

Efecto de la criptorquidia provocada sobre el parénquima de los testículos en ratones Balb/c

Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba, Facultad No. 2

Jaqueline Cuevas Cedré¹, Ramón E. García Rodríguez², Rosa Elena Navarro Alemán³, Janet Jordán Pita⁴, Judith Cuba Marrero⁵

¹Máster Atención Integral al Niño, Especialista de 1er. Grado en Embriología Humana, Profesor Instructor. ² Doctor en Ciencias Biomédicas, Especialista de 2do. Grado en Embriología Humana, Profesor Titular. ³Especialista de 1er. Grado en Embriología Humana, Profesor Instructor. ⁴Máster Atención Integral al Niño, Especialista de 1er. Grado en Embriología Humana, Profesor Instructor. ⁵Máster en Medicina Natural y Tradicional, Especialista 1er. Grado en Embriología Humana, Profesor Instructor.

RESUMEN

Objetivos: Determinar las características morfométricas de algunas modificaciones macroscópicas y microscópicas que ocurren en el testículo criptorquídico, comparadas con testículos normales en ratones Balb/c.

Método: Estudio experimental de una criptorquidia unilateral provocada en 36 ratones Balb/c machos, adultos, con peso medio de 25 ± 1 g, manteniendo el agua y alimento *ad libitum*. Se estudiaron las alteraciones macroscópicas (peso y volumen) y microscópicas a nivel del epitelio germinativo de la pared de los túbulos seminíferos y las células de Leydig.

Resultados: El peso y volumen de los testículos normales fluctuó cerca del valor medio, mientras que en los criptorquídicos se apreció una disminución, más acentuada a partir de la segunda semana, aunque sin diferencias estadísticas significativas. El número de células de Sertoli y células germinativas disminuyó significativamente en los testículos criptorquídicos con relación al normal ($p < 0,01$ para ambas), mientras que las células de Leydig no mostraron variaciones.

Conclusiones: En el testículo criptorquídico se encontraron modificaciones cuantitativas de las células de Sertoli y las germinativas como resultado de la reacción a la temperatura corporal. Las principales alteraciones observadas se produjeron entre la primera y segunda semana del experimento. No se encontraron cambios en las células de Leydig, así como tampoco en el peso y volumen de los testículos criptorquídicos en comparación con los normales, lo cual podría atribuirse al corto periodo de observación establecido.

Palabras clave: Desarrollo embrionario; Gónadas; Anatomía & Histología, Células de Sertoli

INTRODUCCIÓN

Los testículos como los ovarios tienen doble función. Por una parte, producen células sexuales masculinas y, por otra, la hormona testosterona, por lo que se clasifican como glándulas mixtas. Los testículos humanos son ovoides y en conjunto los dos pesan entre 25 y 75 g (1), aunque, Ukhov Y (2) plantea, que en estado fresco, sin fijar, el peso oscila entre 36 y 50 g en el hombre adulto. La determinación del volumen de los testículos es imprescindible para completar el estudio morfológico y estereológico de dichas glándulas sexuales (3).

Los lobulillos testiculares constituyen la unidad morfofuncional del órgano por medio del cual se organiza el parénquima. Los túbulos seminíferos en forma de asa, al llegar al mediastino, se anastomosan para formar los tubos rectos que se conectan a su vez con la red testicular. Dichos túbulos están rodeados de tejido intersticial formado por tejido conectivo alveolar laxo, que contiene las células intersticiales de Leydig con función endocri-

na (1, 3, 4). Por dentro de la membrana basal, poseen dos tipos de células principales, los sustentocitos y las espermatogonias, estas últimas en diferentes estadios de maduración. Solo las espermatogonias y las células de sostén hacen contacto con la membrana basal. Las espermatogonias representan el punto de partida de la espermatogénesis (1-4, 5).

