



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**"EFECTO DE LA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO SOBRE LAS
ALTERACIONES PRODUCIDAS EN LA CRIPTORQUIDIA EXPERIMENTAL"**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en Biología de la Reproducción Animal

Presenta:

M.V.Z. Tania Jiménez Cabrera

Codirectoras:

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Dra. Marcela Arteaga Silva

Asesor:

Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo

Septiembre 2017

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORAS

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

**Laboratorio de Biología de la
Reproducción
Instituto Nacional de Pediatría**

Dra. Marcela Arteaga Silva

**Departamento de Biología de la
Reproducción, División de Ciencias
Biológicas y de la Salud, Universidad
Autónoma Metropolitana, Unidad
Iztapalapa**

ASESOR:

Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo

**Laboratorio de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Pediatría**

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis presentada por la M.V.Z. Tania Jiménez Cabrera, con el título: "Efecto de la Epigallocatequina -3- galato sobre las alteraciones producidas en la criptorquidia experimental" con fecha de 22 de septiembre de 2017.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

Dra. Herlinda Bonilla Jaime



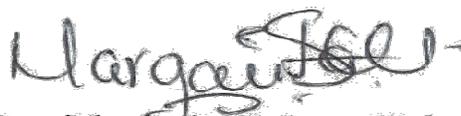
SECRETARIA

Dra. Edith Arenas Ríos



VOCAL

Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña



VOCAL

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar



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 48/2015.

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT clave 003797.

Este proyecto conto con el apoyo de la beca otorgada por parte de CONACyT con el No. de registro 593012.

DEDICATORIAS

A Julio Valle Hernández

Porque viste en mí, más, de lo que yo misma pude ver, porque me hiciste soñar y me impulsaste a luchar por esos sueños, por ser mi mejor amigo, mi maestro y el amor de mi vida. Sin ti, esto no hubiera sido posible, ¡Te Amo!

A mi madre María Emma Pueblito

Por ser una guerrera incansable que me inspira a seguir adelante y por estar conmigo durante las tormentas más fuertes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Julio, por no dejarme caer y ayudarme a crecer todos los días.

A Pueblito, por confiar en mí y echarme porras.

A la Sra. Lupita y el Sr. Alberto, por abrirme las puertas de su casa y alentarme a volar.

A Thor, por acompañarme en esas noches de desvelo, echado a mis pies.

A Omar, Lalo, Sandra, Daniel, Brenda y Pablo por los ratos compartidos, gracias por las sonrisas, las experiencias y los abrazos ¡sigamos adelante!

En general a todos los directivos y miembros de la Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría, ya que la ayuda siempre está disponible.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología de la Reproducción: Dra. Margarita Chávez, Dr. Francisco Jiménez y Dr. Julio Rojas por compartir sus conocimientos y darme su apoyo para aprender las diferentes técnicas

A Luis, Estefanía, Dany, Naty, Fabiola, Arely e Irene por su apoyo y amistad durante el tiempo que coincidimos en el laboratorio.

Con cariño, a la Dra. Rosa María Viguera, por creer en mí y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, gracias por todo el apoyo brindado y las experiencias compartidas.

A la Dra. Marcela Arteaga por ser un ejemplo de vida.

Gracias en especial al Técnico Pedro Medina Granados, por su ayuda incondicional en todos los procedimientos histológicos e inmunohistoquímicos.

Agradezco el apoyo de la Dra. Noemí Cárdenas en la técnica de enzimas antioxidantes. A la QFB Isabel Coronado y Norma Labra por su apoyo en el aprendizaje para la determinación de proteínas. Al Dr. Daniel Méndez por su apoyo con la técnica de Lipoperoxidación y al Maestro Daniel Landero por su ayuda en la técnica de RT-PCR.

ÍNDICE

1. Resumen	9
2. Abstract	10
3. Introducción	11
3.1 Criptorquidia	11
3.2 Proceso de descenso testicular	12
3.3 Espermatogénesis	16
3.4 Apoptosis	19
3.5 Factores etiológicos de la Criptorquidia	21
3.6 Producción de Radicales Libres de oxígeno y Nitrógeno	27
4. Antecedentes	32
4.1 Estrés Oxidante y Criptorquidia	32
4.2. Tratamiento para la Criptorquidia	36
4.3 Té verde (<i>Camellia Sinensis</i>)	37
4.3.1 Epigallocatequina-3-galato	39
4.4 Modelo Animal conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) raza chinchilla	39
5. Justificación	40
6. Objetivos	40
7. Hipótesis	41
8. Material y métodos	41
8.1 Diseño experimental	41
8.2 Procedimiento para la obtención de tejido testicular	43
8.3 Procesamiento del tejido testicular para su análisis morfológico	44
8.4 Procesamiento del tejido para inmunohistoquímica (Ki-67, TUNEL)	45

8.5 Determinación de concentraciones Hormonales (Inhibina B y Testosterona)	47
8.6 Determinación de Enzimas Antioxidantes (SOD y Catalasa)	48
8.7 Determinación de lipoperoxidación (TBARS)	49
8.8. Análisis Estadístico	49
9. Resultados	50
9.1 Descripción anatómica	50
9.2 Parámetros morfométricos	51
9.3. Análisis Histológico	52
9.4 Determinación de Apoptosis y proliferación celular	58
9.5 Determinación de concentraciones Inhibina B	62
9.6 Determinación de Enzimas Antioxidantes (SOD y Catalasa)	63
9.7 Determinación de marcador de estrés oxidante (lipoperoxidación)	65
10. Discusión	66
11. Conclusiones	76
12. Perspectivas	76
13. Bibliografía	77

ABREVIATURAS

CO	Criptorquidia
EGCG	Epigallocatequina -3-galato
CS	Grupo control sano
CS/EGCG	Grupo control sano + EGCG
CO	Grupo Criptorquidia
CO/EGCG	Grupo Criptorquidia + EGCG
T	Testosterona
SOD	Súper óxido dismutasa
CAT	Catalasa
LSC	Ligamento Suspensor craneal
INLS3	Hormona similar a la insulina
GREAT	Receptor acoplado a la proteína G que participa en el descenso del testículo por sus siglas en ingles
PV	<i>Processus vaginalis</i>
NGF	Nervio genitofemoral
PGRC	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
HIM	Hormona Inhibidora de Müller
CMS	Células madre espermatogoniales
RA	Receptor de Andrógenos
LH	Hormona Luteinizante
STD	Síndrome de disgenesia testicular
RL	Radicales Libres
EROs	Especies reactivas de oxígeno
hCG	Gonadotropina coriónica humana
GnRH	Hormona Liberadora de gonadotropinas
DE	Disruptores endócrinos
INB	Inhibina B
LAM	Células de Leydig Adultas Maduras
LAI	Células de Leydig Adultas Inmaduras
LARF	Células de Leydig Adultas de reciente formación
MDA	Malondialdehido
Apr	Espermatogonias A, pareadas
Aal	Espermatogonias A, alineadas
WnT	Grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas

1. RESUMEN

La Criptorquidia (CO) o no descenso testicular es una patología común con una prevalencia mundial de 2-4% en niños neonatos. Dicha condición se ha asociado con estrés oxidante que puede intervenir en la inadecuada diferenciación del gonocito a espermatogonia. Esta disrupción puede ser la causa de infertilidad en la vida adulta y de incrementar el riesgo de padecer cáncer testicular. Existen diversos compuestos con actividad antioxidante como la Epigallocatequina-3-galato (EGCG), compuesto polifenólico abundante en el té verde, el cual tiene la capacidad de captar radicales libres y estimular el sistema antioxidante endógeno. Por lo que el objetivo de este proyecto fue, determinar el efecto de la administración de EGCG, sobre las alteraciones producidas por estrés oxidante, consecuencia de la criptorquidia. Para ello se estudiaron 20 conejos raza chinchilla distribuidos en 4 grupos: 1): Control sano (CS); 2): con CO inducida por administración de 17β estradiol ($500\mu\text{g}$) (CO); 3): CO+EGCG (5 mg/kg) (CO/EGCG) y 4): CS+EGCG (CS/EGCG). Se realizó eutanasia a los 120 días posparto, se determinaron alteraciones histológicas; cuantificación de gonocitos, espermatogonias y células de Leydig, índice de apoptosis; proliferación celular y concentración de testosterona (T), así como la medición indirecta de la actividad enzimática de SOD y CAT, y lipoperoxidación. Con los resultados obtenidos, se observó que el Grupo CS presentó características de etapa puberal, consistentes con lo reportado por otros autores. Para el grupo CO, se observaron características representativas de alteraciones reportadas en la criptorquidia, como interrupción de la espermatogénesis, células germinales indiferenciadas, aumento de apoptosis, reducción de proliferación y actividad de SOD y CAT, además de bajas concentraciones de T. El grupo CO/EGCG presentó una reducción de las alteraciones morfológicas y hormonales asociado con incremento de la actividad de SOD y CAT. Finalmente el grupo CSE presentó un importante desarrollo testicular. Con lo que se concluyó que la EGCG incrementó la actividad del sistema endógeno antioxidante demostrando un efecto protector frente a las alteraciones testiculares producidas por el estrés oxidante generado durante la CO experimental. Esto a su vez activó la proliferación y diferenciación celular que restaura la población de células germinales.

2. ABSTRACT

Cryptorchidism (CO) or non-testicular descent is a common pathology with a worldwide prevalence of 2-4% in neonates. This condition has been associated with oxidative stress that can interfere in the inadequate differentiation of gonocito to spermatogonia. This disruption can be the cause of infertility in adult life and increase the risk of testicular cancer. There are several compounds with antioxidant activity such as Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a polyphenolic compound abundant in green tea, which has the ability to capture free radicals and stimulate the endogenous antioxidant system. Therefore, the objective of this project was to determine the effect of EGCG administration on alterations caused by oxidative stress, a consequence of cryptorchidism. For this purpose, 20 chinchilla rabbits distributed in 4 groups were studied: 1): Healthy control (CS); 2): with CO induced by administration of 17β estradiol (500 μ g) (CO); 3): CO + EGCG (5 mg / kg) (CO / EGCG) and 4): CS + EGCG (CS / EGCG). Euthanasia was performed at 120 days postpartum; histological alterations were determined; quantification of gonocytes, spermatogonia and Leydig cells, apoptosis index; cell proliferation and testosterone (T) concentration, as well as indirect measurement of SOD and CAT enzyme activity and lipoperoxidation. With the results obtained, it was observed that the CS group presented characteristics of pubertal stage, consistent with that reported by other authors. For the CO group, representative characteristics of alterations reported in cryptorchidism, such as interruption of spermatogenesis, undifferentiated germ cells, increased apoptosis, reduced proliferation and SOD and CAT activity, and low T concentrations were observed. The CO group / EGCG presented a reduction in morphological and hormonal alterations associated with increased SOD and CAT activity. Finally the CSE group presented a significant testicular development. It was concluded that EGCG increased the activity of the endogenous antioxidant system, showing a protective effect against the testicular alterations produced by the oxidative stress generated during the experimental CO. This in turn activated the cell proliferation and differentiation that restored the germ cell population.

3. INTRODUCCIÓN

El sexo cromosómico se establece en el momento de la fecundación, en humanos los machos son XY y las hembras XX. El origen de los órganos reproductivos de ambos sexos parte de primordios comunes, la entonces llamada gónada bipotencial, comienza a diferenciarse en torno a la sexta semana de gestación en el humano. En el varón, en el cromosoma Y el gen SRY es el que actúa para determinar el desarrollo de testículos (Neill y Knobil 2006; Schatten y Constantinescu 2008; Bay *et al.*, 2011). Una vez que las gónadas se han diferenciado a testículos, estos deben descender al escroto, ya que el proceso de espermatogénesis se produce óptimamente 4°C menos que la temperatura corporal (Thundathil *et al.*, 2012; Huang *et al.* 2012; Li *et al.* 2013; Durairajanayagam *et al.* 2015).

3.1 Criptorquidia

El término criptorquidia, proviene del griego *kriptos*: oculto y *orquis*: testículo, “testículo oculto” y se define como una posición anormal de los testículos, ya que están ausentes de la bolsa escrotal. Cuando es unilateral se conoce como monorquidia. El testículo criptorquídico se localiza a lo largo del trayecto habitual de descenso, por lo que puede ubicarse, tanto en posición intraabdominal como inguinal, siendo inguinal la localización más frecuente (Virtanen *et al.* 2007; Hutson *et al.* 2010) y de mayor riesgo la posición abdominal bilateral.

La distinción más importante se hace, entre el testículo palpable y el testículo no palpable. Cuando la posición del testículo es palpable se utilizan términos como: *peeping testis* (deslizamiento dentro y fuera del anillo inguinal interno), canalicular, extra-canalicular (bolsa inguinal superficial), supra púbico (alto escroto/deslizable) o ectópico. Los testículos no palpables pueden ser intraabdominales, ausentes, atróficos o inguinales (pero difíciles de palpar).

La Criptorquidia (CO), o testículos no descendidos, es el trastorno más común de las glándulas endocrinas masculinas en los niños (Ashley *et al.* 2010; Ayhan *et al.* 2013). El rango global de incidencia, actualmente aceptado es de 2 a 4% en niños a término y hasta un 30% en varones

prematureros (Virtanen *et al.* 2007; Ashley *et al.* 2010; Hutson *et al.* 2010; Chen *et al.* 2012; Hutson *et al.* 2013a; Braga y Lorenzo 2017). Hasta el momento se ha reportado que Dinamarca es el país con mayor incidencia, con 9% de prevalencia anual (Ferguson y Agoulnik 2013). Aunque actualmente no se cuenta con datos epidemiológicos precisos acerca de la incidencia de CO en México; sin embargo, por comunicación directa se sabe que el Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud reporta un total de 110 casos de niños con testículos no descendidos registrados al año.

3.2 Proceso de Descenso Testicular

Para que el descenso testicular se lleve a cabo, es necesario que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada sea funcional, así como elementos anatómicos normales (Hutson *et al.* 2016), como son: el desarrollo del epidídimo, del conducto deferente, el gubernáculo, el ligamento suspensor craneal (LSC), el proceso vaginal, el canal inguinal, el mismo testículo y la bolsa escrotal (Hutson *et al.* 2015).

El descenso testicular se divide en dos fases, la primera fase corresponde a la migración de los testículos de la posición abdominal hacia la región inguinal (fase transabdominal) y la segunda involucra el descenso de la región inguinal a la bolsa escrotal (fase inguinoescrotal). La duración de estas fases varía considerablemente en los diferentes mamíferos (Duan *et al.* 2015). La segunda fase del descenso se completa previo al nacimiento, en el humano; mientras que en el conejo se completa en torno a los 50 días postparto (Hutson *et al.* 2013b)

3.2.1 Fase transabdominal

Esta primera fase corresponde al descenso desde el abdomen al anillo inguinal interno. Antes de esta migración, los testículos se desarrollan en la superficie anteromedial del mesonefros en la cresta urogenital. Se encuentran anclados en posición craneal por el LSC y caudalmente por el ligamento genitoinguinal o gubernáculo (Hutson *et al.* 2013b) (Figura 1).

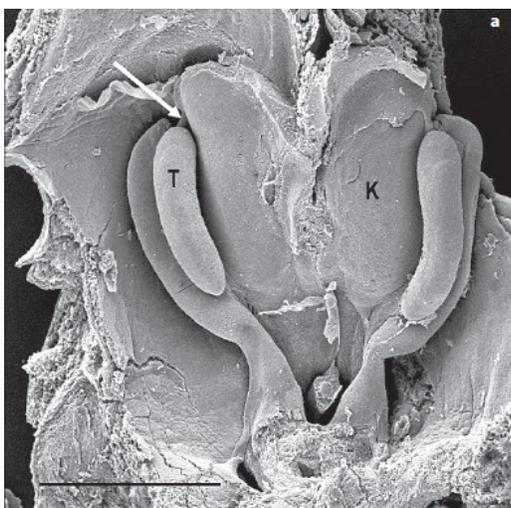


Figura 1. Electro Micrografía que muestra la posición inicial de los testículos en la superficie anteromedial del mesonefros, previo al descenso testicular. Donde se observa el LSC (flecha blanca), T= testículos, K=mesonefros. Tomado de (Kassim *et al.* 2010).

Esta fase está regulada por la hormona similar a la insulina (INLS3- Insulin-like factor 3) producida por la célula de Leydig (Kaftanovskaya *et al.* 2012; Braga y Lorenzo 2017). Actúa a través de su receptor RXFP2 o LGR8 (un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G rico en leucina), también conocido como GREAT (receptor acoplado a la proteína G que participa en el descenso del testículo) que se expresa en el gubernáculo (Favorito *et al.* 2014; Braga y Lorenzo 2017). Esta primera fase requiere la involución del LSC, que es iniciada por la testosterona (Hutson *et al.* 2010), y el desarrollo del gubernáculo, estimulado por la hormona INSL3 (Hutson *et al.* 2016).

INSL3 tiene un papel en la proliferación, diferenciación y supervivencia de componentes celulares específicos del gubernáculo (Kaftanovskaya *et al.* 2011, 2012) al inducir la producción de AMP cíclico (AMPc) en el tejido gubernacular, y activar las cascadas de señalización río abajo que incluyen las vías BMP, β -catenina y Wnt, así como la señalización Notch (Bay *et al.* 2011). Inicialmente, el gubernáculo es corto y delgado, y gradualmente se expande e invade más profundamente en la musculatura abdominal (Amann y Veeramachaneni, 2007), aumenta sustancialmente en tamaño, (Amann y Veeramachaneni 2007; Nation *et al.* 2011; Hutson *et al.* 2013a), por una pronunciada multiplicación celular y

acumulación de glucosaminoglicanos, como el ácido hialurónico (Hutson y Hasthorpe 2005; Favorito *et al.* 2014; Hutson *et al.* 2016). Estas sustancias actúan como agentes hidrófilos aumentando la cantidad de agua (Favorito *et al.* 2014). De esta forma el gubernáculo se vuelve una estructura, voluminosa y de textura viscosa (Hutson *et al.* 2013b) (Figura 2).

Estos cambios junto con el crecimiento fetal ejercen presión continua en el testículo (Amann y Veeramachaneni 2007; Hutson *et al.* 2013a; Favorito *et al.* 2014). El gubernáculo conecta al testículo, vía epidídimo, al anillo interno del canal inguinal (Hutson y Hasthorpe 2005). En el humano, los testículos se deslizan por la cavidad abdominal sobre los conductos genitales y quedan enclavados caudalmente por el gubernáculo junto con el epidídimo, hasta situarse junto al orificio inguinal interno en torno a la 15ª semana de gestación (Amann y Veeramachaneni, 2007), permaneciendo en esta situación diez semanas más. Se ha observado que el gen *Hoxa 10* está implicado en el mecanismo de descenso (Docampo y Hadziselimovic, 2015). Ya que tanto el cordón como el bulbo gubernacular, son sitios con una fuerte expresión de ARNm de *Hoxa10* (Agoulnik y Feng 2007; Kojima *et al.* 2009) y la delección de los 2 miembros de esta familia, *Hoxa10* y *Hoxa11*, resulta en criptorquidismo unilateral o bilateral (Kaleva y Toppari 2003; Feng *et al.* 2006; Nightingale *et al.* 2008).

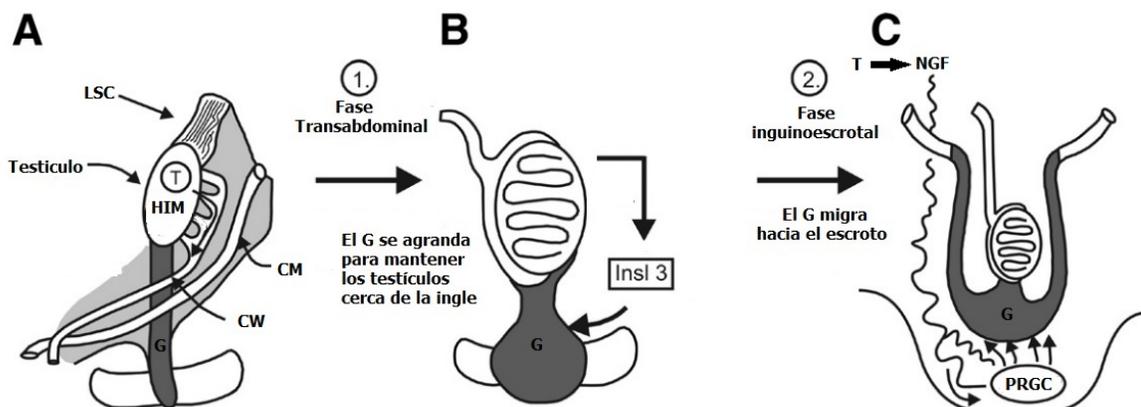


Figura 2. Esquema que presenta el proceso de descenso testicular. A. El Ligamento suspensorio craneal (LSC) y el gubernáculo (G) sostienen a los testículos. La testosterona (T) y la Hormona Inhibidora de Müller (HIM) actúan sobre el conducto de Wolff (CW) y el conducto de Müller (CM). B. La hormona similar a la insulina 3 (InsI3) provoca la reacción de sobre desarrollo gubernacular que mantiene los testículos cerca de la ingle durante la mitad del crecimiento gestacional. C. El Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) liberado por el nervio genitofemoral, bajo el control de la testosterona, dirige la migración del gubernáculo hacia escroto. Tomado y modificado de Hutson *et al.*; (2013).

Después de concluir la primera fase de descenso, existe una pausa significativa, es decir un espacio de tiempo antes de dar inicio a la segunda fase, de aproximadamente 10 semanas en el caso de humano, tiempo en que se desarrolla el sistema nervioso central (Thorup *et al.* 2010).

3.2.2 Fase Inguinoescrotal

Al inicio de la migración transinguinal, las estructuras que contribuyen a formar el futuro cordón espermático, se alargan sustancialmente (Amann y Veeramachaneni, 2007). Esta fase ocurre entre las 24 y 34 semanas de gestación en el humano y es andrógeno-dependiente. La testosterona y los receptores de andrógenos regulan el proceso de descenso desde el canal inguinal hasta el escroto (Braga y Lorenzo 2017). A medida que migra, la membrana peritoneal forma un divertículo en su interior (processus vaginalis [PV]) (Hutson *et al.* 2013b) que se alarga a través del anillo inguinal interno entre los músculos oblicuos internos y externos, creando un camino para que el testículo llegue al escroto (Braga y Lorenzo 2017).

El aumento del volumen gubernacular, bajo control de INLS3, provoca la dilatación del canal inguinal y los testículos son empujados a través del canal por cambios en la presión intra-abdominal (Hutson *et al.* 2013a; Braga y Lorenzo 2017). A través de un mecanismo indirecto, la testosterona, estimula a los axones que conforman el nervio genitofemoral (NGF) (Hutson *et al.* 2013b), para inducir la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PGRC por sus siglas en inglés; calcitonin gene related peptide). Este neuropéptido, promueve contracciones rítmicas en el gubernáculo, que guían al testículo hacia el escroto (Braga y Lorenzo 2017). Se ha observado que el PGRC aumenta la división celular y también tiene un efecto quimiotáctico en la punta de la gubernáculo (Yong *et al.* 2008) y a medida que este sobresale hacia el escroto, tira del testículo hacia abajo en la misma dirección (Favorito *et al.* 2014).

Una vez que el gubernáculo ha alcanzado el escroto, la matriz extracelular, voluminosa y viscosa, se reabsorbe. Dejando un pequeño remanente fibroso que se convierte en adherente al interior del escroto (Hutson *et al.*, 2015,) (Figura 2).

En la mayoría de los mamíferos, la espermatogénesis debe producirse a unos pocos grados por debajo de la temperatura corporal ya que las células espermatogénicas son extremadamente sensibles al calor (Widlak y Vydra 2017).

3.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis se ubica entre los procesos de desarrollo más complejos, en donde se lleva a cabo una sucesión de eventos de proliferación y transformación celular (Fleck *et al.* 2016). Este se compone por tres actividades biológicas distintas (Shaha *et al.* 2010); (Griswold 2015):

- a) Renovación continua de espermatogonias por mitosis
- b) Producción de células haploides a partir de células progenitoras diploides (meiosis)
- c) Diferenciación única de células haploides (espermátidas redondas) en espermatozoides (espermiogénesis).

