respuesta: Índice Histopatológico (IH)		
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: Valores arbitrarios
Grupo experimental	Media	Error estándar
CS	0.705	0.0759
CS/V	0.725	0.1014
CS/EGCG	1.013	0.0819
CS/V/EGCG	1.032	0.128
CO/V	2.717	0.1445
CO/EGCG 15	1.805	0.0961
CO/EGCG 25	3.583	0.1383

Tabla c		
Variable respuesta: Índice de Maduración (IM)		
Tipo: Cuantitativa discontinua Escala de medición: Valores arbitrarios		
Grupo experimental	Media	Error estándar
CS	10	0
CS/V	10	0
CS/EGCG	10	0
CS/V/EGCG	10	0
CO/V	9.2	0.0898
CO/EGCG 15	8.595	0.0638
CO/EGCG 25	8.658	0.1001

Tabla d		
Variable respuesta: Índice de Proliferación		
Tipo: Cuantitativa continua		
Escala de medición: Número de células positivas/ 10000μm^2		
Grupo experimental	Media	Error estándar
CS	53.0821064	1.12235114
CS/V	46.0115707	1.50245174
CS/EGCG	54.3608978	1.15891048
CS/V/EGCG	61.0785004	2.41879058
CO/V	47.8853438	1.12673587
CO/EGCG 15	67.0662507	2.21797984
CO/EGCG 25	23.6960189	0.96135265

Tabla e		
Variable respuesta: Índice Apoptósico (IA)		
Tipo: Cuantitativa continua		
Escala de medición: número de células positivas/ 10000μm^2		
Grupo experimental	Media	Error estándar
CS	0.03730003	0.00274537
CS/V	0.03893461	0.00362827
CS/EGCG	0.04361833	0.00359663
CS/V/EGCG	0.03868275	0.003541
CO/V	0.03673471	0.00277935
CO/EGCG 15	0.07664855	0.02742911
CO/EGCG 25	0.39527809	0.07580041

Anexo V. Mediana, Rango mínimo y Rango máximo de variables respuesta no paramétricas

Tabla A				
Variable respuesta: SOD				
Tipo: Cuantitativa continua		Escala de medición: UI/mg de proteína		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	0.116512	0.11427699	0.11878226	0.00123178
CS/V	0.11916132	0.11817525	0.12220108	0.00088438
CS/EGCG	0.11307949	0.11065271	0.11814223	0.00164393
CS/V/EGCG	0.10954982	0.10312056	0.12651468	0.00531863
CO/V	0.12182657	0.11480219	0.13268115	0.00388721
CO/EGCG 15	0.11119697	0.10030498	0.12083866	0.00333093
CO/EGCG 25	0.118889	0.10702607	0.1280453	0.00334099

Tabla B				
Variable respuesta: Catalasa				
Tipo: Cuantitativa continua		Escala de medición: UI/mg de proteína		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	0.366021158	0.364274801	0.36821341	0.00080956
CS/V	0.343738744	0.339222503	0.34483235	0.00125208
CS/EGCG	0.320666883	0.319571857	0.32173495	0.00045158
CS/V/EGCG	0.308252161	0.307230381	0.30888856	0.00035766
CO/V	0.238062291	0.235783818	0.23919949	0.00071642
CO/EGCG 15	0.350012576	0.344361925	0.35282979	0.00134684
CO/EGCG 25	0.388900837	0.386599792	0.38953889	0.00056122

Tabla C				
Variable respuesta: Testosterona				
Tipo: Cuantitativa continua		Escala de medición: ng/dL		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	549.145	138.28	920.11	189.858879
CS/V	305.32	201.53	570.32	109.798661
CS/EGCG	1274.55	517.83	2731.7	457.223754
CS/V/EGCG	610.205	585.79	634.62	24.415
CO/V	36.865	31.71	163.6	32.1696215
CO/EGCG 15	229.17	61	368.17	45.6029818
CO/EGCG 25	17.73	6.31	45.34	9.36835665