Las células espermatogénicas son sensibles a la acción de muchos agentes, en particular, a las altas temperaturas, por lo que para la producción de espermatozoides es necesario que en el escroto la temperatura sea menor a la corporal.

Normalmente los testículos descienden al escroto hacia el final de la vida intrauterina, pero en el 1-2% de los varones recién nacidos, el descenso es incompleto (1, 3, 6). La retención se denomina criptorquidia (del vocablo *kriptos* que significa oculto) y lleva a atrofia de los túbulos seminíferos, si el descenso no ocurre espontáneamente o se corrige por cirugía. La fiebre prolongada puede disminuir la fertilidad (6, 7).

La criptorquidia experimental en ratones constituye un

biomodelo adecuado para el estudio de las alteraciones del complejo celular Sertoli-Leydig-Germinal (5). El daño celular está relacionado con factores físicos, químicos, hormonales y además con el tiempo en que los testículos están sometidos a las condiciones abdominales (8).

Estudios experimentales de criptorquismo en ratas (9, 10) encuentran cambios en la estructura de los complejos de unión de las células de Sertoli a los siete días después de la operación, los cuales terminaron con la formación de grandes vacuolas, distribuidas en la parte basal de las células en el límite entre las células (complejos de unión), y que surgieron, según parece, como resultado del aumento o ensanchamiento del espacio intercelular.

Investigaciones realizadas por Setchell y colaboradores (11), y Mains y Waits (12), demuestran que la espermatogénesis exige determinado régimen de temperatura. Consideran óptima, entre 4 y 5 grados centígrados por debajo de la temperatura del cuerpo del animal. Es conocido que un ligero aumento de la temperatura alrededor del testículo conlleva a la detención de la espermatogénesis y puede terminar en una atrofia irreversible del órgano. Trabajos consultados estudian la acción del dietilestilbestrol (DES), un estrógeno sintético utilizado con frecuencia en mujeres embarazadas, entre los años 1940-1970, el cual actúa sobre los órganos reproductores de las hembras durante el desarrollo prenatal. La acción de este compuesto durante el desarrollo prenatal en varones, pone de relieve la presencia de anomalías del sistema urogenital, entre ellas, un alto porcentaje de producción de criptorquidia. Refieren autores consultados (13), que la diabetes gestacional constituye también un factor de riesgo para la aparición de criptorquidia.

Dado el conocimiento limitado del problema planteado, los resultados variables obtenidos en estudios experimentales y por las complicaciones que la afección puede provocar en el individuo como infertilidad, degeneración maligna y repercusiones psicológicas (13-15), se realizó el presente trabajo cuyo objetivo fue determinar las características morfométricas de algunas modificaciones macroscópicas y microscópicas que ocurren en el testículo criptorquídico, comparadas con testículos normales en ratones Balb/c.

SUJETOS Y MÉTODOS

Estudio experimental de una criptorquidia unilateral. Se utilizaron 36 ratones Balb/c machos, adultos, con peso medio de 25 ± 1 g, manteniendo el agua y alimento *ad libitum*. Durante la investigación los animales se conservaron en un local con temperatura controlada a 22°C y humedad relativa de 60%, según normas para esta especie, colocándose tres animales por caja tipo T2, que garantiza mayor espacio por animal. Todo el proceso de investigación se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), de Santiago de Cuba.

El estudio consistió en la colocación permanente del testículo derecho dentro de la cavidad abdominal, dejando el testículo izquierdo libre como control. Para la operación se aplicó anestesia con tiopental a dosis de 30mg/Kg de peso, por vía intraperitoneal, calculado para una media de 25 g de peso por ratón, lo cual corresponde a una dosis aproximada de 0,75 mg por animal. A continuación, se introdujo manualmente el testículo derecho en el abdomen y se realizó un punto de sutura del canal inguinal a nivel de la raíz del escroto, para mantenerlo todo el tiempo a la temperatura corporal, el testículo izquierdo permaneció libre en la bolsa escrotal.