El tubo seminífero es la unidad funcional del testículo, a lo largo de su epitelio, se llevan a cabo las etapas de la espermatogénesis (Fleck *et al.* 2016). La población celular está conformada por las células de Sertoli y las células germinales. El tubo está rodeado de células mioideas también conocidas como peritubulares. En el intersticio se encuentran las células del Leydig, células responsables de la producción de andrógenos y son células clave para la regulación del desarrollo del tracto reproductivo masculino, la espermatogénesis, la manifestación de la conducta sexual y la expresión de los caracteres secundarios (Manku y Culty 2015).

- a) Renovación de espermatogonias por mitosis.

En los mamíferos, la espermatogénesis no puede iniciar si no se presenta la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias, que conforman las células madre del epitelio seminífero

(Kolasa *et al.* 2012). Estas darán origen a la línea germinal de todas las células de la espermatogénesis (García *et al.* 2013).

Los gonocitos, nombre que se les da a la células germinales primordiales una vez que llegan a la cresta gonadal y se ubican en el centro de los cordones seminíferos (Drumond *et al.* 2011; Kolasa *et al.* 2012; Hutson *et al.* 2013a) y se encuentran detenidos en la fase G0 del ciclo celular (Drumond *et al.* 2011). En roedores, después del nacimiento, los gonocitos se desplazan hacia la membrana basal y reanudan la proliferación, dando lugar a la célula madre espermatogonial adulta (Drumond *et al.* 2011; Kolasa *et al.* 2012; Chen y Liu 2015).

Los defectos en el desarrollo apropiado de los gonocitos, en la diferenciación de espermatogonias o en la progresión de la meiosis conducen a una detención en la maduración. Estos trastornos son las principales causas de azoospermia, que ocurre en el 1% de todos los hombres y en el 10-15% de los hombres infértiles (García y Hofmann 2013).

En el murino, una vez que comienza su camino hacia la diferenciación, las espermatogonias A dan lugar, a través de la mitosis, a dos células hijas que permanecen conectadas por puentes intercelulares, llamadas espermatogonias pareadas A (Apr). Estas células se dividen formando cadenas de espermatogonias alineadas A (Aal), que puede dividirse dos o tres veces más en ratones. La espermatogonia Aal se diferenciará, sin división mitótica, en tipo A1 y estas presentan seis divisiones mitóticas sucesivas para producir espermatogonias A2, A3, A4, tipo intermedio (In) y tipo B. Finalmente, la espermatogonia tipo B se dividirá dando lugar a espermatocitos. Dando inicio a la división meiótica (Drumond *et al.* 2011; Kolasa *et al.* 2012; Yang y Oatley 2014; Griswold 2015; Chen y Liu 2015).

b) Meiosis.

Este proceso es esencial para la producción de gametos haploides a partir de espermatocitos primarios diploides. La profase de la meiosis I se divide en 5 sub etapas: leptoteno, zigoteno, paquiteno diploteno y diacinesis. Durante estas etapas, las rupturas de doble cadena del ADN,

la alineación, la sinapsis de homólogos, y la formación de “*crossover*” aseguran la recombinación homóloga entre cromátides no hermanas, con la finalidad de que el material genético de las células hijas sea la mitad (n) de las células progenitoras (Chen y Liu 2015).

Los espermátocitos en paquiteno temprano, son considerados adultos (Drumond *et al.* 2011), de tal modo que el final de la meiosis comienza, dando como producto final la generación de espermátidas redondas haploides. Estas a su vez darán comienzo con la etapa de espermiogénesis, transformándose en espermátidas alargadas.

- c) La diferenciación de células haploides (espermátidas) en espermatozoides (espermiogénesis).

La espermiogénesis es el proceso mediante el cual las espermátidas redondas haploides completan una extraordinaria serie de pasos, para convertirse en espermatozoides aerodinámicos con capacidad motil, que finalmente serán liberados del epitelio seminífero a través de un proceso conocido como espermiación (O’Donnell 2015).

Los diferentes pasos o fases de la espermiogénesis se distinguen por la aparición morfológica del acrosoma en desarrollo y la forma cambiante del núcleo. En la fase del acrosoma, el núcleo y el acrosoma se polarizan a un lado de la célula, señalando el comienzo de la fase de alargamiento (Rathke *et al.* 2014). En este momento, la espermátida forma una unión intercelular única con la célula de Sertoli y el núcleo comienza a cambiar de forma y compactación, para lograr la densa forma de la cabeza, específica de la especie (O’Donnell 2015). Durante la compactación, la cromatina nucleosómica se transforma en fibras de cromatina compacta mediante la sustitución de histonas por proteínas de transición, que posteriormente son sustituidas por protaminas. La espermátida cesa la transcripción génica activa a medida que los nucleosomas desaparecen y la cromatina es remodelada y compactada (Rathke *et al.* 2014; O’Donnell 2015).

El componente central del flagelo, el axonema compuesto por microtúbulos, se ensambla poco después de la terminación de la meiosis (Rathke *et al.* 2014). La etapa final de la espermiogénesis se conoce como espermiación, y es el proceso por el cual las espermátidas alargadas experimentan su remodelación final y liberación del epitelio seminífero hacia la luz tubular (O'Donnell 2015).

Una temperatura adecuada es esencial para que la espermatogénesis se lleve a cabo con éxito (Chen y Liu 2015). Por lo que el aparato masculino, está provisto de un mecanismo de termorregulación que consta de la acción combinada del escroto, los testículos y la vasculatura testicular (Thundathil *et al.* 2012). Durante la espermatogénesis, la apoptosis tiene la función de establecer un equilibrio en la proliferación celular, controlando una producción de células germinales descontrolada.

3.4 Apoptosis

La apoptosis es una vía de destrucción o muerte celular programada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente (Fink y Cookson 2005). Existen dos vías principales para desencadenar apoptosis:

3.4.1 Vía extrínseca

La vía extrínseca se inicia mediante la activación de receptores de muerte, tales como Fas (CD95/Apo-1) o receptor de factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1). La trimerización de los receptores de muerte en respuesta a la unión del ligando induce la formación de un complejo multimérico denominado complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que activa procaspasas-8 en ratones y caspasas-10 en seres humanos. La caspasa-8 y/o 10 proteolíticamente procesan caspasas-3, -6 y -7. Entre ellas, la caspasa-3 es la caspasa principal implicada en el desmantelamiento del aparato de Golgi, la fragmentación de la lámina nuclear, la fragmentación del ADN (debida en parte a la proteólisis de un inhibidor de la DNAsa) y la disminución del potencial de la membrana mitocondrial (Circu y Aw 2010; Lagos y Moreno 2012) (Figura 3).

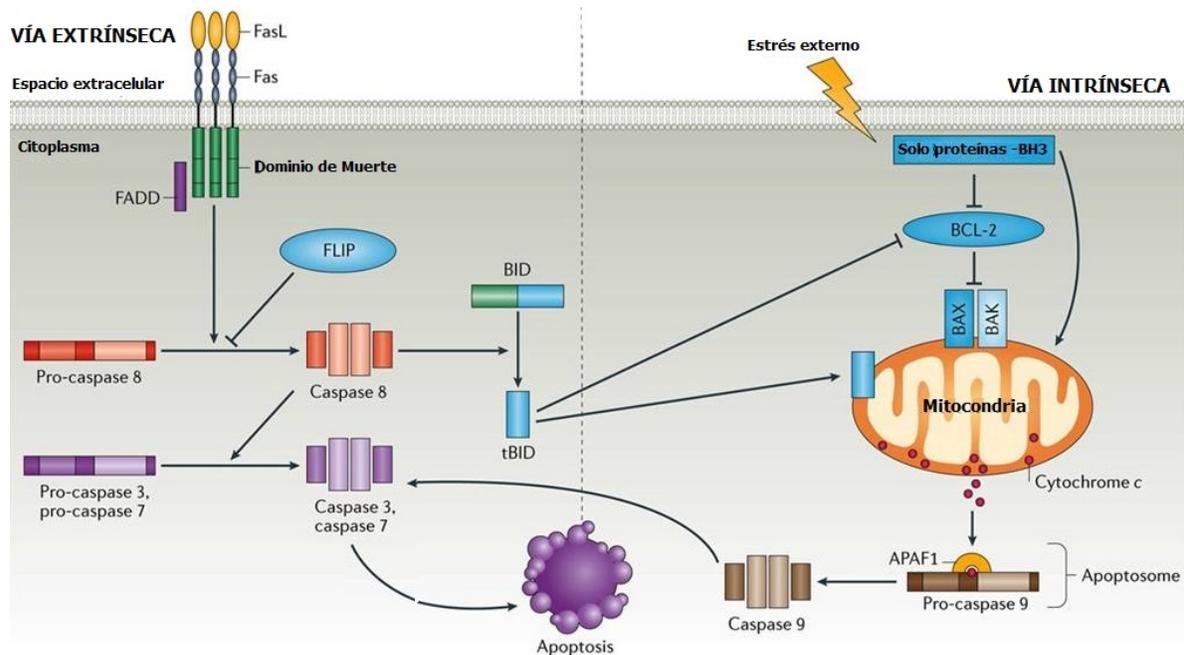


Figura 3. Esquema que ejemplifica las vías de apoptosis. Vía extrínseca mediada por la unión del ligando Fas (FasL) a su receptor que conduce a la escisión y activación de la caspasa 8, a través de la asociación de la proteína adaptadora Fas al dominio del dominio de muerte (FADD). Posteriormente, la caspasa 8 escinde y activa la caspasa 3 y la caspasa 7, que a su vez inducen la fase degradativa de la apoptosis. Vía intrínseca, las proteínas BH3 sólo pueden secuestrar proteínas anti-apoptóticas BCL-2, o activar directamente las proteínas multi-BH3 proapoptóticas, BAK y BAX que inducen la liberación de citocromo c de la mitocondria. El citocromo c se une a APAF1 y forma un complejo con pro-caspasa 9 (apoptosoma). La activación del apoptosoma a su vez induce la apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 y la caspasa 7. Una vía alternativa de la muerte celular inducida por Fas implica la diafonía entre las vías apoptóticas extrínsecas y las intrínsecas. Esta diafonía está mediada por la forma trunca de BID (tBID), que induce la apoptosis translocando a la mitocondria. Tomado de Cuda et al., (2016).

3.4.2. Vía intrínseca

La vía intrínseca de la apoptosis podría ser activada por diferentes estímulos, tales como radiación, fragmentación del ADN, inanición, estrés oxidante y autofagia (Cuda et al. 2016). Esta vía se caracteriza por una disminución del potencial de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C de la mitocondria, que junto con dATP, la proteína citosólica Apaf-1 y procaspasa-9 ensamblan un complejo llamado apoptosoma. Dentro de este complejo, procaspasa-9 se activa y luego activa la caspasa-3, conectando las vías intrínsecas y extrínsecas (Shi et al. 2011; Cuda et al. 2016). La estabilidad de la membrana mitocondrial es preservada por la proteína anti-apoptótica de la familia de linfomas B-2 (BCL-2). BCL-2,

BCL-x y BCL-w son tres proteínas anti-apoptóticas que interactúan y reprimen la actividad de las proteínas pro-apoptóticas (Figura 3).

La estimulación de la vía apoptótica mitocondrial intrínseca por EROs y el daño del ADN mitocondrial promueve la permeabilización de la membrana externa y la translocación de citocromo c, AIF o Smac/Diablo de la mitocondria al citosol, que desencadenan eventos de señalización citosólica dependientes de caspasas o independientes de caspasas. En la señalización dependiente de caspasa, el citocromo c forma el complejo de apoptosoma con el factor activador de la proteasa apoptótica-1 (Apaf-1) y recluta la pro-caspasa-9 que induce la escisión de las caspasas efectoras descendentes -3 y -7. Además, Smac/Diablo antagoniza los efectos inhibitorios de IAPs que aumenta la activación de caspasas. AIF media la señalización independiente de caspasas a través de la translocación citosol-nuclear y la inducción de la condensación de cromatina nuclear y la fragmentación del ADN (Circu y Aw 2010).

En los pacientes con criptorquidia, se ha observado que la apoptosis se encuentra incrementada y por lo tanto, la espermatogénesis es afectada negativamente, causando diferentes alteraciones al epitelio seminífero. Es posible que esta sea una causa de infertilidad en la vida adulta (Bay *et al.* 2011).

3.5 Factores etiológicos de la Criptorquidia

Dado que el descenso testicular implica una compleja interacción entre el control hormonal, una importante remodelación anatómica y el movimiento. Las causas de la CO son multifactoriales (Hutson *et al.* 2013a), y en muchos casos, es considerado un hallazgo clínico más que un diagnóstico etiológico (Lee y Houk; 2013). Por lo cual la CO se considera como una enfermedad de etiología compleja, en la que están implicados factores anatómicos, genéticos, hormonales y ambientales (Docampo y Hadziselimovic 2015):

a) Factores anatómicos

Fallas en factores mecánicos como la tracción del gubernáculo, la formación del PV y posiblemente también del epidídimo, más la presión intraabdominal, pueden estar implicados en la CO (Comploj y Pycha 2012).

El síndrome de Prune Belly, también llamado síndrome del abdomen en ciruela pasa, caracterizado por la deficiencia o hipoplasia de los músculos abdominales, malformaciones de las vías urinarias tales como vejigas grandes e hipotónicas, uréteres dilatados y tortuosos y criptorquidia bilateral (Mata y Chávez 2013). Las teorías más importantes para explicar la CO bilateral en este síndrome son: A) disminución de la contracción de los músculos de la pared abdominal; B) obstrucción mecánica debida a distensión vesical; C) alteración estructural del canal inguinal, que obstaculiza el paso del testículo; y D) alteraciones estructurales en el gubernáculo (Favorito *et al.* 2014).

Del 42% a 61% de los testículos intraabdominales se encuentran en los vasos ilíacos o superior, alejados del anillo interno (alta intraabdominal), lo que podría indicar una falla en la fase de descenso transabdominal (Thorup *et al.*, 2010). Se desconoce la forma en que el gubernáculo se libera de los tejidos conectivos adyacentes, lo que le permite alargarse y unirse bajo la piel hasta el escroto. Es probable que se produzcan enzimas que disuelven la matriz del tejido conectivo durante la migración, y que entonces este proceso se invierte para permitir que el PV en el interior del gubernáculo se fije en el escroto. Sin embargo, hasta la fecha, muy poca investigación se ha hecho de estos procesos (Hutson *et al.* 2010).

Los bebés con malformaciones congénitas de la pared urológica o abdominal, tales como hipospadias, extrofia de la vejiga, síndrome de prune belly, gastrosquisis y onfalocelo, también son más propensos a tener criptorquidia (Braga y Lorenzo 2017).

b) Factores genéticos

La CO puede ser un componente de síndromes por alteraciones cromosómicas o monogénicas, asociada con otras malformaciones congénitas sin causa aparente, o como un defecto no

sindromático o aislado relacionado con ciertos loci (Massart y Saggese, 2010). Los estudios familiares sugieren que la susceptibilidad a la criptorquidia puede ser heredada; está documentado que el 6% de los padres de varones con testículos no descendidos también sufrieron el trastorno (Czeizel *et al.*, 1981), aunque nosotros en un estudio reciente (Chávez *et al.*, 2017) detectamos que el 10% de los pacientes tenían antecedentes familiares, lo cual puede deberse a las diferencias étnicas de cada población, sin embargo, se sugiere que existen componentes genéticos involucrados, pero los genes implicados aún no están bien establecidos (Barthold 2008).

El estudio en modelos animales ha informado que, mutaciones espontáneas y específicas en roedores proporcionan una fuente potencial de genes candidatos para la presencia de criptorquidia no sindrómica humano (Barthold 2008). Ratones transgénicos con delección de *Insl3* son viables pero muestran un fenotipo severo de criptorquidia que, sugiere la naturaleza crucial de *INSL3* en el proceso de descenso testicular. Además, estos ratones tienen anomalías del desarrollo del gubernáculo, espermatogénesis anormal e infertilidad (Ashley *et al.* 2010). Sin embargo su papel en la criptorquidia humana es incierto (Thorup *et al.* 2010). Aunque otro estudio encontró que sólo el 1.9% de los casos de criptorquidia puede ser causada por mutaciones del gen *INSL3*. Del mismo modo, las mutaciones del receptor *INSL3* (*LGR8*) son infrecuentes (Thorup *et al.*, 2010).

Por otro lado, se menciona que, mutaciones del gen *SOX9* son responsables, en la mayoría de casos, de alteraciones esqueléticas y genitales, así como mutaciones en los genes *WT-1* o *SRY* (Virtanen *et al.*, 2007). También se ha observado que la delección de los 2 miembros de esta familia, *Hoxa10* y *Hoxa11*, resulta en criptorquidismo unilateral o bilateral (Kaleva y Toppari 2003; Feng *et al.* 2006; Nightingale *et al.* 2008).

Mutaciones del gen que codifica para el receptor de los andrógenos (RA) pueden resultar en resistencia al andrógeno e intervenir el descenso inguinoscrotal (Braga y Lorenzo 2017). Por otro lado en un estudio poblacional, se encontró que los cocientes de riesgo para la criptorquidia eran 10.1 en gemelos, 3.5 en hermanos y 2.3 en descendientes de padres que

tenían un testículo no descendido. Estos datos sugieren un riesgo 5 veces mayor en la progenie de padres afectados y 7 a 10 veces mayor en aquellos con un hermano afectado, comparados con los pacientes sin antecedentes familiares del desorden (Ashley *et al.* 2010).

c) Factores hormonales

El descenso testicular normal depende de un eje hipotálamo-hipófisis-testicular funcional. Las malformaciones del sistema nervioso central, como la holoprosencefalia, y el hipogonadismo hipogonadotrópico congénito pueden estar asociados con la CO (Virtanen *et al.*, 2007). Ya que puede existir una deficiencia en el funcionamiento de dicho eje para la producción de gonadotropinas de la hipófisis fetal (por ejemplo, LH y FSH), y a su vez, en la regulación de la producción testicular de andrógenos importantes en la segunda fase del descenso testicular (Hutson y Hasthorpe 2005; Hutson *et al.* 2013b). Una falla en la producción de gonadotropina coriónica humana (hCG) por la placenta, así como en la producción de INSL3 por las células de Leydig, puede alterar la primer fase de descenso (Hutson *et al.* 2013a, b).

Se ha sugerido que un déficit de MIH produce alteraciones en la primera fase de la migración (Hutson y Hasthorpe, 2005).

La producción o acción insuficiente de andrógenos induce la sub-virilización del macho. Las deficiencias de la 5α -reductasa, la proteína StAR, la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la 17α -hidroxilasa/ 17 - 20 liasa o la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa pueden causar resistencia a los andrógenos. Sin embargo algunos estudios han sido inconsistentes, al evaluar concentraciones normales o reducidas de andrógenos y comparar concentraciones de testosterona entre pacientes con CO y controles. Así también para concentraciones normales o relativamente altas de la Hormona Luteinizante (LH) (Ashley *et al.*, 2010).

En las formas completas de hipoplasia de células de Leydig o resistencia a andrógenos, los genitales externos son femeninos, con testículos situados intraabdominales o en la ingle (Virtanen *et al.* 2007). Por otro lado, existe evidencia a partir de experimentos con roedores

que sugiere un alto grado de interconectividad entre INSL3, testosterona y sus respectivos receptores. Ya que los datos histológicos ilustran que la ablación del receptor INSL3 en ratones *Rxfp2*^{-/-} da como resultado una pronunciada apoptosis de células positivas a receptores de andrógenos en la parte craneal del gubernáculo, junto con una disminución del tamaño gubernacular (Yuan *et al.* 2010; Bay *et al.* 2011).

d) Factores ambientales (disruptores endócrinos)

En los años 90's Sharp and Skakkebaek propusieron que no sólo el cáncer de testículo, sino también otros trastornos reproductivos masculinos como la criptorquidia, hipospadias y bajo recuento de espermatozoides pueden compartir un origen fetal común, y que la exposición ambiental a sustancias químicas con acciones que imitan a los estrógenos podrían desempeñar un papel fundamental en la interrupción del desarrollo normal de la gónada fetal masculina, durante la fase tardía del primer trimestre de gestación (Bonde *et al.*, 2016). Es por esto que algunos autores sugieren que un incremento en la incidencia de criptorquidia puede tener un origen ambiental (Bay *et al.* 2006; Amann y Veeramachaneni 2007; Barthold 2008; Martin *et al.* 2008).

Se ha documentado, que la exposición a pesticidas, estrógenos, aditivos plásticos, o fitoestrógenos naturales, durante la etapa gestacional puede estar relacionado con el incremento en la incidencia de enfermedades del tracto reproductivo como la CO (Comploj y Pycha 2012). Los ftalatos son una de las clases de disruptores endocrinos ambientales (DE), que se utilizan como plastificantes para los plásticos de cloruro de polivinilo. Recientemente, se ha prestado atención a estas sustancias químicas debido a que la exposición prenatal a ftalato en ratas puede causar síndrome de disgenesia testicular (SDT) en descendientes masculinos postnatalmente (Chen *et al.* 2015) Sedha *et al.*, 2015).

Además, se ha demostrado que una amplia variedad de sustancias químicas/xenobióticos ambientales incluyendo ftalatos causan estrés oxidante que potencialmente apunta al sistema endocrino y causa anomalías reproductivas (Sedha *et al.*, 2015).

2.5.1 La CO como factor de riesgo de cáncer testicular y alteración de la fertilidad

Se ha reportado que, el riesgo de padecer cáncer testicular, para adultos con antecedentes de criptorquidia, es de 5 a 10 veces mayor que la población en general (Hutson *et al.* 2010; Kvist *et al.* 2014), y estadísticamente, el 5% de los cánceres testiculares están asociados con criptorquidia (Kvist *et al.* 2014). Por otro lado, un deterioro en la maduración de las células germinales y posterior infertilidad en la edad adulta son consecuencias asociadas a la CO (Chung y Brock 2011).

El hallazgo más consistente en la evaluación histológica del testículo criptorquídico es un desarrollo anormal de células germinales (Ashley *et al.*, 2010) ya sea por pérdida de estas células, o por una detención de la espermatogénesis (Dohle *et al.* 2012). También se ha observado una hipoplasia de las células de Leydig, a partir del primer mes de vida (Herrera *et al.*, 2009) y hialinización de los tubos seminíferos (Abacı *et al.* 2013).

Normalmente la temperatura intraescrotal es de aproximadamente 33°C al nacer, reajustando así, todos los sistemas enzimáticos testiculares (Hadziselimovic *et al.* 2005; Hutson *et al.* 2013a). Sin embargo en la CO, los testículos postnatales, inicialmente normales, permanecen en la almohadilla de grasa inguinal, que es un aislante eficaz, manteniendo a los testículos a una temperatura superior a la normal (34 -37°C en humanos) (Hutson *et al.*, 2013). La alteración de la termorregulación testicular ha sido comúnmente implicada en una espermatogénesis anormal y en la función deteriorada del espermatozoide en animales y seres humanos (Thundathil *et al.* 2012).

Por lo que la importancia de la termorregulación en el testículo se ilustra por el hecho de que un ligero aumento en la temperatura puede interrumpir la espermatogénesis y provocar problemas de fertilidad (Paul *et al.* 2009).

Las células germinales son más vulnerables al estrés por calor, ya que tienen una alta actividad mitótica. Entre las células germinales, los tipos que son más vulnerables al calor son los espermatocitos en paquiteno y diploteno, así como las espermátidas redondas tempranas. Los mecanismos básicos por los que sufren daños incluyen apoptosis y autofagia (Turner y Lysiak 2008; Tower 2012; Durairajanayagam *et al.* 2015). Por lo que, en la criptorquidia, las células germinales, se encuentran expuestas a cualquier tipo de daño por estrés térmico.

Se ha observado que niños con CO, presentan células de Leydig atrofiadas y en algunos de estos la diferenciación de gonocitos a espermatogonias. Así se anula (Docampo y Hadziselimovic, 2015). Se ha reportado que, incluso después de una orquidopexia temprana (intervención quirúrgica para hacer descender los testículos dentro del escroto), queda el riesgo latente de desarrollar infertilidad y cáncer testicular (Virtanen *et al.* 2007).