Tabla D				
Variable respuesta: Índice Gonadosomático				
Tipo: Cuantitativa continua		Escala de medición: porcentaje		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	0.56	0.49	0.57	0.01900544
CS/V	0.52	0.50	0.55	0.01636316
CS/EGCG	0.50	0.43	0.51	0.01625673
CS/V/EGCG	0.49	0.45	0.53	0.04081592
CO/V	0.36	0.33	0.44	0.02550886
CO/EGCG 15	0.34	0.26	0.46	0.02988627
CO/EGCG 25	0.34	0.27	0.36	0.021963

Tabla E				
Variable respuesta: Espermatozoides normales				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: porcentaje		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	100	100	100	0
CS/V	98.5	95	99	0.94648472
CS/EGCG	92.5	90	95	1.19023807
CS/V/EGCG	91	75	92	4.11045415
CO/V	76	62	79	3.81608438
CO/EGCG 15	89	73	95	3.16872472
CO/EGCG 25	45.5	32	63	8.14964212

Tabla F				
Variable respuesta: Espermatozoides con cabeza de alfiler				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: porcentaje		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	0	0	0	0
CS/V	1.5	1	5	0.94648472
CS/EGCG	7.5	5	10	1.19023807
CS/V/EGCG	8.5	8	25	4.17332801
CO/V	24	19	38	4.0901304
CO/EGCG 15	11	5	23	2.43416722
CO/EGCG 25	10.5	6	28	4.90535422

Tabla G				
Variable respuesta: Espermatozoides con doble cola				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: porcentaje		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	0	0	0	0
CS/V	0	0	0	0
CS/EGCG	0	0	0	0
CS/V/EGCG	0	0	0	0
CO/V	0	0	0	0
CO/EGCG 15	0	0	5	0.8123201
CO/EGCG 25	33	3	47	9.49561302

Tabla H				
Variable respuesta: Espermatozoides con doble cabeza				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: UI/mg de proteína		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	0	0	0	0
CS/V	0	0	0	0
CS/EGCG	0	0	0	0
CS/V/EGCG	0	0	1	0.25
CO/V	0	0	1	0.25
CO/EGCG 15	0	0	0	0
CO/EGCG 25	9	2	11	1.97378655

Tabla I				
Variable respuesta: Gota citoplasmática				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: porcentaje		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	0	0	0	0
CS/V	0	0	0	0
CS/EGCG	0	0	0	0
CS/V/EGCG	0	0	0	0
CO/V	0	0	1	0.25
CO/EGCG 15	0	0	0	0
CO/EGCG 25	2.5	1	6	1.08012345

Tabla J				
Variable respuesta: Concentración espermática				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: Espermatozoides/ml		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	68850	67300	69400	463.680925
CS/V	67900	60000	75800	3773.81328
CS/EGCG	66250	59000	69500	2240.72161
CS/V/EGCG	68350	56800	70400	3152.34701
CO/V	40900	19700	70300	6956.11609
CO/EGCG15	49350	40600	58800	4004.03442
CO/EGCG 25	10500	4500	30100	5952.92295

Tabla K				
Variable respuesta: Movilidad espermática				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: porcentaje		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	86.75	79	99	4.65642477
CS/V	98.5	96	100	1.03077641
CS/EGCG	79.5	77	83	1.25
CS/V/EGCG	97.5	95	99	0.85391256
CO/V	81	75	87	3.18852108
CO/EGCG 15	86.5	46	97	7.10370221
CO/EGCG 25	1.5	0	52.5	12.8798535

Tabla L				
Variable respuesta: Viabilidad espermática				
Tipo: Cuantitativa discontinua		Escala de medición: porcentaje		
Grupo experimental	Mediana	Rango mínimo	Rango máximo	Error estándar
CS	87.25	82	95	2.72622297
CS/V	88.5	86	93	1.47196014
CS/EGCG	93.5	87	100	3.47610894
CS/V/EGCG	93.5	86	96	2.25
CO/V	60	42	76	8.74166269
CO/EGCG 15	75.5	44.5	87	5.70236853
CO/EGCG 25	73.5	52	97.5	9.375