Las muestras de los testículos se tomaron diariamente a partir de las 24 horas siguientes a la operación, a razón de tres animales por día. Después de los 10 días, solo se tomó los días 12 y 15. El sacrificio de los animales se realizó por medio de narcosis con vapores de cloroformo. Los testículos fueron colocados inmediatamente en una mezcla fijadora durante dos horas, formada por: Formol 10% (9 mL), alcohol 96° (3 mL) y ácido acético glacial (1 mL).

La inclusión se realizó mediante la técnica clásica de la parafina, los cortes histológicos de 6 - 7 μ m, fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

Para el estudio de las posibles alteraciones macroscópicas, ambos testículos se pesaron en una balanza analítica Wetterh-80 con precisión de 0,001 mg. Para el cálculo del volumen se midieron en centímetros los ejes mayor y menor, utilizando un pie de Rey. Se utilizó la fórmula: $V = \pi D \cdot d^2$, donde "D" es el diámetro mayor y "d" el menor (2).

Para determinar las alteraciones microscópicas se analizaron tres túbulos seminíferos, cortados transversalmente, y lo más redondo posible, en cada uno de los días, y en cada uno de los tres animales de la muestra, para un total de nueve túbulos seminíferos por día. Se calculó, además, el índice celular de Sertoli (cantidad de células de Sertoli observadas en las secciones transversales de cada túbulo), la cantidad de células germinativas y el número de células de Leydig correspondiente a cada túbulo seminífero.

Para el análisis de los datos se calculó la media aritmética, desviación estándar (DS) y el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta la dinámica del peso de los testículos normales y criptorquídicos, en los normales, el peso fluctuó cerca del nivel medio, mientras que en los criptorquídicos se evidenció una disminución por debajo del nivel medio a partir de la segunda semana de la investigación que continuó hasta el final del estudio, aunque las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas (tabla 1).

Según la dinámica de volumen de ambos testículos, en los normales fluctuó también cerca del nivel medio y en

Tabla 1. Peso en gramos de los testículos normales y criptorquídicos en ratones Balb/c

Días	Testículos normales X ± DS	Testículos criptorquídicos X ± DS
1	0,081 ± 0,016	0,079 ± 0,001
2	0,068 ± 0,002	0,073 ± 0,002
3	0,068 ± 0,004	0,075 ± 0,004
4	0,067 ± 0,006	0,063 ± 0,006
5	0,071 ± 0,007	0,058 ± 0,012
6	0,063 ± 0,006	0,053 ± 0,012
7	0,057 ± 0,006	0,057 ± 0,015
8	0,057 ± 0,008	0,051 ± 0,057
9	0,067 ± 0,006	0,050 ± 0,010
10	0,062 ± 0,007	0,036 ± 0,003
12	0,059 ± 0,006	0,031 ± 0,007
15	0,056 ± 0,001	0,031 ± 0,003
X ± DS General	0,064 ± 0,007	0,054 ± 0,016

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar.

los criptorquídicos se observó una disminución la cual fue más evidente a partir de la segunda semana, aunque sin diferencias estadísticas significativas (tabla 2).

En los testículos normales el número de células de Sertoli fluctuaron alrededor de la media general durante todo el periodo de observación y en el criptorquídico, la tendencia general fue a la disminución progresiva alcanzando cifras inferiores al nivel medio a partir de la segunda semana ($p < 0,01$) (tabla 3).