Lo anterior sugiere que el estrés térmico causa una sobreproducción de radicales libres (RL), en el testículo criptorquídico, que expone a las células germinales a un severo daño, por estrés oxidante (Paul *et al.* 2009; Noori 2012; Tower 2012; Jung *et al.* 2015). Además se ha descrito que el testículo con criptorquidia experimental, demuestra una capacidad antioxidante eficaz en los primeros 4 días, decayendo a partir del día 5, y empeorando hacia el día 28 (Li *et al.* 2006). Por lo tanto las consecuencias de la CO pueden estar asociadas a la generación de estrés oxidante.

3.6 Producción de Radicales libres de oxígeno y Nitrógeno

Durante las funciones metabólicas normales, se generan compuestos altamente reactivos llamados radicales libres (RL) (El-Missiry 2012). La cadena respiratoria en las mitocondrias es el principal sitio de producción de radicales libres derivados del oxígeno, seguido por los peroxisomas y el citosol (Venereo 2002). Se ha observado que el tipo celular en donde existe mayor producción de RL es el eritrocito, los hepatocitos y el tejido renal; órganos que presentan una alta tasa metabólica (Venereo 2002).

Un radical libre es aquél átomo o molécula que, contiene uno o más electrones no apareados (Noori 2012). Dentro de los RL, existen las especies reactivas de oxígeno (EROs) como son: el anión superóxido (reducción univalente del oxígeno; $O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrogeno (reducción divalente del oxígeno; H_2O_2) que aunque no es un RL, puede dar origen al radical hidroxilo ($OH\cdot$), y por último, el oxígeno singlete (1O_2) (El-Bahr 2013).

Tanto O_2 como H_2O_2 , son el resultado de múltiples reacciones. Aunque el H_2O_2 no posee electrones libres, sin embargo, es una molécula muy reactiva, que como ya se dijo puede ser precursora del radical $OH\cdot$ en presencia de metales de transición como hierro y cobre, conocida como la reacción de Fenton (Córdova 2009) (Figura 4). El radical hidroxilo que es considerado el radical responsable de la destrucción de importantes biomoléculas (El-Bahr, 2013).

También existen otros radicales libres que contienen Nitrógeno, como: Óxido nítrico ($NO\cdot$) dióxido nítrico ($NO_2\cdot$) y peroxinitrito ($OONO\cdot$) (El-Bahr 2013). El óxido nítrico (NO) es un gas inorgánico, de corta duración (unos pocos segundos), que debido a su alta solubilidad, se difunde libremente a través de las membranas biológicas. Se sintetiza a partir de L-arginina a través de un oxígeno y la reacción dependiente de NADPH que produce NO y L-citrulina (Tamanini *et al.* 2003).

Aunque el oxígeno es vital para bioprocesos aerobios, hasta el 5% del oxígeno inhalado, se convierte en Especies reactivas de Oxígeno (EROs) (El-Bahr 2013).

Dentro de la vía mitocondrial, se han identificado 10 posibles sistemas generadores de EROs. Entre éstos, los complejos enzimáticos del ciclo de Krebs, tales como α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) y piruvato deshidrogenasa han sido implicados como importantes fuentes mitocondriales de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Circu y Aw 2010).

Otras fuentes mitocondriales interesantes de EROs incluyen a p66Shc y monoamina oxidasa (Circu y Aw 2010). P66Shc, es una enzima del espacio intermembrana, que tiene una actividad pro-oxidante y pro-apoptótica y está implicada en el proceso de envejecimiento. Los

mecanismos para producción EROs mediada por p66shc son poco conocidos (Galimov *et al.*, 2014).

Las monoamina oxidasas (MAO-A y MAO-B) una enzima de membrana externa, regulan el nivel de catecolaminas y serotonina mediante la catalización de su desaminación oxidativa en el corazón. Su expresión aumenta sustancialmente con el envejecimiento (6 veces la MAO-A en el corazón y 4 veces la MAO-B en el tejido neuronal), y su implicación en las enfermedades cardíacas está supuestamente relacionada con la formación de EROs, a través del H₂O₂ (Maggiarani *et al.*, 2017; (Noori 2012). Otras fuentes enzimáticas de EROs bajo niveles subcelulares son xantina oxidasas, ciclooxigenasas (COX) lipoxigenasas (LOX) y NO sintasas (óxido nítrico sintasa) (Noori 2012).

Las EROs participan en funciones benéficas en nuestro cuerpo. Son mediadores de la fagocitosis, reacciones de desintoxicación, eliminación de células precancerosas y de infecciones; están involucradas en vías de señalización para mantener la homeostasis celular en el cuerpo. Regulan muchos procesos metabólicos y celulares incluyendo proliferación, migración, expresión de genes, inmunidad y cicatrización de heridas (Tremellen 2008; Noori 2012) También la regulación de citosinas, factores de crecimiento, acción hormonal, transcripción, transporte de iones, neuromodulación e inmunomodulación (Celino *et al.* 2012).

Sin embargo, al ser moléculas intrínsecamente inestables (El-Missiry 2012), se requiere de un sistema antioxidante para mantener el equilibrio.

3.6.1 Sistema antioxidante

El humano ha evolucionado un sistema de protección antioxidante altamente sofisticado y complejo, para proteger a las células, órganos y sistemas contra los RL. Se trata de una variedad de componentes, tanto endógenos como exógenos que funcionan de forma interactiva y sinérgica para neutralizar los RL (El-Missiry, 2012). La línea primaria de defensa en contra de los RL, son las enzimas antioxidantes y los principales antioxidantes enzimáticos directamente implicados en la neutralización de ROS son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRX) (Gupta *et al.* 2014).

Por otro lado existen antioxidantes derivados de nutrientes como el ácido ascórbico, tocoferoles y tocotrienoles, carotenoides, el glutatión y el ácido lipoico. También metaloproteínas de unión como la ferritina, lactoferrina, albúmina, y ceruloplasmina, además de numerosos otros fitonutrientes antioxidantes presentes en una amplia variedad de alimentos vegetales.

3.6.2 Enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes son capaces de estabilizar o desactivar los RL antes de que ataquen componentes celulares. Actúan mediante la reducción de la energía de los RL o cediendo algunos de sus electrones, estabilizando al radical. También pueden interrumpir con la reacción oxidante en cadena para reducir al mínimo los daños causados por los radicales libres (El-Missiry, 2012). Las enzimas antioxidantes son, por consiguiente, fundamentales para mantener una óptima salud celular y un buen estado sistémico (El-Missiry, 2012).

SOD, es la primera línea de defensa contra los radicales libres, cataliza la dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 por reducción. El oxidante formado se transforma en agua y oxígeno (O_2) por CAT o GPx (Gupta *et al.* 2014) (Figura 4).

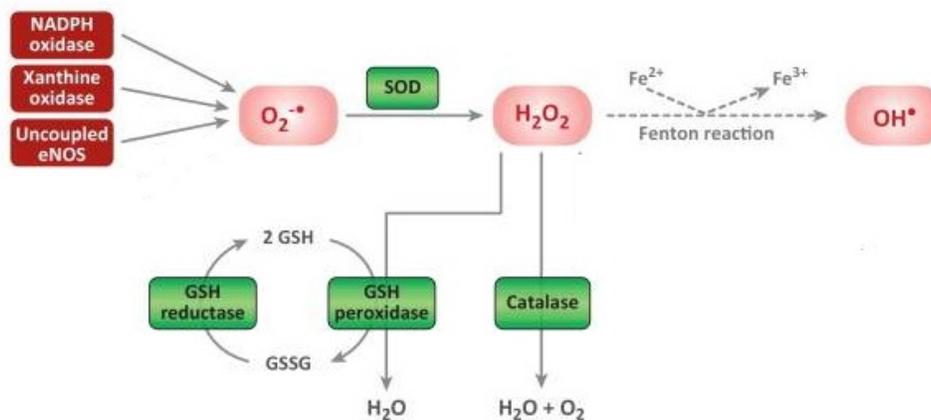


Figura 4. Esquema que muestra la actividad de las enzimas implicadas en la generación e inactivación de EROs (Tomado y modificado de Li *et al.*, 2013)

Se han identificado tres isoformas de SOD, y todas están presentes en todas las células eucariotas. SOD isoforma de cobre-zinc está presente en el citoplasma, núcleo, y plasma. Por

otro lado, la isoforma SOD manganeso se encuentra principalmente en la mitocondria (El-Missiry, 2012). La enzima selenoproteína GPx elimina el H_2O_2 al utilizarlo para oxidar el glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG). Glutatión reductasa, una enzima flavoproteína, regenera GSH de GSSG, con NADPH como una fuente de poder reductor. Además del H_2O_2 , GPx también reduce los hidroperóxidos lipídicos o no lípidos mientras que oxida el glutatión (GSH) (Gupta *et al.* 2014).

A pesar de poseer un sistema antioxidante estable, existen factores que aceleran la producción de RL, como la exposición a estrés térmico, y cuando se presenta una producción no regulada o prolongada de RL, que sobrepasa la defensa del sistema antioxidante, se genera el estrés oxidante.

Durante el estrés oxidante, los RL buscan participar en las reacciones químicas que les restauren su electrón, lo que resulta en la oxidación de los lípidos en las membranas, los aminoácidos en las proteínas y los hidratos de carbono dentro de los ácidos nucleicos (Tremellen 2008). Los productos finales de la peroxidación lipídica son aldehídos reactivos tales como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), su modo de acción podría estar relacionado con una adaptación individual de estrés celular (Jaganjac *et al.*, 2012). Como principal generador de EROs, las mitocondrias son a menudo los objetivos de alta exposición a estas, con consecuencias nocivas, como el daño oxidativo al ADN mitocondrial (Circu y Aw 2010). La oxidación de proteínas provoca la formación de grupos carbonilo, principalmente en cadenas laterales de aminoácidos Pro, Arg, Lys y Thr, lo que resulta en la pérdida o ganancia de función de las proteínas diana convirtiéndose así en un mecanismo patógeno (Jaganjac *et al.* 2012). Esto da como resultado una pérdida subsiguiente en la membrana y la integridad morfológica, deterioro de las funciones celulares y la inducción de la apoptosis (Bansal y Bilaspuri 2011).

4. ANTECEDENTES

4.1 Estrés oxidante y Criptorquidia

En un sistema biológico, el estrés oxidante hace referencia a una alteración fisiológica entre la generación de EROs, como H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, y la habilidad de cada organismo (sistema antioxidante) para removerlas (Gupta *et al.*, 2014). Una variedad de EROs son producidas como resultado del metabolismo celular aeróbico pero también, se ven incrementadas por estrés, exposición a luz UV y rayos X. Sin embargo los procesos celulares normales requieren un entorno redox balanceado (Celino *et al.* 2012).

El estrés oxidante, se considera una causa importante de envejecimiento y enfermedades, ya que afecta numerosos procesos celulares (Paul *et al.* 2009; Guo *et al.* 2010; Valavanidis *et al.* 2013). Este puede ser detonado por el aumento del metabolismo celular en un esfuerzo por mantener un ambiente homeostático (Tower 2012) (Figura 6).

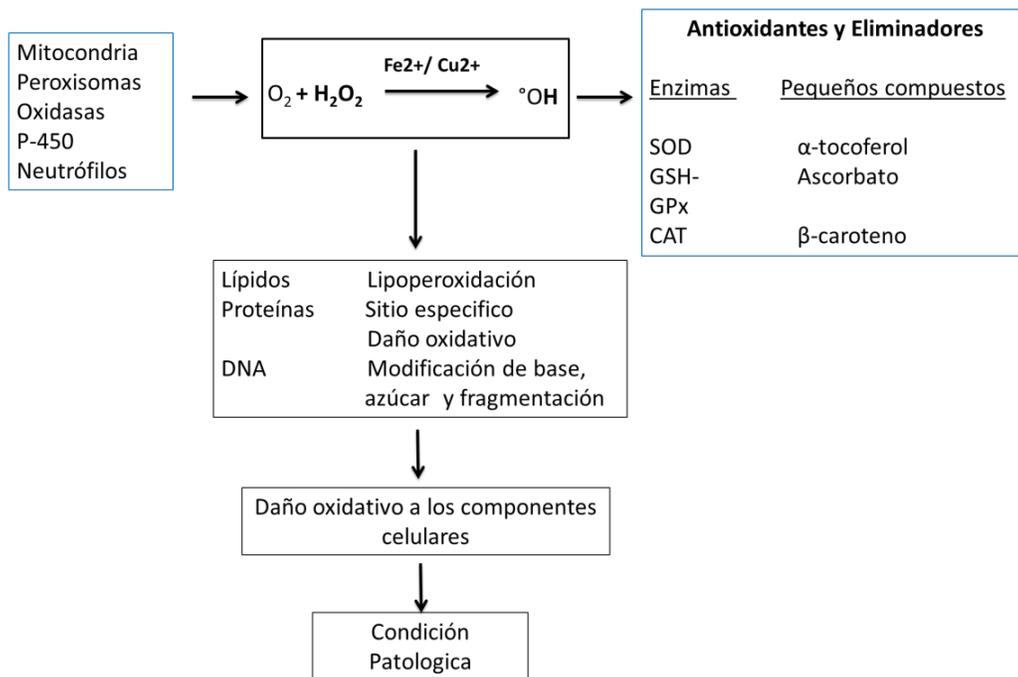


Figura 5. Diagrama que muestra una visión de la producción de EROs y el mecanismo del daño tisular oxidante que conduce a estados patológicos. Tomado y modificado de Klaunig *et al.*, 2010

El estrés oxidante induce enfermedades a través de modificaciones oxidativas a biomoléculas y alteraciones en vías de señalización que tienden a la desregulación del ciclo celular, interfiriendo con el metabolismo celular, inestabilidad genética y cambios epigenéticos (Klaunig *et al.* 2010). Las múltiples reacciones bioquímicas presentes en el testículo criptorquídic resultan en la formación de reactivos intermediarios tóxicos que pueden causar daños en el DNA (Gupta *et al.*, 2014) (Figura 5).

Las monooxigenasas reticulares endoplásmicas (por ejemplo, el citocromo P450) contribuyen al aumento de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ que promueve la peroxidación lipídica, la alteración de la homeostasis del calcio, la disfunción mitocondrial y la apoptosis celular, mientras que las EROs derivadas de la NADPH oxidasa (Nox) intervienen en la función de señalización celular de la membrana plasmática (Circu y Aw 2010).

Los diferentes tipos de células pueden tener diferentes grados de tolerancia al estrés oxidante, las células *stem* son más susceptibles a este (Tower 2012), porque daña todas las macromoléculas celulares, incluyendo el ADN. Aunque las células madre se protegen de manera autónoma del estrés oxidante, a través de las vías de respuesta, incluyendo FOXO y el factor inducible por hipoxia (HIF), son sensibles a los daños deletéreos provocados por las EROs (Tower 2012).

Los aumentos en la temperatura testicular implícitos en la CO se han asociado con el aumento de estrés oxidante testicular. En un estudio en ratones adultos, a los que se les indujo CO, se observó que hubo un aumento de EROs, que se correlaciono con un aumento de apoptosis en células germinales y alteración en la expresión de genes asociados con el metabolismo energético (*Hkl*), el metabolismo de los lípidos (el transportador de lípidos *Abca1*, *ApoE* y *Hdlbp*), la respuesta al estrés (*HIF1- α*), y reacciones redox (tioredoxina 1(*Txn1*) y glutatión peroxidasa 3 (*Gpx3*)) (Docampo y Hadziselimovic, 2015; Ikeda *et al.*, 1999; Turner y Lysiak, 2008; Li *et al.*, 2006). En otros estudios, el aumento de EROs durante la criptorquidia también se ha correlacionado con una disminución de la testosterona y un aumento de Óxido nítrico (NO) por sobreexpresión de Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Noori, 2012; Paul *et al.*,

2009). La sintasa produce NO catalizando la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidina del aminoácido L-arginina (L-Arg).

La CO es la causa más común de azoospermia no obstructiva (Docampo y Hadziselimovic 2015). La azoospermia es evidente en el 13% de los pacientes con CO unilateral y aumenta hasta el 89% en los pacientes con CO bilateral no tratada (Cobellis *et al.* 2014; Docampo y Hadziselimovic 2015). Dentro del mecanismo por los que se puede producir la pérdida de células germinales, se encuentra el incremento de muerte celular programada (apoptosis). Además se ha reportado que los individuos con CO presentan alteraciones histológicas como descamación celular, plegamiento de la lámina basal, vacuolización de células germinales y de Sertoli, picnosis e hipoplasia de células germinales (Vigueras *et al.* 2009, 2011).

Muchos estudios han demostrado la relevancia de la apoptosis en la regulación de la producción de espermatozoides y la eliminación de las células germinales dañadas (Lagos y Moreno 2012). Las EROs regulan el mecanismo de apoptosis, sin embargo, cuando hay estrés oxidante, este mecanismo se exagera. La apoptosis presenta varias características, tales como: fragmentación internucleosomal del ADN, activación de las caspasas y externalización de la fosfatidilserina (Lagos y Moreno 2012).

Además, se ha demostrado que la apoptosis de las células germinales está de alguna manera controlada por los niveles hormonales incluyendo testosterona, estrógenos y FSH (Lagos y Moreno 2012).

Estos mecanismos, contribuyen al deterioro de la población de células espermatozoides, que conducen a infertilidad.

4.1.1 Infertilidad masculina

Una deteriorada mini-pubertad puede ser la responsable de la azoospermia e infertilidad en adultos con antecedentes de criptorquidia (Docampo y Hadziselimovic, 2015). La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja sana para concebir después de 12 meses de

relaciones regulares, sin protección (<https://extranet.who.int/rhl>). La infertilidad afecta aproximadamente al 20% de las parejas y ha sido reconocida como una enfermedad de acuerdo con la Ley de Americanos con Discapacidades de 1998 (Carrel 2015). Donde los varones son responsables del 20 a 30% de los casos de infertilidad en general. Sin embargo, este número no representa con exactitud todas las regiones del mundo. De hecho, a nivel mundial, hay una falta de estadísticas precisas sobre las tasas de infertilidad masculina (Parekattil y Agarwal 2012; Kumar y Singh 2015).

Por otra parte, se ha reportado que el potencial de fertilidad masculina se establece en la infancia, durante los 30 a 90 días posparto (Docampo y Hadziselimovic, 2015). Debido a un serie de eventos que se presentan durante los primero meses posnatales, como la mini pubertad y la diferenciación del gonocito.

Recientemente se ha mostrado que el gonocito neonatal migra entre las células de Sertoli hacia la periferia del cordón entre los 3 y 9 meses de edad en humanos, a los 2 y 6 días de edad en ratones y de los 45-50 días en el conejo (Vigueras-Villaseñor *et al.* 2013; Docampo y Hadziselimovic 2015). Se ha establecido que con la separación placentaria, se activa el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y los cambios hormonales que se producen se identifican como mini pubertad. Esta activación alcanza un nivel máximo aproximadamente entre la 6^a y 8^a semana después del parto en humanos. En este período, los niveles de esteroides sexuales son similares a los niveles puberales tempranos-medianos, pero sus efectos periféricos no se realizan (Rey 2014; Kurtoglu y Bastug 2014). También se observa un aumento en la producción de HIM por las células de Sertoli, con picos entre los 6-12 meses, que permanece alta hasta la pubertad momento en que las concentraciones séricas caen (Hutson *et al.* 2013a) en humanos. Este aumento transitorio de gonadotropinas alcanza su pico cerca de los 3 a los 6 meses, hasta ser casi insignificante en humanos. (Hutson *et al.*, 2013a).

Se ha encontrado que la población de células de Sertoli aumenta para constituir el 85-95% de los tubos seminíferos. Un aumento que es determinante para las funciones espermatogénicas. El número total de células germinales aumenta aproximadamente hasta los 100 días pos parto

en humanos. Esta actividad mitótica aumentada permite que los gonocitos se transformen en espermatogonias adultas que se consideran células madre para la espermatogénesis entre los días 30 y 80 en niños con una mini pubertad estable. (Hadziselimovic *et al.* 2005; Rey 2014; Kurtoglu y Bastug 2014). Sin embargo, estudios anteriores han indicado que la producción testicular de testosterona se reduce agudamente en una serie de condiciones asociadas con la producción de EROs y el estrés oxidante en los testículos (Turner y Lysiak, 2008).

4.2. Tratamiento para la Criptorquidia

El régimen de tratamiento óptimo para la criptorquidia no está bien definido y no hay un seguimiento sistemático de los pacientes en la edad adulta. Por ello, los riesgos a largo plazo, como consecuencia de la criptorquidia, están siendo subestimados (Chung y Brock, 2011).

Hay muchas razones para apoyar la intervención quirúrgica temprana en los pacientes con CO, que actualmente se recomienda entre los seis y los 12 meses de edad. Debe realizarse a una edad temprana para prevenir problemas de infertilidad, riesgo de malignidad testicular, torsión testicular, asociación con hernia inguinal y problemas psicológicos (Braga y Lorenzo 2017). Sin embargo, se ha reportado que el tratamiento quirúrgico no reduce del todo el riesgo de cáncer testicular, pero permite explorar el testículo al ubicarlo en posición escrotal, para la detección temprana de una neoplasia (Herrera et al. 2009).

El tratamiento hormonal para la CO se basa en la dependencia hormonal del descenso testicular. Este tratamiento pretende estimular a la célula de Leydig para que produzca testosterona. Induciendo así el descenso inguino-escrotal (Cobellis et al. 2014). Tanto la Gonadotropina coriónica humana (hCG) como la Hormona Liberadora de gonadotropinas (GnRH) se han utilizado para este fin, desafortunadamente han mostrado una tasa baja de descenso, siendo del 25% con hCG y del 18% con GnRH (Comploj y Pycha 2012). Además que, es necesario el examen regular de niños tratados debido a que se ha reportado un re-ascenso en hasta el 25% de los pacientes (Comploj y Pycha 2012).

Por otro lado, existen informes que sugieren que la estimulación hormonal en la infancia puede ser perjudicial para los testículos (Cobellis et al. 2014). Debido a que se han observado

efectos adversos como: aumento de la rugosidad y pigmentación del escroto, ampliación del pene, erecciones frecuentes, aumento del apetito y aumento de peso; desarrollo del vello púbico, y rara vez, comportamiento agresivo (Compløj y Pycha 2012). Teniendo en cuenta la mala eficacia y los posibles efectos adversos de la terapia hormonal, la cirugía debe ser preferida (Cobellis et al. 2014)..

Sin embargo, ninguno de los tratamientos, ofrece una protección, mientras los testículos se encuentran intraabdominales o intrainguinales, expuestos al estrés oxidante. Ya que en varios casos el periodo de espera entre el diagnóstico y la corrección quirúrgica puede ser de 6 meses o más.

4.3 El Té verde (*camellia sinensis*) como antioxidante natural

Diversos estudios han demostrado que el té verde, tiene muchas propiedades que pueden aplicarse en la terapéutica de diversas enfermedades (Büttemeyer et al. 2003; Krege et al. 2008; Sharangi 2009; Al-Maghrebi et al. 2012; Du et al. 2012; Kim et al. 2014). La Asociación Médica Norteamericana ha demostrado que puede reducir los niveles de colesterol, la presión arterial alta y el riesgo de accidentes cerebrovasculares (especialmente en los hombres). También, el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, ha informado que los antioxidantes en el té verde, son altamente eficaces y pueden evitar varios tipos de cáncer (Sharangi 2009).

Los efectos medicinales del té tienen una historia que se remonta a casi 5000 años. Es el segundo líquido más comúnmente bebido en la tierra después del agua. Ha sido consumido habitualmente por la gente desde el año 3000 AC.(Sharangi 2009). Los puntos de exploración científica en curso indican que ciertos beneficios potenciales derivados del té tienen implicaciones importantes en la salud humana (Sharangi 2009). Muchas medicinas a base de hierbas poseen propiedades antioxidantes, los cuales juegan un papel importante en la terapéutica de diversas enfermedades (Du et al. 2012). El té verde se ha asociado durante mucho tiempo con varios beneficios fisiológicos y farmacológicos para la salud (Li et al., 2017) y con la prevención de enfermedades debido a sus propiedades antiproliferativas,

antimutagénicas, antioxidantes, antibacterianas, antivirales y quimiopreventivas (Roychoudhury et al. 2017).

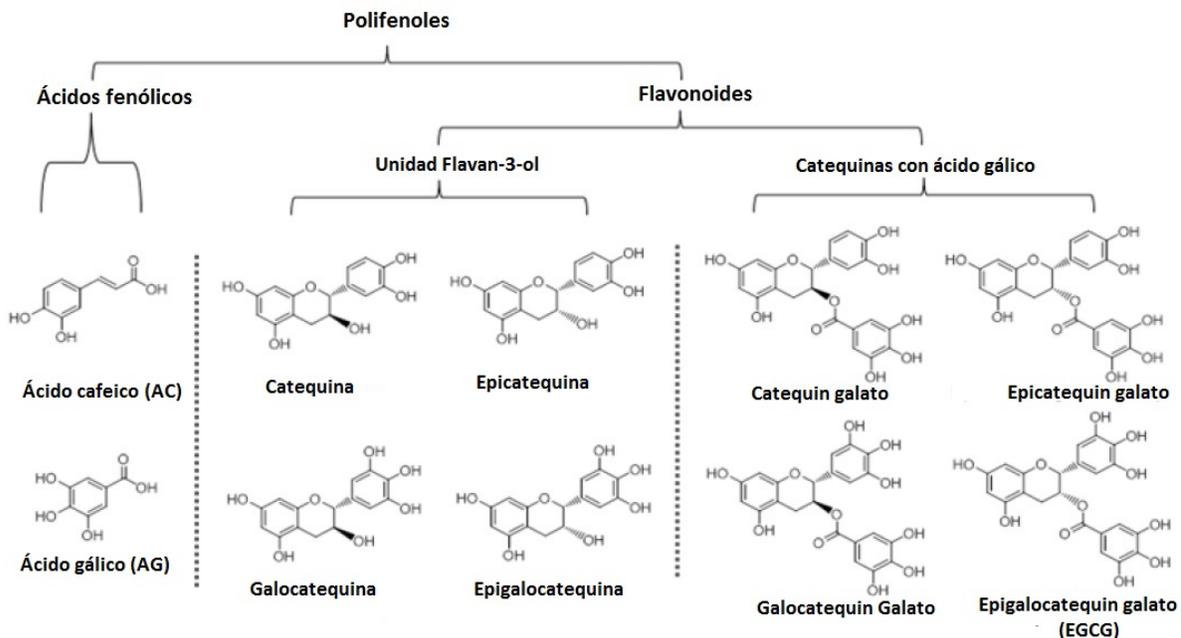


Figura 6. Estructura química de los principales componentes del Té verde: que divide en Ácidos fenólicos y Flavonoides (catequinas) siendo este último el grupo más grande, donde se encuentra la EGCG. Tomado de Du *et al.*, 2012.

Contiene antioxidantes de gran alcance y es una de las bebidas más populares que se consumen en todo el mundo. De todos los compuestos antioxidantes encontrados en el té verde, los constituyentes principales son los polifenoles, incluyendo los ácidos fenólicos y los flavonoides (catequinas) (Du et al. 2012) (Figura 6). Se ha observado que los polifenoles pueden tener efectos terapéuticos sobre una variedad de condiciones patológicas crónicas, incluyendo cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Kim et al. 2014). Debido a su actividad antioxidante, antiviral y anti-inflamatoria (Krege et al. 2008). Muchos polifenoles se derivan de productos alimenticios naturales (Kim et al. 2014).

4.3.1 (-)-Epigallocatequina-3-gallato (EGCG)

La epigallocatequina-3-galato, es el componente más abundante en el té verde (*Camellia sinensis*) Constituye el 50% de las catequinas (Al-Maghrebi *et al.* 2012) se le atribuye ser el principal componente con un poderoso efecto captador de RL y activador del sistema antioxidante endógeno (Yang *et al.* 2001; Büttemeyer *et al.* 2003; Al-Maghrebi *et al.* 2012).

Se ha estudiado el efecto de la EGCG sobre factores relacionados con el envejecimiento, como la acumulación de EROs, la integridad de las mitocondrias y la eficacia de las enzimas antioxidantes *in vitro* (Meng *et al.* 2008), en el concluyen que la EGCG puede ser considerada para su uso como un reactivo anti envejecimiento en el futuro.

El EGCG actúa como un antioxidante o como un pro oxidante dependiendo de la dosificación y el estado redox celular (Dong *et al.* 2016). Se ha encontrado que las catequinas del té son mejores antioxidantes que las vitaminas C y E, el tocoferol y el caroteno (Sharangi 2009).

Aunque el efecto de las catequinas en el mecanismo reproductivo es todavía desconocido, varios estudios pioneros han demostrado una posible participación de la EGCG en la modulación de función testicular. Por ejemplo, suplementos de EGCG exógena inhibe la apoptosis y la inflamación, protegiendo así túbulos seminíferos testiculares de los daños de isquemia/reperfusión inducida (Ding *et al.* 2015). Los estudios en modelos animales de estrés oxidativo ofrecen una oportunidad única para evaluar la contribución de las propiedades antioxidantes de EGCG así como los efectos fisiológicos de su administración.

4.4 Modelo Animal- Conejo Chinchilla (*Oryctolagus Cuniculus*)

En 2013, Viguera y colaboradores, reportaron que el conejo (*Oryctolagus Cuniculus*) raza chinchilla, es un excelente modelo animal, del cual se ha descrito el desarrollo del epitelio seminífero posnatal, así como el momento en que los gonocitos migran hacia la lámina basal y adquieren características morfológicas de espermatogonias. También se propuso como modelo de CO, ya que al administrar 17β -estradiol a gazapos, se desarrolla CO bilateral. La administración de 17β -estradiol, asemeja la exposición a disruptores endócrinos (DE) en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Los DE han sido reportados, como agentes

causantes del desarrollo de síndromes como el de disgenesia testicular en el que se observa criptorquidia, hipospadias y cáncer testicular.

Este modelo se asemeja a las condiciones humanas en donde se sugiere que, la exposición a compuestos con actividad estrogénica durante la vida intrauterina, interfiere en el descenso testicular normal.

5. Justificación

La criptorquidia se asocia con incrementó del riesgo a desarrollar cáncer testicular y problemas de infertilidad en la vida adulta, debido a las alteraciones producidas como consecuencia del estrés oxidante generado durante la misma. Por lo que el mantenimiento de la homeostasis, en el microambiente testicular durante los primeros meses posnatales, es de vital importancia para disminuir los riesgos. Sin embargo el tratamiento óptimo para la criptorquidia no está bien definido y los riesgos a largo plazo están siendo subestimados. Es por ello que la búsqueda de tratamientos preventivos que protejan y/o reduzcan dichas alteraciones, es de gran importancia. Además de que los conocimientos generados permitirán comprender mejor la fisiopatología de este padecimiento.

6. Objetivos

6. 1.General

Evaluar el efecto de la EGCG sobre las alteraciones producidas por el estrés oxidante, en un modelo con criptorquidia experimental.

6.2. Particulares

- Identificar las alteraciones histológicas en los diferentes grupos y evaluar el efecto de la EGCG sobre las mismas.
- Determinar el efecto de EGCG sobre la actividad enzimática de SOD y CAT y la lipoperoxidación, de los individuos con criptorquidia.
- Evaluar la pérdida de células germinales por apoptosis y la proliferación celular, al término del tratamiento.

- Evaluar el efecto de la EGCG sobre las concentraciones de testosterona e Inhibina

7. Hipótesis

Dado que la criptorquidia genera estrés oxidante, la administración de un antioxidante y estimulador del sistema antioxidante endógeno como la Epigallocatequina-3-galato, reducirá dichas alteraciones atrapando radicales libres y reactivando a las enzimas antioxidantes.

8. Material y métodos

Este proyecto se realizó en la torre de investigación “Dr. Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría (INP) en el Laboratorio de Biología de la Reproducción en colaboración con el Laboratorio de Neuroquímica. Los conejos se alojaron en el Bioterio de la misma Institución y se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable en ciclos de 12 horas luz, 12 horas oscuridad a una temperatura ambiente de entre 21 a 24 °C. Se les proporcionó agua y alimento en *pellets* (Purina® Rabbit Chow, México) a libre acceso.

El manejo de los animales se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Además siguiendo al pie de la letra los reglamentos internos y principios éticos del trato a los animales del Bioterio de la Torre de Investigación del INP (CICUAL).

8.1 Diseño experimental

Se utilizaron 20 conejos raza chinchilla distribuidos en 4 grupos de la siguiente manera:

- Grupo 1: Control sano, sin administración alguna (CS)
- Grupo 2: Control sano con la administración de Epigallocatequina-3- galato (CS/EGCG)
- Grupo 3: Con administración de 17 β estradiol para inducir la criptorquidia (CO)
- Grupo 4: con CO inducida por la administración de 17 β -estradiol + administración de Epigallocatequina 3 galato (CO/EGCG)

El grupo CS, no recibió ningún tratamiento. Al grupo CS/EGCG, un grupo sano, se le administró Epigallocatequina-3-galato a partir del día 65pp hasta el día 120 pp. Al grupo CO se le indujo criptorquidia, mediante la administración de 16.6µg de 17β-estradiol (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*) disueltos en 200µl de aceite vegetal cada tercer día, hasta cubrir la dosis total de 500µg. La dosis se distribuyó durante 53 días, a partir del día 7 al día 60 pp, vía subcutánea. Al grupo CO/EGCG se le indujo CO como se describió anteriormente y se le administro Epigallocatequina-3-galato, disuelta en solución fisiológica como vehículo, en una dosis de 5 mg/kg de peso, vía intraperitoneal, a partir del día 65pp. (Figura 7).

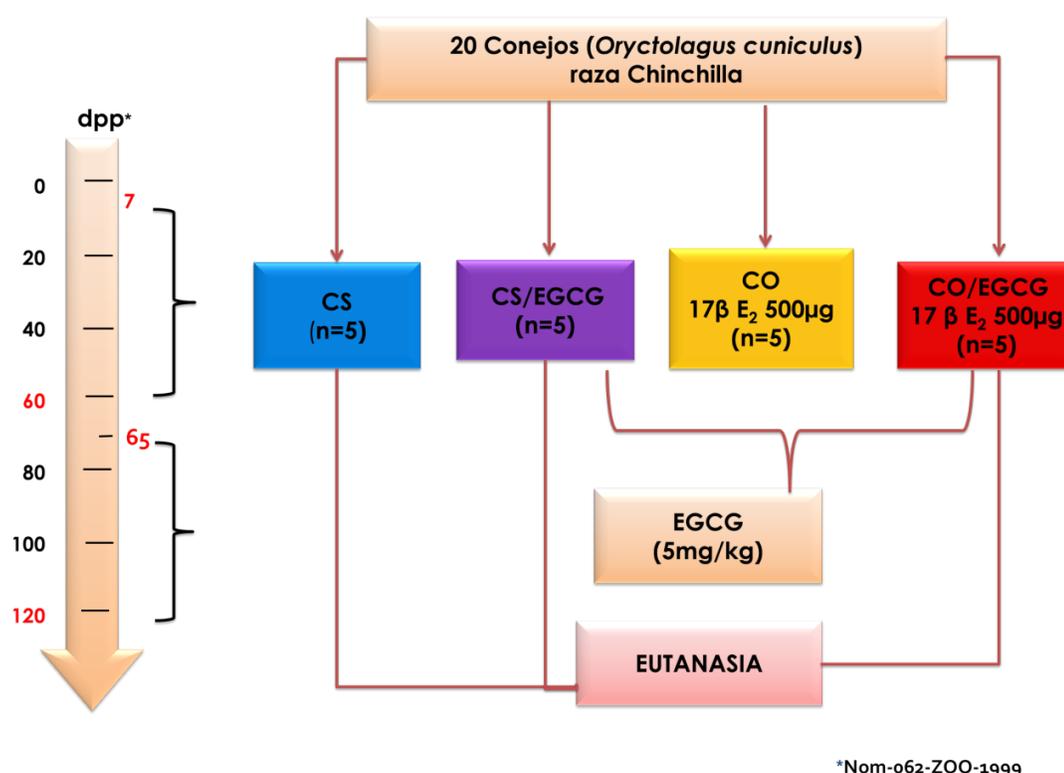


Figura 7. Diagrama que representa el diseño experimental

Al cumplir los 120 días, se obtuvo el peso corporal de cada individuo y todos los grupos fueron llevados a Eutanasia, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción y uso de animales de laboratorio". La eutanasia se llevó a cabo previa sedación con xilacina (10mg/kg) seguida de una sobredosis de pentobarbital (90mg/kg) diluido en solución fisiológica (1:1). Posteriormente se obtuvieron muestras de sangre, por punción intracardiaca, para la determinación sérica de Inhibina B y testosterona. Se obtuvieron

los testículos, se disecaron y pesaron, realizando la distribución de muestras para las diferentes técnicas (Figura 8).

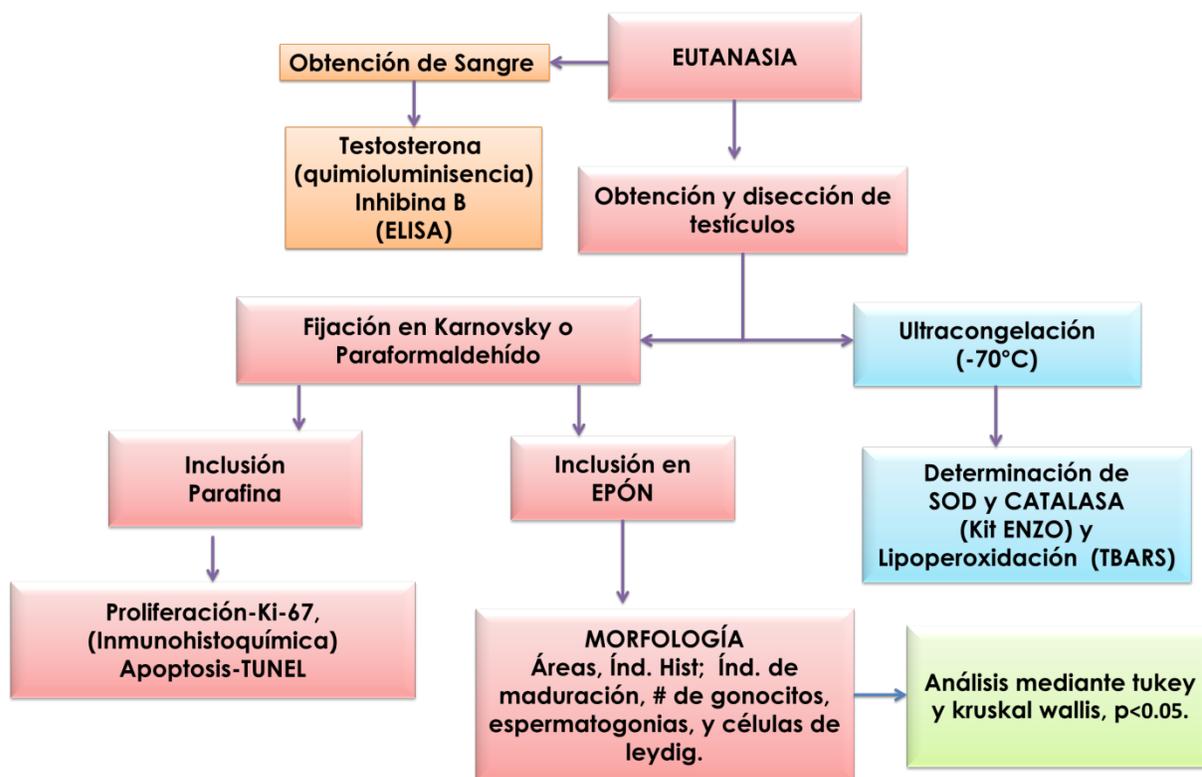


Figura 8. Diagrama que representa el método para el procesamiento del material biológico.

Con base en la relación peso corporal/peso testicular, se determinó el índice gonadosomático (IGS), lo cual se utiliza para medir la madurez sexual de los animales en correlación con el desarrollo de los testículos.

8.2 Procedimiento para la obtención de tejido testicular

Se disecaron los testículos, derecho o izquierdo, se obtuvieron dos muestras una para su fijación en Karnovsky y la otra para su fijación en paraformaldehído. Del testículo contralateral se destinó a ultracongelación (-70°C) y poder realizar la determinación de la actividad enzimática de SOD y CAT, además la determinación indirecta de lipoperoxidación por la técnica de TBARS.

8.3 Procesamiento del tejido testicular para su análisis morfológico

El tejido se fijó por 24 hrs. en solución Karnovsky modificado. Transcurridas las 24 hrs. se obtuvieron 6 cortes de 1mm^3 (por individuo) y se transfirieron a tubos *ependorf* de 2 ml. Se hicieron 4 lavados cada 30 minutos con buffer de cacodilados al 0.1M. Seguido a los lavados, se realizó una postfijación en tetróxido de osmio (Zelterquist) al 1% por una hora, manteniéndolo en refrigeración a 4°C . Al finalizar la hora, se hicieron 3 lavados con agua destilada, para posteriormente deshidratar la muestra en un tren de deshidratación, mediante alcoholes graduales desde 60, 70, 80, 90 y 100% y finalmente en óxido de propileno. La inclusión en resina epóxica EPON 812 (Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA) se efectuó gradualmente en una dilución óxido: EPON 1:2, 1:1, 2:1 y finalmente en EPON puro por 24 hrs. La inclusión se finalizó en estufa a 60°C , para la polimerización de la resina.

Posteriormente se obtuvieron cortes semifinos de $1\mu\text{m}$, en ultramicrotomo (Leica UCT, Vienna, Austria), los cortes se tiñeron con azul de toluidina (Sigma-Aldrich, México) al 5% y se montaron en portaobjetos.

8.3.1 Morfometría y cuantificación celular

Este análisis se realizó por una sola persona en un microscopio óptico BX 51 *Olympus light microscope* (Tokyo, Japan). Por cada individuo se analizaron 30 secciones transversales de cordones y/o tubos seminíferos. Donde se midió el área de dichas secciones mediante el programa Image-Pro Plus versión 5.1, (*Media Cybernetics, INC. MD, USA*). Se sabe que bajo condiciones normales, la lámina basal (LB) de los tubos seminíferos humanos forma una matriz continua y homogénea. Pero durante las condiciones patológicas, la lámina basal puede estar engrosada y tener una apariencia multicapa en la región peri tubular (Chakraborty et al., 1976) por lo que también se midió el grosor de lámina basal en cuatro puntos diferentes con separación aprox. de 45° , alrededor de cada sección. Finalmente se cuantificó la presencia de gonocitos/espermatogonias reportando el número de células correspondiente por cada $10,000\mu\text{m}^2$ de tejido. Los gonocitos fueron identificados por su gran tamaño, forma redonda, citoplasma pálido, por su gran núcleo central y la disposición mitocondrial alrededor del núcleo. Las espermatogonias se caracterizaron por su tamaño pequeño, forma redonda y

aplanada, núcleo central teñido con cromatina fina y gruesa extendida o localizada periféricamente alrededor del núcleo (Vigueras *et al.*, 2016).

La cuantificación de células de Leydig, se realizó mediante el conteo de células adultas con núcleos uniformes bien definidos y con presencia de un nucléolo. Se cuantificaron las células de Leydig presentes por cada 100 espacios intersticiales para cada grupo de acuerdo a lo reportado por Köse *et al.*, (2012).

8.3.2 Índice de Maduración e índice Histopatológico

Para determinar el índice de maduración del epitelio seminífero, se utilizó el índice de Johnsen (1970) con el que se establece el grado de desarrollo y diferenciación de los tipos celulares que forman el epitelio seminífero (Anexo I). El índice Histopatológico se evaluó de acuerdo al daño observado. Utilizando una escala que va de 1 a 6 asignando el valor de acuerdo a la alteración observada (Vigueras *et al.* 2009) (Anexo II).

8.4 Procesamiento del tejido testicular para determinación de apoptosis (TUNEL) y proliferación celular por inmunohistoquímica (Ki-67).

El tejido se fijó en paraformaldehído (Sigma-Aldrich, México) al 4%, durante 24 hrs., después se hicieron 4 lavados cada 30 minutos con PBS 0.1M (asegurándose de retirar todo el fijador) posteriormente se procesaron en un histoquinete Leica para la deshidratación de muestras mediante un tren de alcoholes y su posterior inclusión en parafina (Leica). Se obtuvieron cortes de 4 µm de grosor que se montaron en portaobjetos cubiertos de grenetina.

Una vez montadas se desparafinaron en estufa a 60°C por 30 minutos, seguido de un carril de xilol y alcohol a concentraciones graduales, para la realización de la técnica de TUNEL y Proliferación celular.

8.4.1 Técnica de TUNEL

La muerte celular por apoptosis se determinó mediante la técnica de TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit*). Para lograr la identificación de las células germinales, las laminillas se

lavarón con la solución balanceada de Hanks (GIBCO, NY, USA) y se incubaron con DAPI (SIGMA, México) en una concentración de 1 µg/ml.

Luego se incubaron con proteinasa K (20 mg/ml) (*Stratagene, CA, USA*) durante 30 minutos y posteriormente se colocaron en H₂O₂ al 0.3% en metanol durante 30 min. Se lavaron con una solución de fosfatos 0.1 M (PBS) e incubaron en una solución permeabilizadora de Triton X-100 al 0.1% (*SIGMA-Aldrich, St. Louis Mo, USA*) durante 2 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS e incubaron en la solución de TUNEL (*Roche Diagnostic Corporation, USA*) durante 60 minutos a 37°C. Se lavaron con PBS y se montaron con medio de fluorescencia (*DAKO, USA, Fluorescent Mounting Medium*) para observación usando un microscopio *BX 51 Olympus light microscope (Tokyo, Japan)*. El índice de apoptosis (IA) se determinó en cortes transversales considerando el número de células positivas por cada 10,000 µm². Se contaron al menos 30 tubos seminíferos por animal (Vigueras *et al.*, 2009).

8.4.2 Proliferación celular (Inmunoreactividad a Ki-67)

La expresión de la proteína Ki-67 se asocia estrictamente con la proliferación celular, está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G (1), S, G (2) y mitosis), y ausente en las células en reposo (G₀). Una vez que los cortes se desparafinaron se realizó el desenmascaramiento de los epítopes, colocando las laminillas con citrato de sodio (0.01M), en baño maría. El citrato se retiró con un lavado de agua destilada. Las laminillas se secaron y se delimitaron los cortes con lápiz hidrofóbico.

Las laminillas se colocaron en cámara húmeda, una vez ahí se realizaron lavados con PBS, una incubación con proteinasa K y nuevamente lavados con PBS. Se realizó un bloqueo con suero de burro al 5% + BSA al 5% por dos horas. Posteriormente se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón contra Ki-67 (DAKO) a una dilución 1: 250, por 24 hrs, para determinar la proliferación celular. Después las láminas se incubaron entonces con anticuerpo biotinilado anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:100 durante 2 horas. El revelado se realizó con diaminobencidina (DAB DAKO, Santa Cruz Biotechnology). Las diluciones y lavados a fondo entre las etapas se realizaron utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Vigueras *et al.*, 2016).

8.5 Determinación de Hormonas

8.5.1 Concentración de Inhibina B sérica

La determinación de Inhibina se realizó mediante el kit Rabbit Inhibin B (MyBiosource, San Diego, California USA). A partir del suero hemático se analizó la concentración de inhibina B (INB). En una placa de 48 pozos, se asignaron, pozos curva, pozos muestra y pozos blanco. Se adicionaron 50µl del estándar o muestra respectivamente. Se incubó la placa por 60 minutos a 37°C. Seguido a esto se adicionó el cromógeno, incubando nuevamente por 15 minutos a 37°C. La placa se transfirió a un lector de placas Modulus™ II Microplate Reader (*Turner BioSystems, Inc. USA*) donde se leyó la absorbancia a 450nm. La concentración de INB en las muestras se determinó extrapolando la OD, de la curva estándar con las muestras (Cai *et al.*, 2011). s. La concentración se expresó en pg/ml.

8.5.2 Determinación de testosterona

Esta hormona fue determinada por Quimioluminiscencia, en un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA) para la determinación cuantitativa de testosterona en suero con un proceso en el que una molécula de alta energía es excitada químicamente y se descompone liberando su energía en forma de luz. La energía requerida para la emisión de luz es generada por la oxidación de un substrato específico. Los sueros se depositaron en tubos de ensayo de 3 ml, se homogenizaron y se introdujeron en el equipo ARCHITECT i1000SR, analizador de Inmunoensayo completamente automatizado, donde se cargaron todos los reactivos para la determinación hormonal.