Al analizar el comportamiento de las células germinativas en ambos testículos, en los normales, el número de

Tabla 2. Volumen (mm^3) de los testículos normales y criptorquídicos en ratones Balb/c

Días	Testículos normales X ± DS	Testículos criptorquídicos X ± DS
1	0,062 ± 0,004	0,057 ± 0,007
2	0,070 ± 0,006	0,064 ± 0,008
3	0,062 ± 0,012	0,062 ± 0,010
4	0,062 ± 0,005	0,065 ± 0,0001
5	0,069 ± 0,008	0,054 ± 0,004
6	0,067 ± 0,014	0,052 ± 0,006
7	0,069 ± 0,009	0,056 ± 0,006
8	0,065 ± 0,012	0,052 ± 0,002
9	0,071 ± 0,015	0,047 ± 0,007
10	0,055 ± 0,006	0,035 ± 0,003
12	0,057 ± 0,004	0,042 ± 0,003
15	0,046 ± 0,003	0,019 ± 0,000
X ± DS General	0,062 ± 0,007	0,050 ± 0,013

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar.

células tuvo muy poca variación con respecto a la media general, fluctuando muy cerca de la misma. En los testículos criptorquídicos la dinámica mostró una tendencia general a la disminución, principalmente durante la primera semana, con cifras inferiores a la media general a partir de la segunda.

El número de células de Leydig, tanto en el testículo normal como criptorquídico, presentaron una dinámica de comportamiento similar con variaciones mínimas en relación con la media general (tabla 5).

Tabla 3. Número de células de Sertoli en los túbulos seminíferos en testículos normales y criptorquídicos en ratones Balb/c

Días	Testículos normales X ± DS	Testículos criptorquídicos X ± DS
1	3,60 ± 0,54	4,00 ± 1,00
2	3,80 ± 0,83	2,80 ± 0,83
3	4,80 ± 1,64	2,00 ± 0,00
4	4,40 ± 0,89	1,40 ± 0,54
5	4,20 ± 1,30	1,60 ± 0,54
6	3,60 ± 0,89	1,20 ± 0,44
7	4,40 ± 1,14	1,20 ± 0,44
8	3,80 ± 0,83	0,6 ± 0,54
9	4,60 ± 1,14	0,40 ± 0,54
10	4,80 ± 2,04	0,20 ± 0,44
12	5,80 ± 0,74	0,40 ± 0,48
15	5,20 ± 0,74	0,00 ± 0,00
X ± DS General	4,41 ± 0,67	1,31 ± 1,17

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar; $p < 0,01$.

Tabla 4. Número de células germinativas en la pared de los túbulos seminíferos en testículos normales y criptorquídicos en ratones Balb/c.

Días	Testículos normales X ± DS	Testículos criptorquídicos X ± DS
1	34,20 ± 4,494	33,80 ± 3,56
2	35,20 ± 1,788	27,60 ± 1,14
3	31,00 ± 10,29	27,20 ± 3,70
4	37,20 ± 4,43	24,80 ± 3,11
5	36,60 ± 3,84	23,20 ± 4,08
6	32,60 ± 5,02	23,20 ± 3,42
7	39,20 ± 3,84	21,40 ± 2,40
8	35,80 ± 3,34	14,20 ± 3,96
9	36,60 ± 7,63	17,20 ± 1,78
10	32,40 ± 2,07	13,00 ± 2,23
12	33,00 ± 1,41	16,00 ± 1,41
15	34,20 ± 2,31	14,80 ± 1,16
X ± DS General	34,83 ± 2,36	21,36 ± 6,44

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar; $p < 0,01$.

Tabla 5. Número de células de Leydig en testículos normales y criptorquídicos en ratones Balb/c

Días	Testículos normales X ± DS	Testículos criptorquídicos X ± DS
1	32,20 ± 7,15	23,00 ± 8,36
2	25,00 ± 3,60	28,60 ± 8,93
3	29,00 ± 5,78	28,40 ± 10,01
4	29,20 ± 8,87	24,00 ± 5,78
5	34,00 ± 7,12	27,60 ± 3,64
6	25,40 ± 8,08	25,80 ± 8,28
7	28,00 ± 7,64	27,00 ± 6,20
8	21,00 ± 2,73	23,60 ± 11,69
9	21,20 ± 4,96	26,60 ± 6,30
10	25,80 ± 6,97	29,80 ± 3,11
12	33,00 ± 1,41	23,40 ± 2,15
15	29,60 ± 1,01	23,00 ± 1,41
X ± DS General	27,76 ± 4,28	26,16 ± 2,36

Leyenda: X: media; DS: desviación estándar.