Inicialmente se combinan muestras, diluyentes específicos de ensayo y micropartículas paramagnéticas recubiertas de anti-testosterona (oveja, monoclonal). 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 relativa (RLU). Existe una relación inversa entre la cantidad de testosterona en

la muestra y las RLU detectadas por la óptica del sistema ARCHITECT i. La concentración final se expresó ng/ml.

8.6 Determinación de la actividad de SOD y CATALASA

Para la determinación de la actividad enzimática de SOD y Catalasa, fue necesario determinar la concentración de proteína. Esto se realizó mediante el método de Lowry, empleando el kit Protein, Micro Lowry, Modification (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La actividad de SOD se midió usando un kit de actividad 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 SOD se determinó a partir del porcentaje de inhibición de la velocidad de formación de WST-1-formazan, un producto coloreado que absorbe luz a 450 nm. Cada muestra se cargó en una microplaca 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 leyó 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-1-formazán con el logaritmo de las unidades SOD en una curva de calibración estándar. La actividad SOD se expresa como U/mg de proteína (Pan *et al.*, 2015).

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 H₂O₂ en cada pozo. La actividad de CAT se evaluó mediante la reacción de degradación de H₂O₂ catalizada por CAT, a temperatura ambiente y se calculó en términos de µmol de H₂O₂ consumidas por minuto (U) por mg de proteína. Se utilizó un reactivo de detección no fluorescente para medir el sustrato (H₂O₂) sobrante de la reacción. Se midió la Fluorescencia a 590 y 600 nm (El Golli *et al.*, 2016; Sun *et al* 2016).

8.7 Determinación indirecta de lipoperoxidación por la técnica de TBARS.

Primero se determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry.

La peroxidación lipídica se evaluó midiendo la concentración de MDA. Se añadió ácido tricloroacético (TCA, 20%) al homogeneizado y después se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se añadió solución de ácido tiobarbitúrico al 0,5% (TBA). Después se calentó en baño María por 10 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 532 nm. La concentración de MDA se calculó usando la curva estándar. Los resultados se expresaron como nanomoles (nmol) por miligramo (mg) de proteína (Banderas *et al.*, 2015).

8.8 Análisis Estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm EE. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba no paramétrica Kruscall-Wallis, para el área de tubos/cordones seminíferos, índice de maduración, índice histopatológico, grosor de lámina basal, cuantificación celular (gonocitos, espermatogonias y células de Leydig) índice de maduración apoptosis y proliferación celular, y la prueba de ANOVA seguida de una comparación múltiple de Tukey (para IGS, concentración de testosteron, Inhibina B, así como la actividad enzimática de SOD y CAT). Los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico GraphPad Instat 3. Considerando una $p < 0.05$, como significativa.

9. RESULTADOS

9.1 Descripción Anatómica

Al momento de la eutanasia, se verificó el descenso o no descenso de los testículos en los cuatro grupos. En el grupo CS, los testículos se encontraron perfectamente escrotados al igual que en el grupo CS/EGCG, el descenso en estos grupos ocurrió a los 50 dpp. Por el contrario en los grupos CO y CO/EGCG, los testículos no descendieron y al momento de ser disecados se encontraron en la cavidad inguinal (Figura 9).

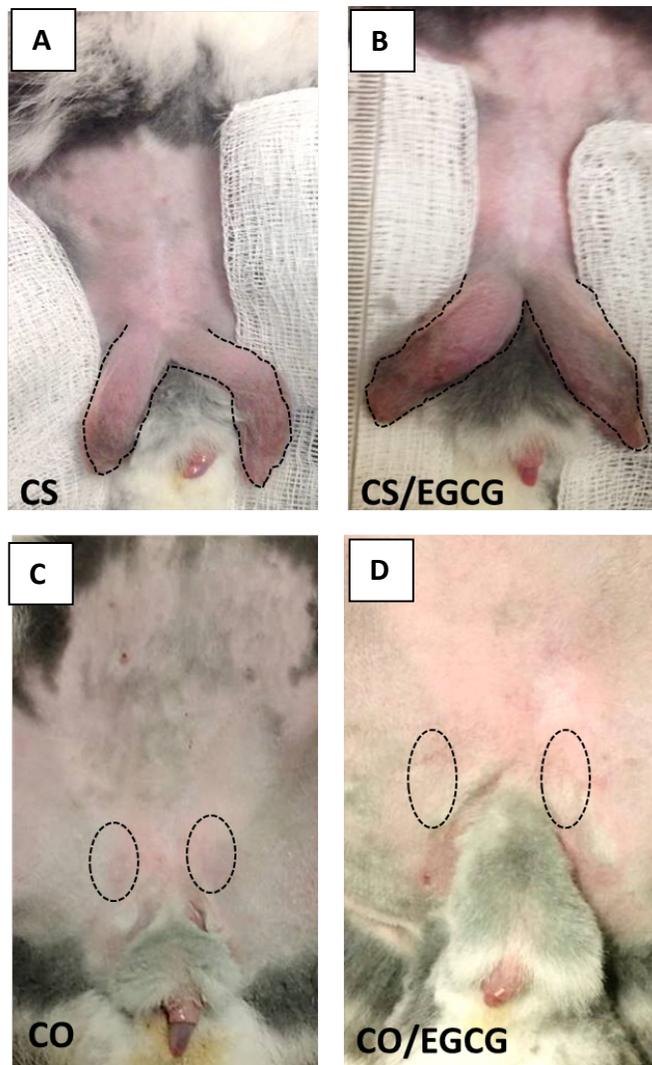


Figura 9. La imagen muestra la anatomía de la zona genital en los diferentes grupos al momento de la eutanasia. **A y B** En el grupo CS y CS/EGCG se observan los testículos en la bolsa escrotal. Mientras que en el grupo **C y D**. CO y CO/EGCG no hubo descenso testicular, quedando los testículos en cavidad inguinal.

9.2 Parámetros morfométricos

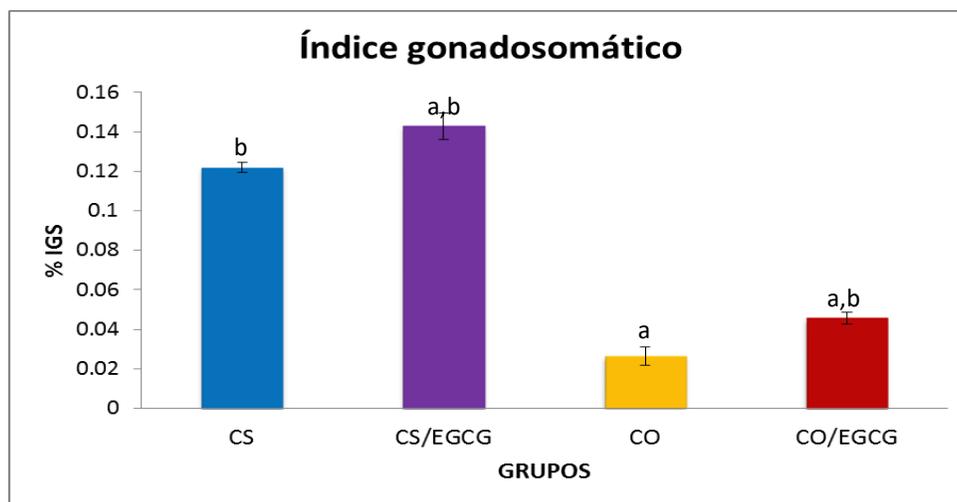
El peso corporal entre los 4 grupos no presentó diferencias significativas. En cuanto al peso testicular, en el grupo CS fue de 3.2 ± 1.1 g, mientras que en el grupo CO fue significativamente inferior ($p < 0.05$) en un 77%, incrementándose significativamente ($p < 0.05$) en el grupo CO/EGCG y CS/EGCG (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la EGCG sobre el peso corporal y el peso testicular de los diferentes grupos

Parámetros	CS	CS/EGCG	CO	CO/EGCG
Peso corporal (g)	2680 \pm 40.825	2833 \pm 8.499	2690 \pm 84.143	2870 \pm 63.087
Peso testículo derecho(g)	1.719 \pm 0.154 ^b	1.929 \pm 0.0622 ^b	0.383 \pm 0.0756 ^a	0.662 \pm 0.0607 ^a
Peso testículo izquierdo(g)	1.549 \pm 0.0361 ^b	2.122 \pm 0.1330 ^{a,b}	0.335 \pm 0.0555 ^a	0.652 \pm 0.0447 ^{a,b}

Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante ANOVA seguido de Tukey. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $p < 0.05$ (CO vs todos los grupos)

El IGS en el grupo CO, fue significativamente menor, con respecto a los demás grupos. Mientras que el grupo CO/EGCG se observó un incremento significativo $p < 0.05$ pero sin alcanzar a los controles (Gráfica 1).

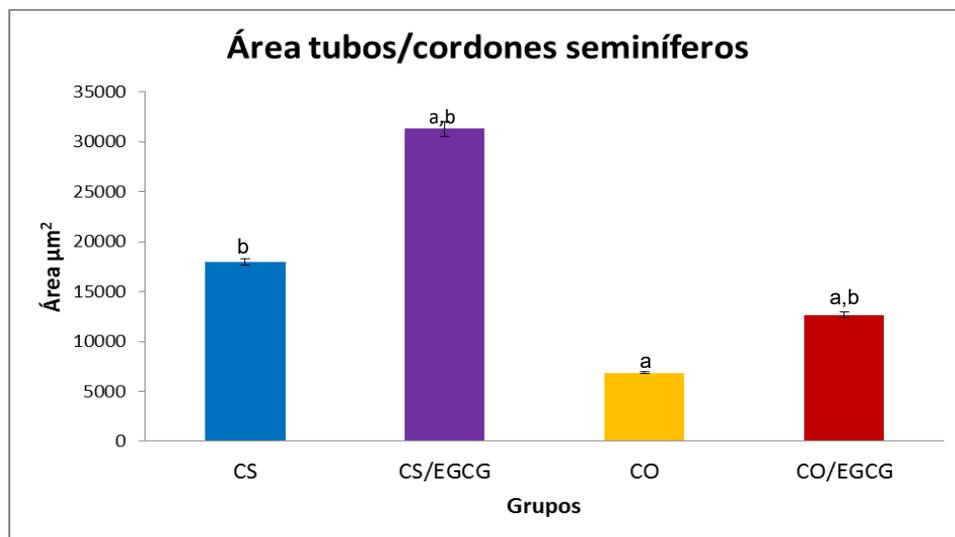


Gráfica 1. Índice Gonadosomático a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos). Donde se aprecia que en el grupo CO este parámetro es menor significativamente ($p < 0.05$) respecto a los demás grupo, pero se incrementó significativamente ($p < 0.05$) con el tratamiento de EGCG. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante ANOVA seguido de Tukey

9.2.1. Área de cordones/tubos seminíferos

El área de tubos/cordones seminíferos, mostró diferencias significativas entre todos los grupos. En el grupo CS se observaron tubos bien desarrollados con una espermatogénesis activa, pero no completa, ya que no hubo presencia de espermatozoides, por lo que el área fue significativamente ($p < 0.05$) menor que el grupo CS/EGCG, donde se observaron espermatozoides en la luz tubular.

El área en los grupos CO y CO/EGCG fue significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con los grupos sanos. En el grupo CO, se observaron cordones seminíferos con ausencia de espermatogénesis. Situación que mejoró significativamente ($p < 0.05$) en el grupo tratado con Epigallocatequina (CO/EGCG), pero sin alcanzar al grupo CS (Gráfica 2).



Grafica 2. Área de cordones/tubos seminíferos. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos) El área se expresó en μm^2 , donde observamos que el en grupo CO este parámetro fue significativamente menor que el resto de los grupos y se incrementó significativamente al ser tratado con EGCG. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

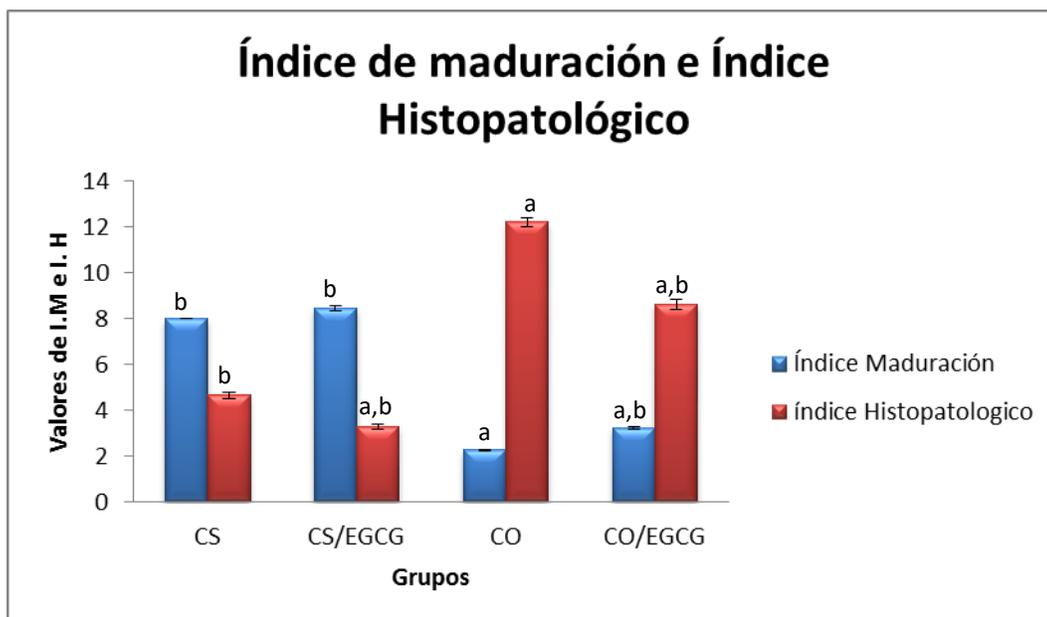
9.3 Análisis histológico

9.3.1 Índice histopatológico e Índice de maduración

En la evaluación de las alteraciones histológicas pudimos observar que el índice de maduración e índice histopatológico, mostraron un comportamiento inverso. Es decir que

cuando las alteraciones histológicas aumentaron, el índice de maduración disminuyó (Grafica 3). Estos resultados complementan los datos del IGS y el área tubular.

El grupo CO mostró un índice de maduración significativamente menor ($p < 0.05$) que los demás grupos y por lo tanto un índice histopatológico significativamente mayor ($p < 0.05$). En este grupo se apreciaron alteraciones histológicas, como plegamiento de lámina basal, vacuolización y la presencia de gonocitos.



Grafica 3. Índice de Maduración e histopatológico a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos) Al evaluar este parámetro, observamos que muestra comportamiento inverso, donde al incrementarse el índice de maduración disminuye el índice histopatológico. Y se puede apreciar que en el grupo CO, el índice histopatológico es significativamente mayor ($p < 0,05$) con respecto al resto de los grupos y por lo tanto el índice de maduración es significativamente menor ($p < 0.05$). Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Lo anterior confirma que la espermatogénesis se encontraba inactiva, debido a que, al haber gonocitos indiferenciados, la espermatogénesis no pudo iniciar (Figura 11) debido a que no se han diferenciado a espermatogonias.

En el grupo CO/EGCG, tanto el índice de maduración como el histopatológico muestran un comportamiento inverso al observado en el grupo CO sin tratamiento. Ya que se pudo observar la presencia de espermatoцитos y por lo tanto un índice de maduración

significativamente mayor ($p < 0.05$). A su vez hubo una reducción significativa de las alteraciones histológicas (Figura 8).

Hay que resaltar que el grupo CS mostró alteraciones histológicas propias de la especie, como descamación celular y picnosis. También es claro al observar los cortes histológicos, que en estos individuos la espermatogénesis aún no está completa, ya que la mayoría de los tubos solo presenta espermátidas elongadas (Figura 11). Sin embargo, al ser tratados con EGCG (CS/EGCG) dichas alteraciones disminuyeron significativamente, y además se observó una espermatogénesis completa, encontrando espermatozoides en la luz del tubo seminífero (Figura 10).

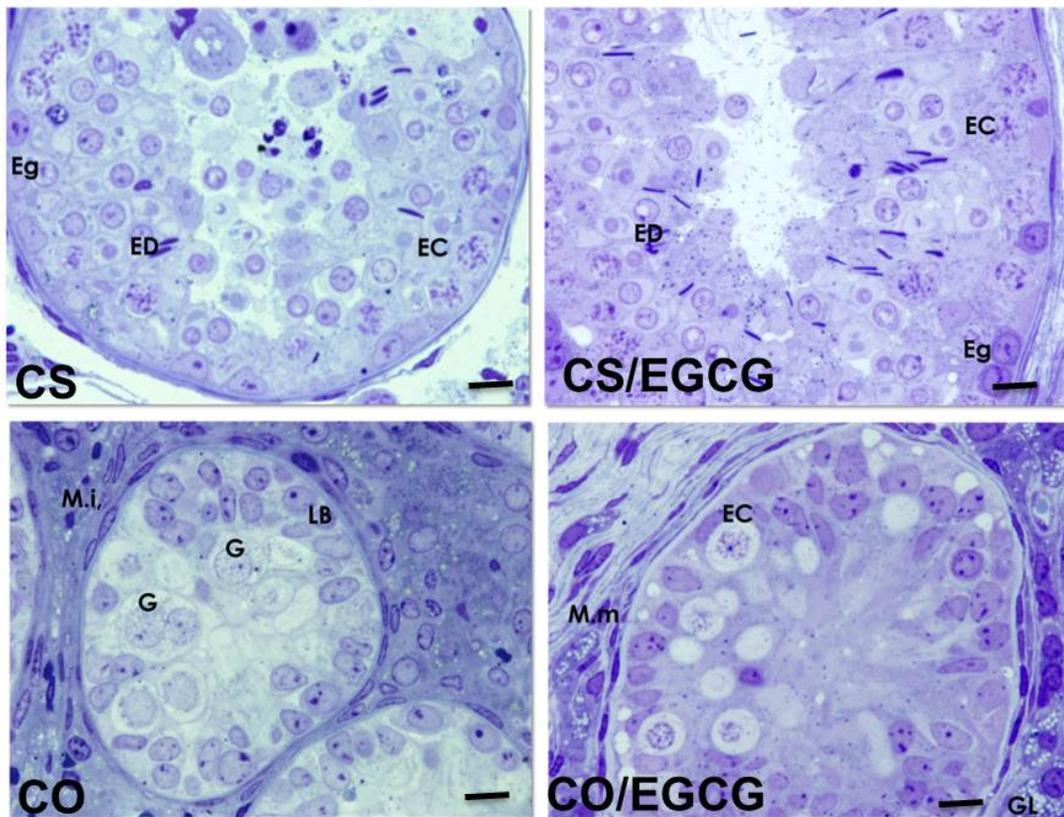
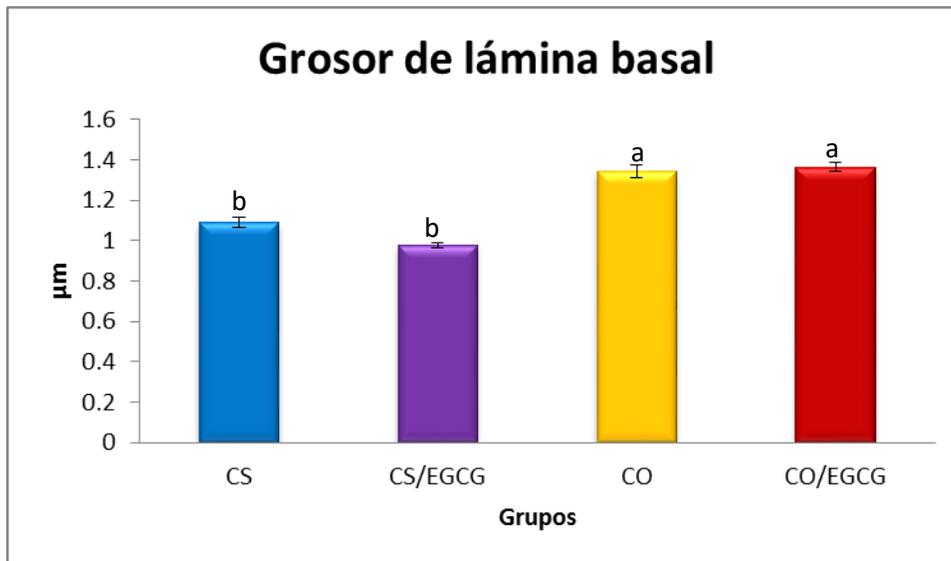


Figura 11. Micrografías que muestran las características de los tubos seminíferos en los cuatro grupos. A (CS) Se observa una morfología normal propia de la especie, Luz tubular con presencia de Espermatogonias (Eg), Espermatocitos (EC), Espermátidas (ED) sin presencia de espermatozoides (Epz). B. (CS/EGCG) Morfología normal con espermatogénesis completa. C. (CO) Se observan cordones espermáticos, presencia de Gonocitos (G), núcleos de Sertoli desplazados (S), células mioides inmaduras (M.i), Lamina basal engrosada (LB). (CO/EGCG) se observa luz tubular, espermatocitos (EC), núcleos de Sertoli hacia la periferia (S) y células mioides con mayor grado de madurez (M.m), también podemos observar mayor cantidad de gotas lipídicas en las células de Leydig (GL). (Tinción con Azul de toluidina.). Escala de barras, 20 μ m 60X.

9.3.2 Grosor de lámina basal

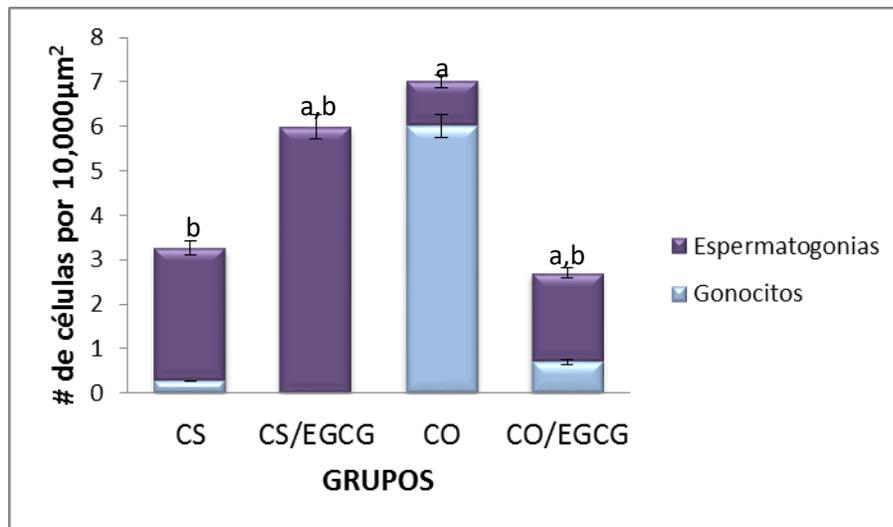
En el grupo CO, el grosor de LB fue significativamente mayor ($p < 0.05$), respecto al grupo CS y el grupo CS/EGCG. Mientras que en el grupo CO/EGCG, no mostró diferencia significativa respecto al grupo CO (Gráfica 4), pero sí con respecto al grupo CS.



Gráfica 4. Grosor de Lámina Basal. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos). Gráfica donde se aprecia que el grosor de lámina basal no mostró diferencias significativas entre el grupo CO y el grupo CO/EGCG. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

9.3.3 Cuantificación gonocitos/espermatogonias

Como se observó en las micrografías, algunos gonocitos, permanecieron indiferenciados en el grupo CO. Al realizar la cuantificación, la presencia de estas células, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto a los grupos sanos, y la cantidad de espermatogonias, fue significativamente menor ($p < 0.05$). Sin embargo, este dato, se invirtió en el grupo CO/EGCG, donde la población de espermatogonias aumentó significativamente ($p < 0.05$) y por lo tanto los gonocitos disminuyeron, mientras que en el grupo CS/EGCG no se encontraron gonocitos (Gráfica 5) (Figura 11).