DISCUSIÓN

Diversas son las formas de estudiar el desarrollo normal de los testículos en el humano, con el empleo de técnicas modernas y variadas que también se utilizan para analizar las alteraciones patológicas y desviaciones del desarrollo de estas gónadas.

Amakasu y colaboradores (7) encuentran que los testículos no descendidos solo poseen el 20% del peso de los testículos normales. En el presente estudio, aunque se observaron algunas variaciones entre el peso y volumen de los testículos criptorquídicos en comparación con los normales, las diferencias encontradas no fueron significativas, lo cual sugiere la necesidad de extender el tiempo de observación partiendo del hecho que esta glándula, en los casos de criptorquidia, sufre fibrosis y se atrofia, con la consiguiente desaparición de los componentes celulares intramurales de los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli cumplen diversas funciones, entre ellas, sirven de sostén y son responsables de la nutrición y transformación de las células germinativas hasta espermatozoides. En este trabajo se observó desde los primeros siete días, una disminución de la cifra hasta 1,2 lo cual representa un 70% con respecto al primer día, ya en el tercer día, es decir, a las 72 horas, las cifras habían disminuido hasta la mitad. No obstante, se plantea que las células de Sertoli son muy resistentes al calor. En

este trabajo tampoco se observaron, durante la primera semana después de la operación, los cambios estructurales encontrados por otros investigadores en estas células (9, 10).

En concordancia con lo notificado en otros estudios (7), en este la mayor disminución de las células germinativas se produjo en la primera semana, con una diferencia de 12,4 correspondiente al 37% con respecto a las cifras iniciales. Algo muy diferente sucedió durante la segunda semana en que las cifras se mantuvieron algo por debajo de la media general. Las diferencias encontradas, al comparar los testículos normales y criptorquídicos corroboran que la temperatura corporal influye de forma negativa sobre estas células desde los primeros momentos.

Aunque existen criterios variados en cuanto a la evaluación funcional de los testículos desde el punto de vista morfológico, los endocrinocitos o células intersticiales de Leydig, constituyen un indicador simple de la actividad endocrina que incluye la determinación de su cantidad, la proporción de los diferentes tipos morfofuncionales de estas células, así como el tamaño de los núcleos. Puede incluir además, el tamaño del área ocupada por las células del Leydig con relación al área ocupada por los túbulos seminíferos. En la presente investigación solo se determinó la cantidad de células de Leydig las cuales se comportaron de manera muy semejante, con variaciones mínimas con respecto a la media general, en el testículo normal y criptorquídico. Diferentes investigadores (3-5), al estudiar las células de Leydig en los testículos criptorquídicos, encuentran cambios histopatológicos como hipoplasia acompañados de disminución de la fertilidad. Este hallazgo ratifica la necesidad de extender el estudio de los testículos no descendidos, además de incluir observaciones ultraestructurales.

CONCLUSIONES

En el testículo criptorquídico se encontraron modificaciones cuantitativas de las células de Sertoli y las germinativas como resultado de la reacción a la temperatura corporal. Las principales alteraciones observadas se produjeron entre la primera y segunda semana del experimento. No se encontraron cambios en las células de Leydig, así como tampoco en el peso y volumen de los testículos criptorquídicos en comparación con los normales, lo cual podría atribuirse al corto periodo de observación establecido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Geneser F. *Histología*. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 565-79.
2. Ukhov Y. Los métodos morfológicos en la evaluación del estado funcional de los testículos. *Arkh Anatom Histol Embriol*. 2004;84(3):66-72.
3. Robert NM, Martin LJ, Tremblay JJ. The orphan nuclear receptor NR4A1 regulates insulin-like 3 gene transcription in Leydig cells. *Biol Reprod*. 2006;74:322-330.
4. Mathers MJ, Sperling H, Rübber H, Roth S. The undescended testis: Diagnosis, treatment and long-term consequences. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(33):527-532.

5. Sadeghian H, Anand-Ivell R, Balvers M, Relan V, Ivell, R. Constitutive regulation of the *Insl3* gene in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;241:10-20.
6. Virtanen HE, Cortes D, Rajpert-De Meyts E, et al. Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. *Acta Paediatr.* 2007;96:622-627
7. Amakasu K, Suzuki K, Suzuki H. Rat: A new mutant strain associated with unilateral renal agenesis, cryptorchidism, and malformations of reproductive organs restricted to the left side. *Comp Med.* 2009;59(3):249-256.
8. Welsh M, Philippa TK, Saunders MF, Hayley M. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1479-1490.
9. Kerr J, Rich K, de Kretser O. Effects of experimental cryptorchidism on the ultrastructure and function of the Sertoli cell and peritubular tissue of rat testis. *Biol Reprod.* 2010;21:813-38.
10. Bergh A, Soder O. Studies on cryptorchidism in experimental animal models. *Acta Paediatr.* 2007;96:617-621.
11. Setchell B, Voglmayr J, Waites G. A blood testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph. *J Physiol.* 2008;200:73-85.
12. Mains S, Waits J. The blood-testis barrier and temperature damage to the testis of the rat. *J Reprod Fertil.* 2004;51:439-50.
13. Herrington LJ, Zhao W, Husson G. Management of cryptorchidism and risk of testicular cancer. *Am J Epidemiol.* 2003;157:602-605.
14. Vialat Soto V, Labrada Arjona E, de la Rosa Rodríguez R, Gámez Fonts LN. Ectopia testicular perineal: presentación de un caso. *Rev Cub Pediatr.* 2009;80(3).
15. Büllesbach EE, Boockfor FR, Fullbright G, Schwabe C. Cryptorchidism induced in normal rats by the relaxin-like factor inhibitor. *Reproduction.* 2008;135:351-355.

The effect of cryptorchidism provoked on Balb/c mice´s testicles parenchyma

SUMMARY

Objective: To determine the morphometric characteristics of some macroscopic and microscopic modifications which occur in the cryptorchid testicles compared to normal testicles in Balb/c mice.

Method: An experimental study of a unilateral cryptorchidism provoked in 36 Balb/c mice, male, adults, with medium weight 25 ± 1 g, maintaining water and food at libitum. Macroscopic (weight and volume) and microscopic alterations at the germinal epithelium level of the semiferous tubules wall and Leydig cells were studied.

Results: The weight and volume of normal testicles fluctuated around the medium value, whereas, in the cryptorchid ones, a more significant decrease was found, starting from the second week, although there were no substantial statistic differences. The number of Sertoli and germinal cells diminished considerably in cryptorchid testicles with regard to those normal ($p < 0,01$ for both), while Leydig cells showed no variations.

Conclusions: Qualitative modification of Sertoli and germinal cells were found in the cryptorchid testicles, what demonstrates there is some grade of reaction of these structures to corporal temperature. The principal alterations observed occurred between the first and second weeks of the experiment.

Changes were not found in Leydig cells, nor in weight and volume either in cryptorchid testicles compared to the normal ones, what may possibly be imputed to the observation period briefness.

Key words: Embryonic Development; Gonads; Anatomy & Histology; Sertoli Cells.

Dirección para la correspondencia: Dra. Jaquelin Cuevas Cedré. Calle 8 # 26 altos, entre 2 y 3 Reparto Fomento, Santiago de Cuba, Cuba. C.P. 90900.
Correo electrónico: jaqueline.cuevas@medired.scu.sld.cu