Gráfica 5. Cuantificación de gonocitos vs espermatogonias por cada 10 000µm² de tejido a, p<0.05 (CS vs todos los grupos) b, P<0.0.05 (CO vs todos los grupos). En esta gráfica observamos que al encontrar menor cantidad de gonocitos, la población de espermatogonias se incremento significativamente en el grupo CO/EGCG. Los datos se expresaron como la media ± EE, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

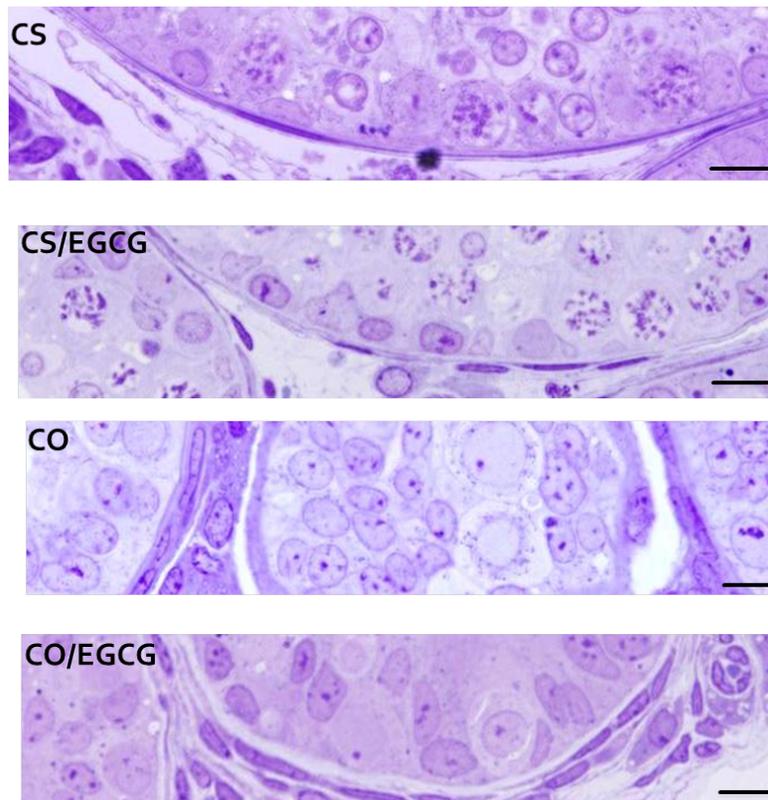


Figura 11. Micrografías en donde se aprecian características histológicas de la población germinal presente cada grupo. En el grupo CS observamos una población germinal que corresponde a una espermatogénesis activa Contrario a lo que se observa en los otros grupos.

en el grupo CO, donde encontramos la presencia de gonocitos, pero su población disminuye significativamente ($p < 0.05$) en el tratado con EGCG. Tinción con Azul de toluidina. Escala de barras, $15 \mu\text{m}$ 100X).

En el grupo CO, la cantidad de células de Leydig es menor significativamente ($p < 0.05$) respecto a los demás grupos y las características morfológicas indican que son células de Leydig adultas pero de recién formación (LARF). Mientras que en CO/EGCG se observaron LAI igual que en el grupo CS, incluso en la cantidad de células (Grafica 6) aunque en el grupo CS estas presentan signos de maduración al observarse las gotas lipídicas más oscuras.

Finalmente en el grupo CS/EGCG, las características morfológicas sugieren que se trata de células de Leydig adultas maduras (LAM), ya que esta transición también se caracteriza por un aumento significativo en el tamaño promedio de las células y la desaparición de gotas de lípidos citoplasmáticas (Figura 12).

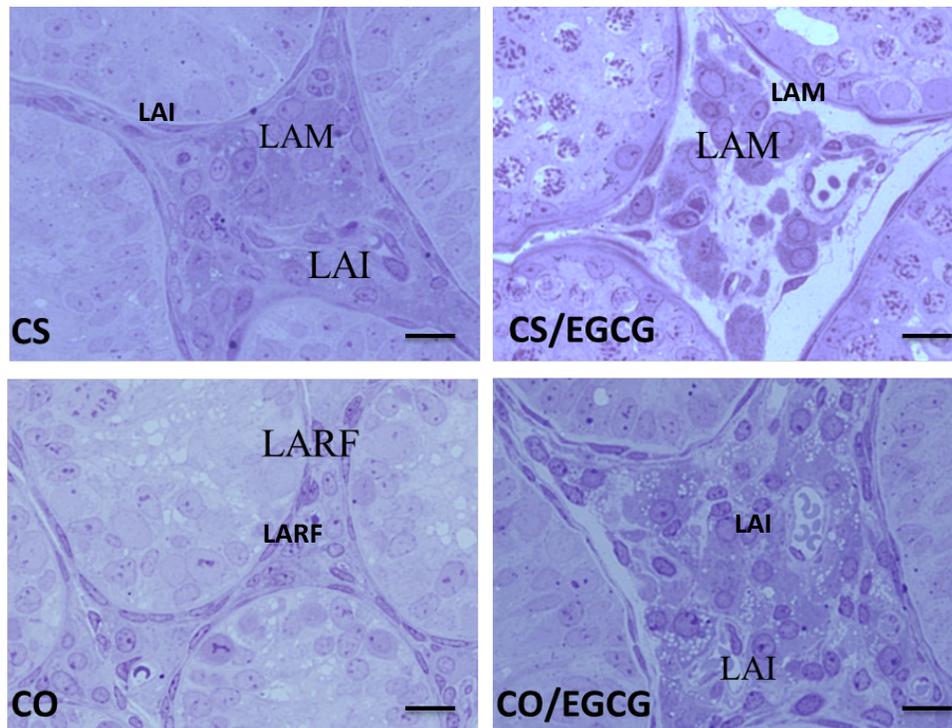
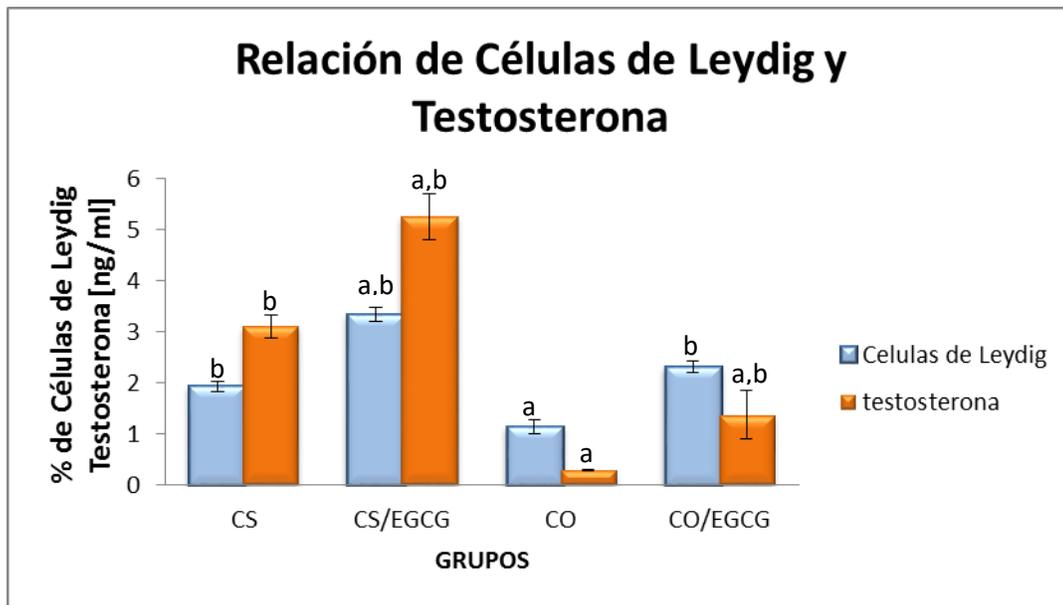


Figura 12. Micrografías en las que se observan las características morfológicas de los diferentes tipos de células de Leydig Adultas. LAI: Células de Leydig Adultas Inmaduras; LAM: Células de Leydig Adultas Maduras y LARF: Células de Leydig de Reciente Formación. Tinción con Azul de toluidina. Escala de barras, $20 \mu\text{m}$ 60X.



Gráfica 6. Cuantificación de células de Leydig y concentración sérica de testosterona a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos). En esta gráfica se aprecia que el comportamiento de la población de células de Leydig se correlaciona con las concentraciones de testosterona. El grupo CO al tener una población de células de Leydig significativamente menor ($p < 0.05$) y de reciente formación, tiene una concentración de testosterona significativamente menor ($p < 0.05$) también. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

En cuanto a las concentraciones de testosterona, podemos observar que muestran un comportamiento acorde a la población de células de Leydig presente en cada grupo. La concentración fue significativamente menor ($p < 0.05$) en el grupo CO con respecto al resto de los grupos (Gráfica 6), mientras que en el grupo CO/EGCG hubo un incremento significativo ($p < 0.05$). Para el grupo CS/EGCG, la concentración de testosterona se presentó acorde a lo reportado para conejos machos en etapa reproductiva y fue significativamente mayor con respecto a los demás grupos, incluso que el grupo CS.

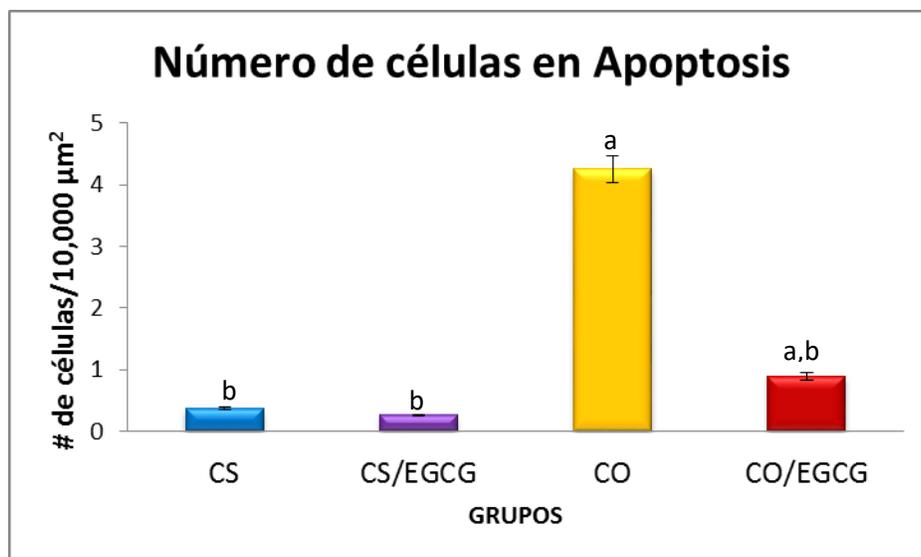
9.4 Apoptosis y Proliferación celular

9.4.1 índice apoptótico

La apoptosis es uno de los mecanismos por el cual los gonocitos indiferenciados se pierden. En el grupo CO, hubo una cantidad significativamente mayor ($p < 0.05$) de células en apoptosis, comparada con los grupos CS y CS/EGCG y es probable que las principales células afectadas

fueran, los gonocitos. Esta situación derivaría en problemas de fertilidad por falta de células germinales.

Sin embargo en el grupo CO/EGCG las células en apoptosis, disminuyeron significativamente ($p < 0.05$). Mientras que para los grupos CS y CSE, la muerte celular se encuentra dentro de los rangos necesarios para mantener un equilibrio en la espermatogénesis (Gráfica 7), (Figura 13).



Gráfica 7. Cuantificación de células en apoptosis por cada $10,000 \mu\text{m}^2$ de tejido. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos). En esta gráfica se observa que índice de apoptosis es significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto a los demás grupos. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

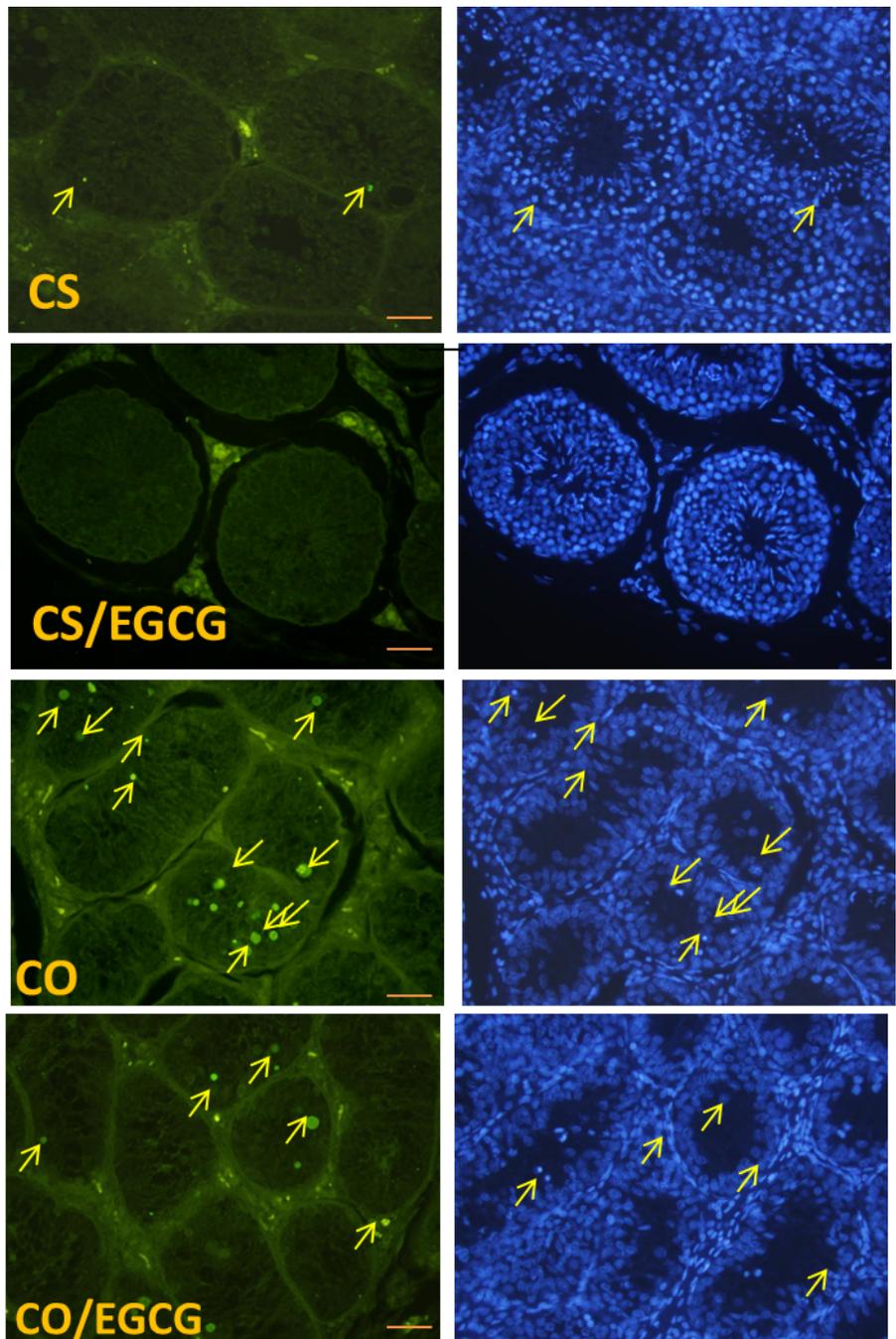
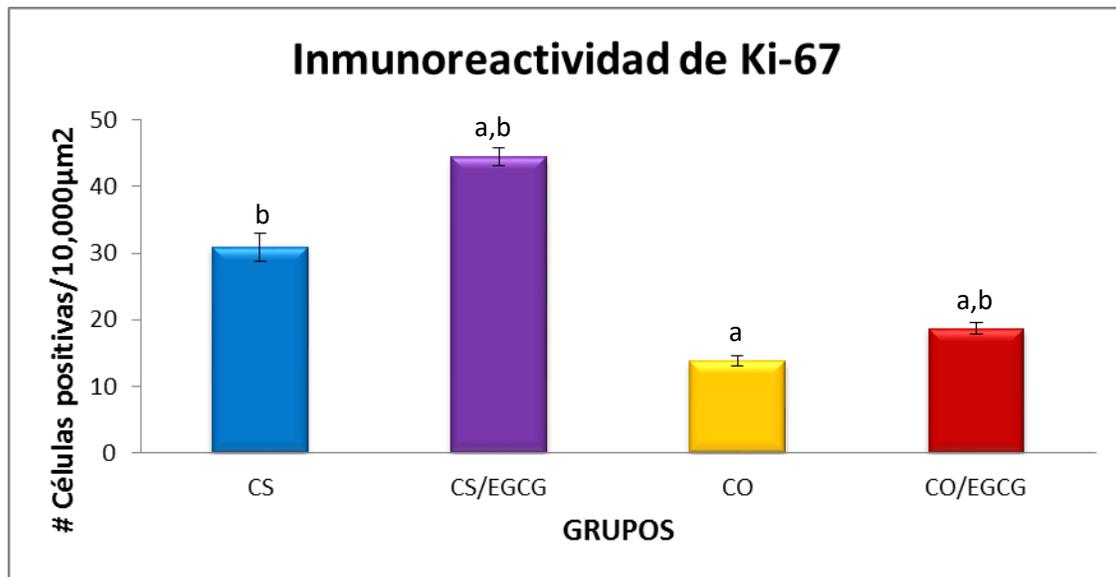


Figura 13. Micrografías donde se observan tubos seminíferos con células en apoptosis en los diferentes grupos (flechas amarillas). La primera columna tinción con DAPI (flecha) y la segunda columna células en apoptosis marcadas por la reacción con TUNEL. Escala de barras 50 μ m 20x.

9.4.2 Índice de Proliferación (Expresión de ki-67)

Los resultados anteriores, se refuerzan con la evaluación de la proliferación celular, dado que se observa un patrón inverso al índice de apoptosis en los respectivos grupos.

Dada la posible pérdida de gonocitos por apoptosis, la proliferación celular se vio afectada. Lo que se corroboró al medir la inmunoreactividad a Ki-67. Este parámetro fue significativamente menor ($p < 0.05$) en el grupo CO, comparada con los grupos CS y CS/EGCG (Gráfica 8). Lo que confirma que hubo una espermatogénesis inactiva (Figura 10) y mayor muerte celular.



Gráfica 8. Proliferación expresada por la inmunoreactividad a Ki-67. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos). Gráfica que muestra la proliferación significativamente menor en el grupo CO respecto al resto de los grupos y que se incrementa significativamente CO/EGCG en el grupo. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

El grupo CO/EGCG mostró una proliferación significativamente mayor ($p < 0.05$), pero sin alcanzar a los grupos CS y CS/EGCG. Cabe resaltar que en el grupo CS/EGCG, se observó una proliferación significativamente mayor ($p < 0.05$) que en el grupo CS, lo que coincide con la presencia de espermatozoides en este grupo (Figura 14).

Estos resultados parecen indicar que la EGCG, pudo estimular tanto la diferenciación del gonocito como la proliferación celular. Es evidente que la proliferación celular está relacionada con la reactivación de la espermatogénesis, que incluso es favorecida en el grupo CS/EGCG.

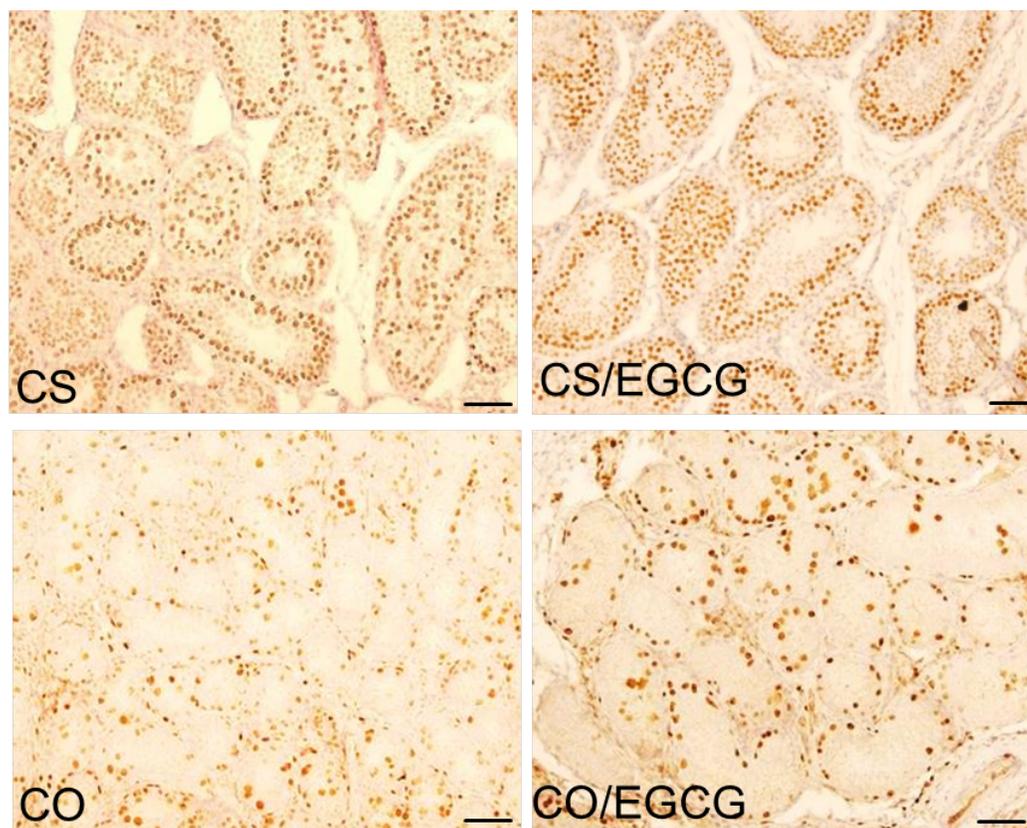
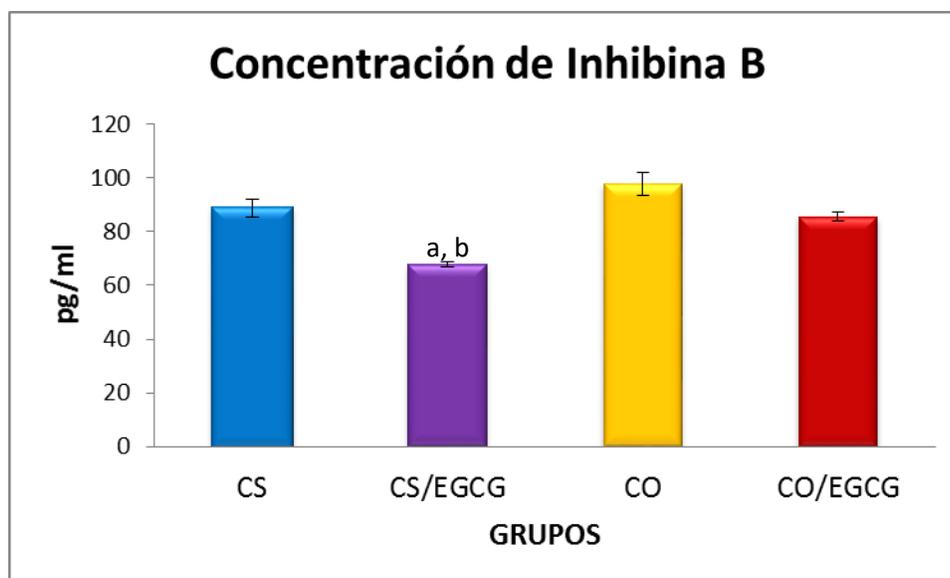


Figura 14. Micrografías en la que se observa la Inmunoreactividad a Ki-67. A (CO) Se observan pocas células en proliferación. B. (CO+EGCG) Se observa un ligero incremento en la cantidad de células en proliferación. C. (CS). Se observa una cantidad de células en proliferación considerable mayor que en A y B. D. (CSE) Se observa un incremento significativo de la proliferación celular. Escala de barras 100 μ m 10X.

9.5 Concentración Hormonal Sérica de Inhibina B.

En cuanto a la concentración de Inhibina B no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el grupo CS y el grupos CO. Sin embargo para el grupo CS/EGCG hubo una disminución significativa ($p < 0.05$) de la concentración de Inhibina B, respecto a los grupos CS, CO y CO/EGCG. Por otro lado entre el grupo CS y CO/EGCG, las concentraciones de INB son

prácticamente iguales. Dado que no se existen reportes sobre las concentraciones de INB para esta especie, es difícil establecer la tendencia normal de esta hormona.

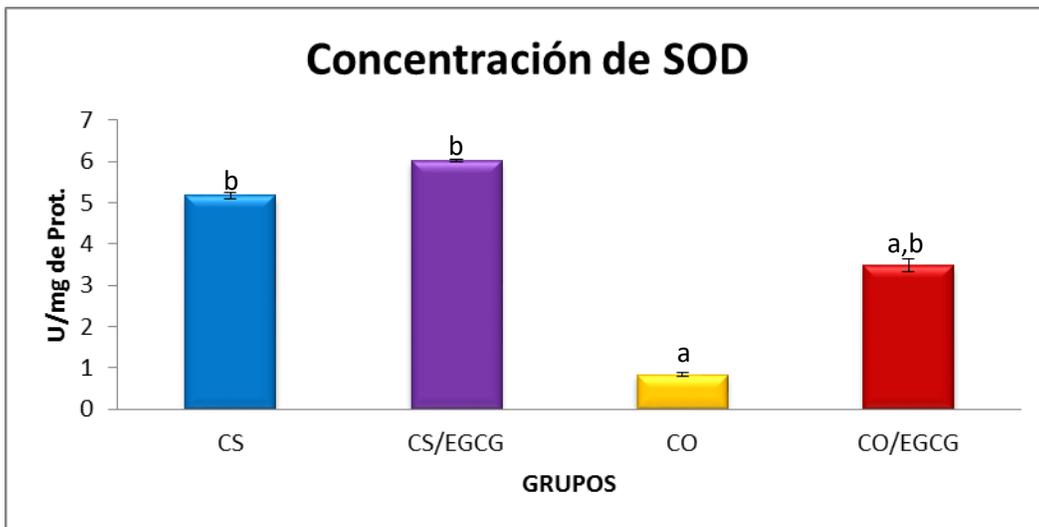


Gráfica 9. Concentración de inhibina B en los diferentes grupos. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos). Gráfica que representa el comportamiento en la concentración de Inhibina B, donde no hubo diferencias significativas entre los grupos, a excepción del grupo CS/EGCG, donde se observa una concentración significativamente menor ($p < 0,05$) que el resto de los grupos. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante ANOVA seguido de Tukey.

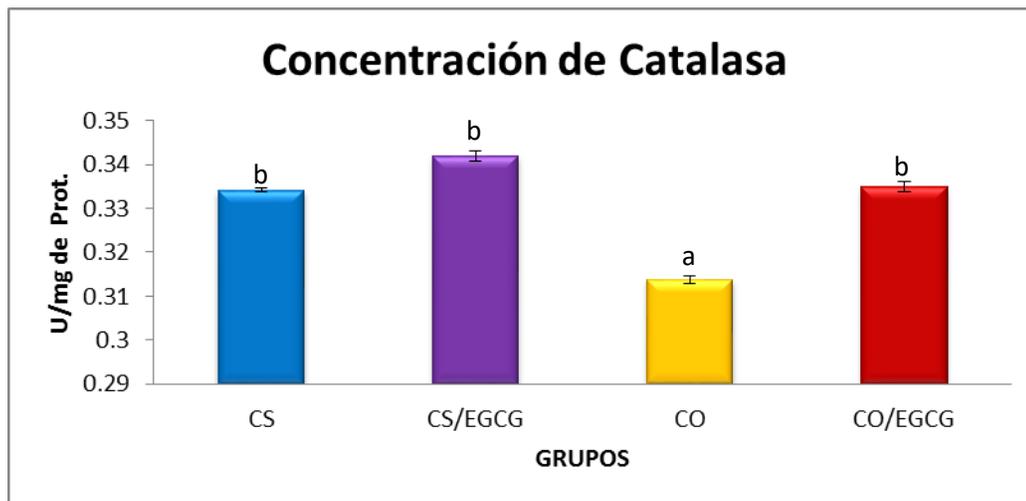
Por otro lado cabe resaltar que mencionar, que se ha observado que la Inhibina B muestra una tendencia a la alza durante la entrada a la pubertad, hasta establecer su correlación inversa con FSH, una vez que se presenta la primer oleada de la espermatogénesis (Chada et al. 2003; Radicioni et al. 2005).

9.6 Enzimas antioxidantes: Catalasa y Súper Oxido Dismutasa

La actividad enzimática tanto de SOD como de CAT, mostró un incremento significativo ($p < 0.05$), en el grupo CO/EGCG, comparado con el grupo CO ($p < 0.05$) aunque sin alcanzar a los grupos controles. Mientras que entre el grupo CS y el CS/EGCG, no hubo diferencias significativas para este parámetro (Grafica 10 y 11).



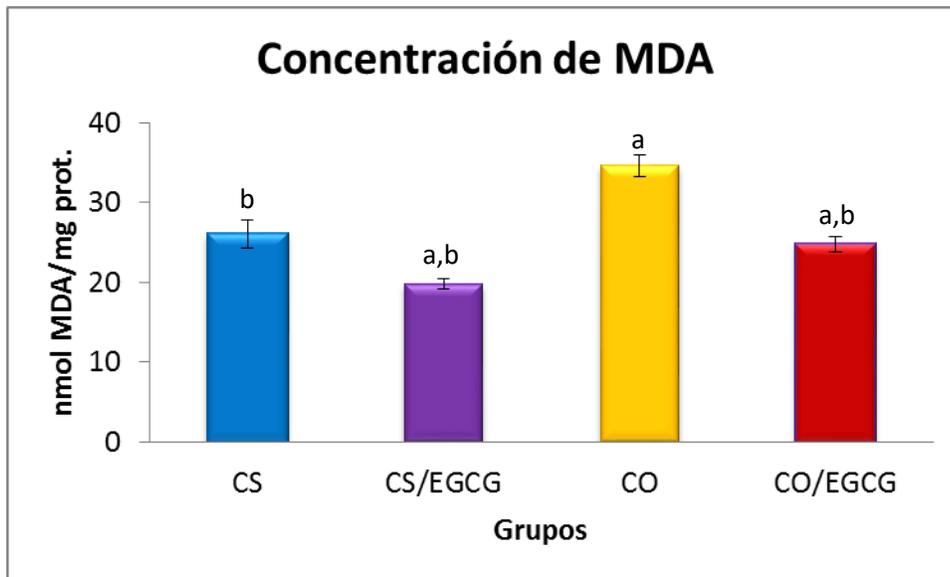
Gráfica 10. Actividad enzimática de Súper óxido Dismutasa en el medio testicular de los diferentes grupos a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.005$ (CO vs todos los grupos). Donde observamos que la actividad enzimática de SOD, es significativamente menor ($p < 0,05$) en el grupo CO, respecto al resto de los grupos. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante ANOVA seguido de Tukey.



Gráfica 11. Actividad enzimática de la Catalasa de los diferentes grupos. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.005$ (CO vs todos los grupos). Donde observamos que la actividad enzimática de CAT, es significativamente menor ($p < 0,05$) en el grupo CO, respecto al resto de los grupos. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante ANOVA seguido de Tukey.

9.7 Lipoperoxidación

Finalmente en la evaluación de la lipoperoxidación, se observó que esta se redujo significativamente ($p < 0.05$) en el grupo CO/EGCG, comparado con el grupo CO. Igualando los niveles observados en el grupo CS.



Gráfica 12. Concentraciones de MDA. a, $p < 0.05$ (CS vs todos los grupos) b, $P < 0.05$ (CO vs todos los grupos). En esta gráfica observamos que el índice de lipoperoxidación, dado por la concentración de MDA es significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo CO, respecto a los demás grupos y disminuye significativamente ($p < 0.05$) en el grupo CO/EGCG. Los datos se expresaron como la media \pm EE, y se analizaron mediante ANOVA seguido de Tukey.

Hay que destacar que incluso en el grupo CS/EGCG, los niveles de MDA son inferiores con respecto a los demás grupos.

10. DISCUSIÓN

El papel de la exposición a componentes estrogénicos en la CO

Existe evidencia de que los mecanismos de descenso testicular se ven afectados adversamente cuando hay una disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Sharpe y Skakkebaek en 1993, propusieron que trastornos reproductivos masculinos como la criptorquidia, hipospadias y recuentos espermáticos bajos podrían estar asociados a la exposición ambiental de productos químicos, con acciones que imitan a los estrógenos. Estudios previos han demostrado que la administración de 17β -estradiol previo al descenso testicular, emulando la exposición a componentes estrogénicos durante la vida fetal, inhibe el descenso testicular, como lo corroboramos en este proyecto (Bonde *et al.* 2016), lo cual confirma que este es uno de los factores etiológicos para la criptorquidia.

El mecanismo que probablemente está involucrado con el bloqueo del descenso testicular, puede estar relacionado con la regulación sobre la secreción de gonadotropinas, que llevan a cabo el estradiol y la testosterona a través de mecanismos de retroalimentación (Bonde *et al.* 2016). Un aumento de estrógenos, produce una retroalimentación negativa sobre la síntesis de la subunidad β de la LH (β -LH) en el gonadotropo de la hipófisis, lo que resulta en niveles reducidos de testosterona (Durán y Fiordeliso 2013; Bondé *et al.* 2016), debido a la imposibilidad de sintetizar LH. Este mecanismo es el que pudo participar en el desarrollo de la criptorquidia en los grupos CO y CO/EGCG, ya que los testículos se hallaron en cavidad inguinal, lo que sugirió que el descenso se irrumpió en la segunda fase, que es andrógeno-dependiente. Por otro lado se ha informado que el estradiol puede inhibir la producción de andrógenos, limitando el desarrollo y crecimiento de células de Leydig o evitando directamente las actividades de varias enzimas implicadas en la síntesis de testosterona (Hermanowicz *et al.* 2012).

Es importante señalar que el estradiol es producido no sólo por la madre, sino también en cantidades significativas por las células de Sertoli del varón en gestación. Además, se ha visto que los testículos concentran estradiol hasta 10 a 50 veces más que en la sangre periférica (Hermanowicz *et al.* 2012), por lo que la exposición a componentes con actividad estrogénica

(pftalatos, fitoestrogenos) puede repercutir directamente sobre las concentraciones de estradiol que recibe el feto. Es así como dichas concentraciones pueden ejercer inestabilidad en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, e interrumpir el descenso testicular. Sin embargo a pesar de que se ha informado sobre estos efectos, es difícil establecer el agente etiológico para la criptorquidia, por lo que las consecuencias pueden ser diversas.

Efectos de la CO sobre la Fertilidad

Algunos de los estudios realizados sobre los efectos de la CO, han examinado la producción de EROs en ratones adultos a los que se les indujo criptorquidia. Este estudio, muestra que un aumento de EROs, se correlacionó con un aumento de apoptosis en células germinales y alteración en la expresión de genes asociados con el metabolismo energético, el metabolismo de los lípidos y la respuesta al estrés (Docampo y Hadziselimovic 2015; Ikeda *et al.* 1999). En los presentes resultados, corroboramos que la criptorquidia, se asocia con alteraciones hormonales, como la disminución en la concentración de testosterona, e histológicas como la presencia de gonocitos indiferenciados, que irrumpen el adecuado desarrollo de la espermatogénesis, y que dichas alteraciones pueden estar asociadas directamente al aumento en la producción de EROs, debido al incremento que se observó en la lipoperoxidación y la baja actividad de SOD y CAT.

Como ya se ha mencionado, la diferenciación del gonocito hacia el linaje de células espermáticas comienza en el humano durante el último tercio de gestación y el primer año posparto, cuando los gonocitos neonatales se transforman en espermatogonias oscuras (AD) (Cobellis *et al.*, 2014; Hutson *et al.*, 2013a) y en torno a los 50 dpp en el conejo. Sin embargo los testículos requieren de un ajuste enzimático y temperatura adecuada, para que dicho proceso se lleve a cabo, ya que en la mayoría de los mamíferos, se han desarrollado mecanismos fisiológicos y anatómicos para mantener tanto el testículo como el epidídimo frescos (~33°C). Incluso los mamíferos donde el testículo no desciende (el elefante, la marsopa, el delfín y la ballena), hay adaptaciones que permiten que los espermatozoides se almacene por debajo de la temperatura corporal central (Hutson *et al.* 2016). Por lo que es evidente que se requiere un temperatura inferior a la corporal para que la diferenciación del

gonocito se lleve a cabo satisfactoriamente y que en los individuos con CO este proceso se ve afectado.

Por otro lado, durante la Criptorquidia experimental inducida, la reducida concentración de testosterona, la baja actividad de SOD y CAT (Bauche *et al.*, 1994; Mruk *et al.*, 2002 Ghanbari *et al.*, 2016) y los niveles incrementados de lipoperoxidación (Kheradmand *et al.* 2014), así como un índice apoptótico exacerbado (Ding *et al.* 2015), confirman que el microambiente que predomina, no es el adecuado para dar inicio a una espermatogénesis normal. Lo que hace que la CO sea el factor etiológico más frecuente de la azoospermia en el adulto (Chung y Brock 2011).

El aumento en el proceso de espermatogénesis conduce a un aumento en el diámetro de los tubos seminíferos, entonces es de esperar que volúmenes testiculares más pequeños, junto con valores menores de diámetros tubulares, pueden indicar una disminución en la espermatogénesis (Tripathi *et al.* 2015). Hasta este punto, los parámetros morfométricos evaluados en este trabajo, sugieren que el grupo CO/EGCG, presenta un mejor desarrollo testicular respecto al grupo CO, donde, tanto peso testicular, IGS y área tubular fueron significativamente menores. Lo que sugiere un efecto positivo de la EGCG sobre los parámetros evaluados, incluso en el grupo CS/EGCG.

Papel protector de la EGCG y posibles mecanismos

EGCG y su efecto antioxidante

Ya se ha determinado en diversos estudios, que la EGCG, es un eficaz antioxidante con alta capacidad para proteger contra el daño oxidante en diferentes sistemas (Ding *et al.* 2015) lo que coincidió con los resultados obtenidos en este trabajo. Estos efectos protectores se deben en gran parte a la activación de algunas enzimas y la eliminación de RL ya reportado para algunas catequinas (Kondo *et al.* 1999). Se ha observado que la abstracción de un átomo de hidrógeno en las posiciones C-2 en la Epicatequin galato (EGC) y la epicatequina (EC) juega un papel importante en el efecto antioxidante (Kondo *et al.* 1999). Por otro lado, se ha informado que la estructura trihidroxi en el anillo B de la EGCG le permite recoger los

radicales libres de manera más eficaz, y que la escisión del grupo galato en la posición C-3 es realizada por radicales de peróxido (Hagerman *et al.* 2003), siendo una forma de estabilizar este radical. La química subyacente a esta actividad proviene principalmente de la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), de reacciones de transferencia de un solo electrón (SET) o ambas, que implican a los grupos hidroxilo, constituyentes de los anillos B y D de ECG y EGCG (Lambert y Elias 2010). A partir de la reacción SET, se forman primero cationes de radicales fenólicos, seguidos de una desprotonación.

Recientemente se ha informado que la EGCG puede quelar metales como hierro, cobre, cromo y cadmio y que Reduce Fe (III) y Cu (II) a Fe (II) y Cu (I), respectivamente. De este modo, se inhibe la producción de RL a partir de la reacción de Fenton, que particularmente genera al radical OH^\cdot (Roychoudhury *et al.* 2017). Es así como la EGCG activa una primera línea de defensa con efecto antioxidante. Estos efectos se han visto reflejados en estudios como el realizado por Meng *et al.*, (2008), donde la EGCG mejora con éxito la función mitocondrial en ratas diabéticas. Otro estudio de Wang *et al.*, (2014), donde observó que la EGCG puede ejercer efectos antioxidantes y neuroprotectores significativos después de isquemia cerebral focal en ratas.

EGCG y su efecto antiapoptótico

Por otro lado, se ha encontrado que la exposición directa de células espermatozógenas a temperaturas elevadas induce altas tasas de apoptosis a través de mecanismos que se asociaron con generación elevada de H_2O_2 . Aitken *et al.*, (2008) y Cia *et al.*, (2014) demostraron que la EGCG protege a las células epiteliales pigmentarias primarias de la retina, de la apoptosis inducida por H_2O_2 . Posiblemente la EGCG podría disminuir el índice de apoptosis a través de este mecanismo. Sin embargo aunque la disminución de RL, puede tener un efecto directo sobre la disminución de la lipoperoxidación y el índice de apoptosis, también se ha demostrado que el tratamiento de EGCG en un modelo de isquemia reperusión, fue capaz de disminuir la expresión de RNAm de iNOS, MCP-1 y genes pro-apoptóticos, en favor de la supervivencia celular (Al-Maghrebi *et al.* 2012).

Es importante añadir, que se ha establecido que las vías de muerte apoptóticas, tanto extrínsecas como intrínsecas, están activas en las células germinales cuando hay una disminución de las concentraciones de FSH y testosterona (Shaha *et al.* 2010). Lo que en este caso hizo más susceptible a los gonocitos de perderse por apoptosis. Por otro lado, se ha observado que las células germinales primordiales o gonocitos, se pierden por apoptosis que dependen en gran medida de Bcl-xL y Bax (Shaha *et al.* 2010). Ding *et al.*, (2015) sugiere que los efectos pro supervivencia del tratamiento con EGCG sobre el estrés por radiación ionizante, fueron regulados, al menos en parte, a través del bloqueo de la vía de la MAPK/JNK/P38/caspasa 3 y que la expresión de BAX se restauró casi al nivel normal del control, regulando a la alza la expresión de BCL2 en testículos irradiados.

Sin embargo, también es importante señalar que la apoptosis celular parece ser una característica constante en los testículos adultos y durante el desarrollo temprano. Esto es esencial debido a que la espermatogénesis de los mamíferos es un proceso complejo que requiere una homeostasis precisa de diferentes tipos de células (Shaha *et al.* 2010). Como en muchos tejidos en todo el cuerpo, el número de células en los tubos seminíferos está determinado por un equilibrio dinámico entre la proliferación celular y la apoptosis (Shaha *et al.*, 2010). Por lo que, es importante el papel regulador que puede estar desempeñando la EGCG, ya que disminuye el índice de apoptosis sin llegar a inhibirla por completo.

EGCG en la diferenciación y proliferación

Estudios recientes en humano muestran que el gonocito neonatal migra a la periferia del cordón, posicionándose entre las células de Sertoli, entre los 3 y 9 meses de edad, 2 y 6 días de edad en ratones (Hutson *et al.* 2013a) y de los 42 a los 50 días en el conejo (Vigueras-Villaseñor *et al.* 2013). El fracaso en la migración, conduce al gonocito a apoptosis (Barthold 2015). Lo que ocurrió en el grupo CO, mientras que en el grupo CO/EGCG, la presencia de espermatocitos, sugirió que la epigalocatequina, estimuló la diferenciación del gonocito. Esto se corrobora por lo documentado por Kwon *et al.*, (2017) y Zhang *et al.*, (2016), donde concluyeron que la EGCG estimuló la diferenciación y proliferación de odontoblastos y células madre de neuronas cocleares (NSC), respectivamente. En estos estudios, se sugiere que

la EGCG estimula la diferenciación y proliferación celular, en cultivos de NSC enriquecidos con EGCG a 0.1 μ M, activando la vía PI3K/AKT.

Aunque la EGCG, estimuló el inicio de la espermatogénesis en el grupo CO, esta no progresó más allá de los espermatocitos, debido a que los testículos permanecieron en cavidad inguinal y se ha reportado que las células germinales sometidas a meiosis (espermatozoides) son altamente sensibles al choque térmico (Lagos y Moreno, 2012). Por lo tanto la espermatogénesis no puede proseguir en estas condiciones, además de que serían más susceptibles de presentar mutaciones.

EGCG sobre la población de Células de Leydig y la concentración de testosterona

Otras de las células que se ven afectadas en los individuos con CO, son las células de Leydig, las cuales también pueden perderse por apoptosis o ser hipertróficas (Kaftanovskaya *et al.* 2012; Shima *et al.*, 2015). En este trabajo, pudimos observar que las células de Leydig tuvieron una maduración deteriorada.

Mendis y Ariyaratne 2001, refieren que las células de Leydig adultas de reciente formación permanecen cercanas a su origen peritubular, y además presentan un núcleo bastante grande y prominente, con pocas o ninguna gota lipídicas en el citoplasma. Estas características se observaron en el grupo CO, donde además las concentraciones de testosterona fueron significativamente menores que en los demás grupos, por lo que es posible que las células de Leydig presentes en este grupo, sean de reciente formación y por lo tanto incapaces de producir testosterona (Habert *et al.*, 2001).

En el caso de grupo CS y CO/EGCG, la concentración de testosterona fue menor que el grupo CS/EGCG pero mayor que el grupo CO, indicativo de la presencia de células de Leydig adultas inmaduras, ya que se observaron células de Leydig desplazadas hacia el intersticio central, con gran cantidad de gotas lipídicas. Debido a que se ha reportado que este tipo celular tiene el 40% de la capacidad de secreción de testosterona de una célula adulta madura (Habert *et al.*, 2001), la concentración de testosterona se correlacionó con la presencia de este tipo celular. Finalmente en el grupo CS/EGGC la concentración de testosterona se correlacionó

con una población de células de Leydig adulta madura. Dado que la capacidad de secretar testosterona aumenta significativamente en estas células, ya que adquieren más orgánulos necesarios para la producción de esteroides y una respuesta mejorada a la LH circulatoria (Mendis y Ariyaratne 2001), y la concentración de testosterona fue significativamente mayor comparada con el resto de los grupos.

Sin embargo, cabe señalar que Yu *et al.*, (2010) estudio los efectos de las catequinas sobre la esteroidogénesis, y observó que las catequinas aumentan la testosterona plasmática *in vivo* en ratas macho. Además la concentración de catequinas en dosis bajas aumentan la liberación de LH estimulada por la GnRH y la liberación de testosterona estimulada por hCG por CL *in vitro*. En ese estudio, concluyeron que las catequinas estimularon la producción de testosterona actuando sobre las células de Leydig, incrementando el AMPc, el cual está documentado que participa como segundo mensajero en la vía de la esteroidogénesis en respuesta a LH (Tremblay *et al.* 2015).

Por otro lado, existen reportes en donde se documenta que la catalasa puede ser una enzima importante en el metabolismo de los lípidos, especialmente el colesterol, y puede funcionar con otras enzimas peroxisomales en la esteroidogénesis (Ihrig *et al.* 1974). Lo que se refuerza con los datos encontrados, ya que las concentraciones de testosterona coinciden con el incremento de catalasa en los grupos experimentales.

EGCG y la Inhibina B

En cuanto a las concentraciones que se encontraron de INB, podemos sugerir que el comportamiento que se observa en los diferentes grupos puede atribuirse a que los grupos CO y CO/EGCG, presentan características que coinciden con individuos en etapa prepuberal, y que el grupo CS está iniciando esta etapa. Se ha reportado, que durante la etapa del periodo prepuberal, las células de Sertoli liberan INB, una glicoproteína perteneciente a la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), por lo que se le considera un indicador de la función de las células de Sertoli en niños prepúberes (Kurtoglu y Bastug 2014) y que esta hormona, aumenta después del parto, alcanzando un pico entre los 4 y los 12 meses, que incluso, excede la concentración en los adultos y que se encuentra en una concentración

considerablemente baja entre los 3 y 9 años, aumentando de nuevo con el inicio de la pubertad (Kurtoglu y Bastug 2014). Por lo tanto, en este caso la INB presenta concentraciones características de individuos en etapa prepuberal, en los grupos CO y CO/EGCG, donde la concentración es mayor que en un adulto (datos obtenidos en este laboratorio). El grupo CS, presenta una concentración representativa de un individuo que inicia la pubertad para finalmente establecer las concentraciones basales que regularan el proceso de espermatogénesis, como las observadas en el grupo CS/EGCG.

EGCG y enzimas antioxidantes

En presencia de SOD, el O_2^- es reducido a H_2O_2 , con el fin de evitar la producción del radical hidroxilo, altamente pernicioso (Aitken y Roman 2008). A su vez el H_2O_2 es eliminado por la Catalasa (Aitken y Roman, 2008). A pesar de que se ha reportado que la eliminación del H_2O_2 es efectuada principalmente por la glutatión peroxidasa, en el caso de los testículos (Aitken y Roman 2008), en este estudio, se observó que la EGCG sí estimulo el incremento de la enzima CAT.

Por otro lado Shi y cols, (2016), reportaron un aumento significativo de la actividad de SOD en células endoteliales de la vena umbilical humana, tratados con EGCG. Donde además, inhibió la expresión de $TNF-\alpha$ e IL-6. Este autor sugiere que la estimulación de enzimas antioxidantes, está relacionado con la inhibición de la vía *NF-kB* que participa en mecanismos de respuesta inflamatoria. Sin embargo Echeverri (2008), menciona que la vía *NF-kB* desencadena procesos de supervivencia incluyendo el aumento de la transcripción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, pero que la sobreactivación de *NF-kB* se relaciona con inflamación y cáncer, por lo que posiblemente, la vía *NF-kB* puede estar sobreexpresada en células sometidas a estrés oxidante. Sin embargo el mecanismo no es del todo claro.

Algunos estudios han enfatizado que la presencia del ARNm de SOD es más alta en el testículo que en el hígado, incluso que la GPx y CAT (Aitken y Roman 2008). Esto puede estar relacionado a que se ha reportado que los testículos contienen no sólo las formas convencionales citosólicas y mitocondriales de SOD, sino también una forma inusual de SOD

extracelular (SOD-ex) producida tanto por la célula de Sertoli como por las células germinales. También hay algunas pruebas de que las células germinales pueden estimular la secreción de SOD-ex por las células de Sertoli a través de las acciones de citoquinas como la interleucina-1 α (Aitken y Roman 2008). Nuestros resultados sugieren que la EGCG restableció las concentraciones de SOD, sin embargo es posible que este incremento también esté relacionado con la restauración de la población de células germinales que indujo la secreción de SOD-ex por las células de Sertoli.

EGCG y lipoperoxidación

Adicionalmente en este trabajo también observamos que hubo una disminución de la Lipoperoxidación, en los grupos tratados con EGCG, lo que indicó la preservación de la integridad de membrana, que pudo estar relacionado con la maduración, activación de vías de diferenciación y proliferación. Debido a una mejor capacidad de respuesta membranal, que derivó en el incremento en la concentración de testosterona y activación de la espermatogénesis.

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena en la que se abstraen átomos de hidrógeno de ácidos grasos insaturados, dando radicales alquilo que reaccionan con oxígeno molecular para dar radicales hidropoxilo lipídico. En ausencia de antioxidantes de cadena, estos radicales peroxilo abstraen átomos de hidrógeno a partir de un sustrato lipídico no oxidado, resultando en nuevos radicales alquilo lipídicos y eventualmente en productos de oxidación secundarios (por ejemplo, malonaldehído). Aparentemente, la reacción entre los radicales peroxilo lipídico y los lípidos no oxidados es relativamente lenta, proporcionando a los antioxidantes fenólicos la oportunidad de interceptar radicales peroxilo e interrumpir la propagación de la cadena (Lambert y Elias 2010)

Es importante señalar que la EGCG, evidenció estos efectos también en el grupo CS/EGCG, lo que indicó que las alteraciones inespecíficas reportadas para el conejo raza chinchilla (Vigueras *et al.*, 2013) son reducidas al administrar la EGCG. Esto se vio reflejado en una espermatogénesis completa, incrementando la proliferación, la esteriodogénesis y estimulando

al sistema antioxidante endógeno en conejos sanos. Estos resultados sugieren que la EGCG puede actuar como un regulador positivo de la pubertad y por lo tanto de la fertilidad.

EGCG y las posibles vías

A pesar de las investigaciones que se han realizado sobre la EGCG, los mecanismos exactos por los que ejerce sus efectos, no están del todo claros. Sin embargo, se ha informado, que el receptor 67LR (receptor de laminina de 67 kDa) se ha identificado como un receptor de membrana que se activa por unión a la EGCG, para mediar efectos antitumorales *in vivo* (Kumazoe *et al.* 2013). Estos efectos son mediados a través de la activación de vías como la Akt/eNOS/NO/cGMP/PKC δ . Curiosamente, también se ha reportado que algunos de los efectos antioxidantes de la EGCG, están mediados a través de la señalización mediada por AKT, donde la fosforilación de AKT en los residuos Ser473 y Thr308 en cultivos de NSC fue estimulada por 0.1 μ M de EGCG (Zhang *et al.* 2016). Por otro lado se ha mencionado que la EGCG, actúa selectivamente sobre células sanas y dañadas, por lo que ambos efectos proapoptóticos (atitumorales) y anti-apoptóticos (antioxidante) pueden estar mediados a través del mismo receptor. Ya que las vías de señalización antes mencionadas, convergen en la activación de AKT (También conocida como proteína quinasa B o PKB).

A pesar de que existen pocos trabajos sobre el papel de la EGCG en el mecanismo reproductivo, este estudio, coincide con lo hallado por Yu *et al.*; (2010) donde concluyen que las catequinas ejercen estimulación sobre la producción de testosterona. Así mismo Ding *et al.*, (2015) sugiere que el empleo de este polifenol bioactivo puede usarse como estrategia para preservar la fertilidad en los varones. Finalmente aunque los mecanismos mediante los cuales actúa la EGCG, no son del todo claros, es evidente que estos convergen para ejercer un efecto protector frente al daño producido como consecuencia del estrés oxidante.

11. CONCLUSIONES

La EGCG ejerce un efecto protector, frente a las alteraciones producidas durante la CO experimental. Sugiriendo que el sistema antioxidante endógeno puede ser restaurado, mediante el incremento de la actividad enzimática de SOD y CAT, y disminuyendo la lipoperoxidación.

Esto a su vez puede estimular la diferenciación y proliferación celular que restaura la población de células germinales.

Sin embargo, en el caso de individuos con CO, aunque la espermatogénesis no puede proseguir dado que los testículos permanecen inguinales y el proceso de meiosis es altamente sensible a la temperatura, la ECGC puede brindar una estrategia preventiva, mientras se realiza la corrección quirúrgica de la CO.

12. PERSPECTIVAS

No obstante se sugiere realizar una valoración posterior sobre la calidad espermática, y un análisis histológico a nivel de epidídimo, para complementar los resultados que aquí se reportan. Esto con el fin de contar con una visión completa del efecto de la ECGC, sobre la fertilidad masculina en este modelo animal.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abacı A, Çatlı G, Anık A, Böber E (2013) Epidemiology, Classification and Management of Undescended Testes: Does Medication Have Value in its Treatment? *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 5:65–72. doi: 10.4274/Jcrpe.883
- Agoulnik AI, Feng S (2007) The Genetics of Cryptorchidism. 185–198. doi: 10.1007/978-1-59745-176-5_11
- Aitken RJ, Roman SD (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 1:15–24.
- Al-Maghrebi M, Renno WM, Al-Ajmi N (2012) Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 420:434–439. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.013
- Amann RP, Veeramachaneni DNR (2007) Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction* 133:541–561. doi: 10.1530/REP-06-0272
- Barthold JS (2008) Undescended testis: current theories of etiology. *Curr Opin Urol* 18:395–400.
- Bay K, Asklund C, Skakkebaek NE, Andersson A-M (2006) Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:77–90. doi: 10.1016/j.beem.2005.09.004
- Bay K, Main KM, Toppari J, Skakkebaek NE (2011) Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu. *Nat Rev Urol* 8:187–196. doi: 10.1038/nrurol.2011.23
- Bonde JP, Flachs EM, Rimborg S, et al (2016) The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. doi: 10.1093/humupd/dmw036
- Braga LH, Lorenzo AJ (2017) Cryptorchidism: A practical review for all community healthcare providers. *Can Urol Assoc J* 11:26. doi: 10.5489/cuaj.4343
- Büttemeyer R, Philipp A., Schlenzka L, et al (2003) Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo. *Transplant Proc* 35:3116–3120. doi: 10.1016/j.transproceed.2003.10.055
- Celino FT, Yamaguchi-Shimizu S, Miura C, Miura T (2012) Proliferating Spermatogonia Are Susceptible to Reactive Oxygen Species Attack in Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Biol Reprod* 87:70–70. doi: 10.1095/biolreprod.112.099887

- Chada M, Prusa R, Bronsky J, et al (2003) Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone during childhood and puberty in males: changes in serum concentrations in relation to age and stage of puberty. *Physiol Res* 52:45–52.
- Chen J, Wu S, Wen S, et al (2015) The mechanism of environmental endocrine disruptors (DEHP) induces epigenetic transgenerational inheritance of cryptorchidism. *PLoS One* 10:e0126403.
- Chen S-R, Liu Y-X (2015) Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction* 149:R159–R167. doi: 10.1530/REP-14-0481
- Chung E, Brock GB (2011) Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. *Can Urol Assoc J* 5:210–4.
- Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749–762. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- Cobellis G, Noviello C, Nino F, et al (2014) Spermatogenesis and Cryptorchidism. *Front Endocrinol*. doi: 10.3389/fendo.2014.00063
- Compløj E, Pycha A (2012) Diagnosis and Management of Cryptorchidism. *Eur Urol Suppl* 11:2–9. doi: 10.1016/j.eursup.2012.01.005
- CÓRDOVA IZQUIERDO ACJ (2009) Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática; Oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation. *Rev Complut Cienc Vet* 3:1–38.
- Ding J, Wang H, Wu Z-B, et al (2015) Protection of Murine Spermatogenesis Against Ionizing Radiation-Induced Testicular Injury by a Green Tea Polyphenol1. *Biol Reprod*. doi: 10.1095/biolreprod.114.122333
- Docampo MJ, Hadziselimovic F (2015) Molecular Pathology of Cryptorchidism-Induced Infertility. *Sex Dev* 9:269–278. doi: 10.1159/000442059
- Dohle GR, Elzanaty S, Van Casteren NJ (2012) Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl* 14:88.
- Dong R, Wang D, Wang X, et al (2016) Epigallocatechin-3-gallate enhances key enzymatic activities of hepatic thioredoxin and glutathione systems in selenium-optimal mice but activates hepatic Nrf2 responses in selenium-deficient mice. *Redox Biol* 10:221–232. doi: 10.1016/j.redox.2016.10.009

- Drumond AL, Meistrich ML, Chiarini-Garcia H (2011) Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* 142:145–155. doi: 10.1530/REP-10-0431
- Duan S, Zhang X, Jiang X, et al (2015) An insight into insulin-like factor 3 regulate its receptor RXFP2 in mouse gubernaculum testis cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8:14806–14811.
- Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C (2015) Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online* 30:14–27. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.09.018
- Durán-Pastor ML, Fiordeliso T (2013) GnRH-Induced Ca²⁺ Signaling Patterns and Gonadotropin Secretion in Pituitary Gonadotrophs. Functional Adaptations to Both Ordinary and Extraordinary Physiological Demands. *Front Endocrinol*. doi: 10.3389/fendo.2013.00127
- El-Bahr SM (2013) Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Sci Int* 1:111–117. doi: 10.5567/sciintl.2013.111.117
- El-Missiry MA (ed) (2012) Antioxidant Enzyme. InTech
- Favorito LA, Costa SF, Junior J, et al (2014) The importance of the gubernaculum in testicular migration during the human fetal period. *Int Braz J Urol* 40:722–729. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.06.02
- Feng S, Bogatcheva NV, Truong A, et al (2006) Over Expression of Insulin-Like 3 Does Not Prevent Cryptorchidism in GNRHR or HOXA10 Deficient Mice. *J Urol* 176:399–404. doi: 10.1016/S0022-5347(06)00519-2
- Fleck D, Mundt N, Bruentgens F, et al (2016) Distinct purinergic signaling pathways in prepubescent mouse spermatogonia. *J Gen Physiol* 148:253–271. doi: 10.1085/jgp.201611636
- Garcia TX, DeFalco T, Capel B, Hofmann M-C (2013) Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. *Dev Biol* 377:188–201. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.01.031
- Garcia TX, Hofmann M-C (2013) NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate. *Cell Cycle* 12:2538–2545. doi: 10.4161/cc.25627
- Griswold MD (2015) 8 - The initiation of spermatogenesis and the cycle of the seminiferous epithelium. In: *Sertoli Cell Biology (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp 233–245
- Guo Y-L, Chakraborty S, Rajan SS, et al (2010) Effects of Oxidative Stress on Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation, Apoptosis, Senescence, and Self-Renewal. *Stem Cells Dev* 19:1321–1331. doi: 10.1089/scd.2009.0313

- Gupta RK, Patel AK, Shah N, et al (2014) Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:4405–4409. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.11.4405
- Hadziselimovic F, Zivkovic D, Bica DTG, Emmons LR (2005) THE IMPORTANCE OF MINI-PUBERTY FOR FERTILITY IN CRYPTORCHIDISM. *J Urol* 174:1536–1539. doi: 10.1097/01.ju.0000181506.97839.b0
- Hagerman AE, Dean RT, Davies MJ (2003) Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage. *Arch Biochem Biophys* 414:115–120. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00158-9
- Hermanowicz A, Matuszczak E, Debek W, et al (2012) Expression of estrogen receptors α and β in paratesticular tissues in boys operated on for unilateral cryptorchidism between the 1st and 4th years of life. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 18:CR630-CR634. doi: 10.12659/MSM.883490
- Huang Z, Rivas B, Agoulnik AI (2012) Insulin-Like 3 Signaling Is Important for Testicular Descent but Dispensable for Spermatogenesis and Germ Cell Survival in Adult Mice. *Biol Reprod*. doi: 10.1095/biolreprod.112.103382
- Hutson J, Li R, Vikraman J, Loebenstein M (2016) What Animal Models of Testicular Descent and Germ Cell Maturation Tell Us about the Mechanism in Humans. *Eur J Pediatr Surg* 26:390–398. doi: 10.1055/s-0036-1592196
- Hutson JM, Balic A, Nation T, Southwell B (2010) Cryptorchidism. *Semin Pediatr Surg* 19:215–224. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2010.04.001
- Hutson JM, Hasthorpe S (2005) Testicular descent and cryptorchidism: the state of the art in 2004. *J Pediatr Surg* 40:297–302. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2004.10.033
- Hutson JM, Li R, Southwell BR, et al (2015) Regulation of testicular descent. *Pediatr Surg Int* 31:317–325. doi: 10.1007/s00383-015-3673-4
- Hutson JM, Li R, Southwell BR, et al (2013a) Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? *Front Endocrinol*. doi: 10.3389/fendo.2012.00176
- Hutson JM, Southwell BR, Li R, et al (2013b) The Regulation of Testicular Descent and the Effects of Cryptorchidism. *Endocr Rev* 34:725–752. doi: 10.1210/er.2012-1089
- Ihrig TJ, Renston RH, Renston JP, Gondos B (1974) Catalase activity in the developing rabbit testis. *J Reprod Fertil* 39:105–108.

- Jung KY, Yon J-M, Lin C, et al (2015) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is involved in the maintenance of male fertility under cryptorchidism in mice. *Reprod Toxicol Elmsford N* 57:73–80. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.05.014
- Kaftanovskaya EM, Feng S, Huang Z, et al (2011) Suppression of Insulin-Like3 Receptor Reveals the Role of β -Catenin and Notch Signaling in Gubernaculum Development. *Mol Endocrinol* 25:170–183. doi: 10.1210/me.2010-0330
- Kaftanovskaya EM, Huang Z, Barbara AM, et al (2012) Cryptorchidism in Mice with an Androgen Receptor Ablation in Gubernaculum Testis. *Mol Endocrinol* 26:598–607. doi: 10.1210/me.2011-1283
- Kaleva M, Toppari J (2003) Genetics and hormones in testicular descent. *Horm Athens Greece* 2:211–216.
- Kassim NM, Russell DA, Payne AP (2010) Does the Cranial Suspensory Ligament Have a Role in Cryptorchidism? *Cells Tissues Organs* 191:307–315. doi: 10.1159/000260062
- Kheradmand A, Dezfoulian O, Alirezaei M, Hadian B (2014) Ghrelin is a suppressor of testicular damage following experimentally induced cryptorchidism in the rat. *J Pediatr Surg* 49:593–598. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.10.003
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA (2010) Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 38:96–109. doi: 10.1177/0192623309356453
- Kojima Y, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y (2009) Advances in Molecular Genetics of Cryptorchidism. *Urology* 74:571–578. doi: 10.1016/j.urology.2009.04.037
- Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B (2012) The generation of spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reprod Biol* 12:5–23.
- Kondo K, Kurihara M, Miyata N, et al (1999) Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Radic Biol Med* 27:855–863. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00133-1
- Kumar N, Singh AK (2015) Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci* 8:191. doi: 10.4103/0974-1208.170370
- Kumazoe M, Sugihara K, Tsukamoto S, et al (2013) 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis. *J Clin Invest* 123:787–799. doi: 10.1172/JCI64768
- Kurtoglu S, Bastug O (2014) Mini puberty and its interpretation. *Türk Pediatri Arş* 49:186–191. doi: 10.5152/tpa.2014.2038

- Kvist K, Clasen-Linde E, Cortes D, et al (2014) Adult Immunohistochemical Markers Fail to Detect Intratubular Germ Cell Neoplasia in Prepubertal Boys with Cryptorchidism. *J Urol* 191:1084–1089. doi: 10.1016/j.juro.2013.10.001
- Lagos-Cabré R, Moreno RD (2012) Contribution of environmental pollutants to male infertility: A working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biol Res* 45:5–14. doi: 10.4067/S0716-97602012000100001
- Lambert JD, Elias RJ (2010) The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 501:65–72. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.013
- Li Y, Huang Y, Piao Y, et al (2013) Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis. *Reprod Biol Endocrinol* 11:23. doi: 10.1186/1477-7827-11-23
- Li Y-C, Hu X-Q, Xiao L-J, et al (2006) An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism. *Front Biosci J Virtual Libr* 11:2465–2482.
- Manku G, Culty M (2015) Dynamic changes in the expression of apoptosis-related genes in differentiating gonocytes and in seminomas. *Asian J Androl* 17:403.
- Martin OV, Shialis T, Lester JN, et al (2008) Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. *Environ Health Perspect* 116:149–158.
- Mata-García LE, Chávez-Ocaña S (2013) Síndrome de prune belly: revisión de literatura a propósito de un caso. *Rev Hosp Jua Mex* 80:134–137.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660–671.
- Meng Q, Velalar CN, Ruan R (2008) Effects of epigallocatechin-3-gallate on mitochondrial integrity and antioxidative enzyme activity in the aging process of human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 44:1032–1041. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.023
- Nation T r., Buraundi S, Farmer P j., et al (2011) Development of the Gubernaculum During Testicular Descent in the Rat. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* 294:1249–1260. doi: 10.1002/ar.21393
- Neill JD, Knobil E (eds) (2006) Knobil and Neill's physiology of reproduction. Vol. 1: [...], 3.ed. Elsevier/Academic Press, Amsterdam
- Nightingale SS, Western P, Hutson JM (2008) The migrating gubernaculum grows like a "limb bud." *J Pediatr Surg* 43:387–390. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2007.08.016

- Noori S (2012) An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *J Clin Cell Immunol*. doi: 10.4172/scientificreports.413
- O'Donnell L (2015) Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*. doi: 10.4161/21565562.2014.979623
- Parekattil SJ, Agarwal A (eds) (2012) *Male Infertility*. Springer New York, New York, NY
- Paul C, Teng S, Saunders PTK (2009) A Single, Mild, Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death. *Biol Reprod* 80:913–919. doi: 10.1095/biolreprod.108.071779
- Radicioni AF, Anzuini A, De Marco E, et al (2005) Changes in serum inhibin B during normal male puberty. *Eur J Endocrinol* 152:403–409. doi: 10.1530/eje.1.01855
- Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R (2014) Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1839:155–168. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.08.004
- Rey RA (2014) Mini-puberty and true puberty: differences in testicular function. *Ann Endocrinol* 75:58–63. doi: 10.1016/j.ando.2014.03.001
- Roychoudhury S, Agarwal A, Virk G, Cho C-L (2017) Potential role of green tea catechins in the management of oxidative stress-associated infertility. *Reprod Biomed Online* 34:487–498. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.02.006
- Schatten H, Constantinescu GM (2008) *Comparative reproductive biology*. John Wiley & Sons
- Shaha C, Tripathi R, Mishra DP (2010) Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 365:1501. doi: 10.1098/rstb.2009.0124
- Sharangi AB (2009) Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Res Int* 42:529–535. doi: 10.1016/j.foodres.2009.01.007
- Tamanini C, Basini G, Grasselli F, Tirelli M (2003) Nitric oxide and the ovary. *J Anim Sci* 81:E1–E7.
- Thorup J, McLachlan R, Cortes D, et al (2010) What is new in cryptorchidism and hypospadias—a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. *J Pediatr Surg* 45:2074–2086. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2010.07.030
- Thundathil J, Rajamanickam G, Kastelic J, Newton L (2012) The Effects of Increased Testicular Temperature on Testis-Specific Isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in Sperm and its Role in

- Spermatogenesis and Sperm Function. *Reprod Domest Anim* 47:170–177. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02072.x
- Tower J (2012) Stress and stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1:789–802. doi: 10.1002/wdev.56
- Tremellen K (2008) Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14:243–258. doi: 10.1093/humupd/dmn004
- Tripathi UK, Chhillar S, Kumaresan A, et al (2015) Morphometric evaluation of seminiferous tubule and proportionate numerical analysis of Sertoli and spermatogenic cells indicate differences between crossbred and purebred bulls. *Vet World* 8:645–650. doi: 10.14202/vetworld.2015.645-650
- Turner TT, Lysiak JJ (2008) Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction. *J Androl* 29:488–498. doi: 10.2164/jandrol.108.005132
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S (2013) Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *Int J Environ Res Public Health* 10:3886–3907. doi: 10.3390/ijerph10093886
- Viguera-Villaseñor RM, Molina-Ortiz D, Reyes-Torres G, et al (2009) Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta Histochem* 111:127–137. doi: 10.1016/j.acthis.2008.05.004
- Viguera-Villaseñor RM, Montelongo-Solís P, Chávez-Saldaña MD, et al (2013) Postnatal testicular development in the Chinchilla rabbit. *Acta Histochem* 115:677–685. doi: 10.1016/j.acthis.2013.02.004
- Viguera-Villaseñor RM, Ojeda I, Gutierrez-Pérez O, et al (2011) Protective effect of α -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism: α -Tocopherol and cryptorchidism. *Int J Exp Pathol* 92:131–139. doi: 10.1111/j.1365-2613.2010.00757.x
- Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, et al (2007) Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr* 96:611–616. doi: 10.1111/j.1651-2227.2007.00241.x
- Widlak W, Vydra N (2017) The Role of Heat Shock Factors in Mammalian Spermatogenesis. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 222:45–65. doi: 10.1007/978-3-319-51409-3_3
- Yang F, Oz HS, Barve S, et al (2001) The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- κ B activation by inhibiting I κ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol Pharmacol* 60:528–533.

Yang Q-E, Oatley JM (2014) Spermatogonial Stem Cell Functions in Physiological and Pathological Conditions. In: Current Topics in Developmental Biology. Elsevier, pp 235–267

Yu P-L, Pu H-F, Chen S-Y, et al (2010) Effects of catechin, epicatechin and epigallocatechin gallate on testosterone production in rat leydig cells. J Cell Biochem 110:333–342. doi: 10.1002/jcb.22541

Zhang Y, He Q, Dong J, et al (2016) Effects of epigallocatechin-3-gallate on proliferation and differentiation of mouse cochlear neural stem cells: Involvement of PI3K/Akt signaling pathway. Eur J Pharm Sci 88:267–273. doi: 10.1016/j.ejps.2016.03.017

ANEXOS

I. Índice Histopatológico (Vigueras et al., 2009)

Valor	Daño observado
1	Plegamiento de 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

II. Índice de Maduración (Johnsen 1970).

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



EFFECTO DE LA
EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO
SOBRE LAS ALTERACIONES
PRODUCIDAS EN LA
CRIPTORQUIDIA EXPERIMENTAL

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 10 del mes de octubre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MERLINDA BONILLA JAIME
DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR
DRA. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA
DRA. EDITH ARENAS RIOS

Bajo la presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: TANIA JIMENEZ CABRERA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



TANIA JIMENEZ CABRERA
ALUMNA

LIC. JULIO CÉSAR DE LANA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALGUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

VOCAL

DRA. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA

SECRETARIA

DRA. EDITH ARENAS RIOS