

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Cambios de la Expresión del
Receptor de Andrógenos en las
Células de Sertoli desde la Infancia
hasta la Involución Senil del
Hombre Normal y en Patologías
Congénitas Testiculares**

TESIS DOCTORAL

Elia Dina Galo García

Madrid, 14 de octubre de 2007



MARÍA DEL PILAR GONZÁLEZ-PERAMATO GUTIÉRREZ, DOCTORA EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y MÉDICO FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID

JAVIER FRANCISCO REGADERA GONZÁLEZ, PATÓLOGO Y PROFESOR TITULAR DE HISTOLOGÍA HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID y

MANUEL NISTAL MARTÍN DE SERRANO, CATEDRÁTICO DE HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DE SERVICIO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID

CERTIFICAN QUE: Dña. **ELIA DINA GALO GARCÍA**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación "**Cambios de la Expresión del Receptor de Andrógenos en las Células de Sertoli desde la Infancia hasta la Involución Senil del Hombre Normal y en Patologías Congénitas Testiculares**", estudio que consideramos completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid

Lo que firmamos en Madrid a 14 de octubre de 2007

Fdo.: Pilar González-Peramato
Directora

Fdo.: Javier Regadera
Director

Fdo.: Manuel Nistal
Director

Fdo.: Carlos Sentís
Tutor y Profesor Titular del Departamento de Biología UAM

DEDICATORIA:

A mi abuela **Gregoria** y a mi padre **Eleazar**, *in memoriam*,
por su ejemplo constante de honradez

A mi madre **María Adela**, a mis hijos **Edgar** y **María Alejandra**

a mi marido **Carlos**

fuentes de equilibrio y bienestar emocional; ellos me han hecho ver que la lucha por un futuro mejor no debe ser una utopía, y que lo importante no es alcanzar las metas sino cómo llegamos a ellas

AGRADECIMIENTOS:

a la Dra. **Pilar González-Peramato**, por su excelente ayuda en el diagnóstico de los casos y críticas constructivas en la evaluación de los resultados

al Prof. **Javier Regadera**, por sus enseñanzas y sobre todo por su amistad, y por su constante apoyo académico a la UNAN-León y al pueblo de Nicaragua

al Prof. **Manuel Nistal**, por su magisterio en la histofisiología y patología del testículo humano y por su generosa cesión de las biopsias testiculares estudiadas

a la Prof. **Ángeles Juarranz**, por sus enseñanzas metodológicas y conceptuales en Biología Celular, por su sincera amistad y sobretodo porque, con su ciencia y saber estar en la vida familiar y universitaria, es el buen ejemplo en el que se deben reflejar las mujeres

al Prof. **Carlos Sentis**, por su loable actitud académica al orientarme en el mis cominezos del estudio de la Genética y de la Biología Celular

a la Dra. **María De Miguel**, por sus excelentes críticas científicas en la interpretación de los datos moleculares

a la Lic. **Pilar López Iglesias**, por su dedicación en el diseño específico de los métodos de PCR

a Dña. **Carmen Sánchez-Palomo**, por su calidad humana y excelente trabajo inmunohistoquímico

a Dña. **Pilar Embid** y a Dña. **M^a Ángeles Cuevas**, por su riguroso esfuerzo metodológico en la detección del receptor de andrógenos en tejidos humanos

a Dña. **Fátima Domínguez Timón**, por su excelente ayuda técnica en métodos moleculares

a **mis Amigos Nicaragüenses y Españoles**, por su confianza y por compartir conmigo los buenos y malos momentos

a todos los **Profesores del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN-León**, por su colaboración diaria y compañerismo

a las **Autoridades Académicas de la UNAN-León y de la UAM-Madrid**, gracias a cuyo generoso esfuerzo y al Convenio Bilateral entre ambas Universidades ha sido posible culminar esta Tesis Doctoral

INTRODUCCIÓN	1
ESTRUCTURA DEL TESTÍCULO: SU REGULACIÓN HORMONAL, PARACRINA Y AUTOCRINA	1
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS	7
DESARROLLO TESTICULAR NORMAL Y SU REGULACIÓN HORMONAL	9
PATOLOGÍA TESTICULAR	11
<i>Mutación del RA y Fertilidad</i>	11
<i>Receptor de Andrógenos y Envejecimiento Testicular</i>	13
<i>Receptor de Andrógenos y Alteraciones del Desarrollo Testicular</i>	15
<i>Receptor de Andrógenos y Criptorquidia</i>	17
<i>Receptor de Andrógenos y Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos</i>	18
<i>Receptor de Andrógenos y Síndrome de Klinefelter</i>	23
FINALIDADES DEL PRESENTE ESTUDIO	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	30
MATERIAL	31
MÉTODOS	33
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	33
Fijación de las Piezas	33
<i>Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas</i>	33
<i>Método Inmunohistoquímico para la Detección del Receptor de Andrógenos</i>	34
<i>Métodos Morfométricos</i>	35
Valoración Microdensitométrica de la Expresión del RA	35
<i>Método de PCR para la Detección de Alteraciones Moleculares del RA</i>	37
Método Tradicional de Extracción de DNA	37
Método de PCR para el Receptor de Andrógenos	38
<i>Métodos Estadísticos</i>	39
<i>Técnicas Fotográficas</i>	39
RESULTADOS	40
EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RA	41
EVALUACIÓN MICRODENSITOMÉTRICA DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RA	42

DETECCIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS MEDIANTE MÉTODOS DE PCR	53
FIGURAS	56
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	101
RESUMEN	104
SUMMARY	108
REFERENCIAS	112

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA DEL TESTÍCULO: SU REGULACIÓN HORMONAL, PARACRINA Y AUTOCRINA

El testículo humano está constituido por los tubos seminíferos y el intersticio testicular, el cual contiene abundantes vasos sanguíneos y linfáticos y células de Leydig, así como macrófagos, células cebadas,²¹¹ tejido conjuntivo laxo y terminaciones nerviosas. Los tubos seminíferos contienen células de la línea germinal y células de Sertoli. En los tubos seminíferos humanos están bien establecidos dos compartimentos celulares: un compartimento basal que contiene las espermatogonias y un compartimento adluminal que contiene el resto de células espermatogénicas. Estos dos compartimentos están separados por un triple filtro, formado por las células mioideas peritubulares, la lámina basal y las uniones entre las células de Sertoli, que constituye la denominada barrera hematotesticular, la cual regula el paso a la luz tubular de los nutrientes, las hormonas y los factores de crecimiento necesarios para la espermatogénesis.²⁸³ En el hombre, el mantenimiento de una espermatogénesis cuantitativamente normal es un proceso dependiente de andrógenos. El efecto de la testosterona sobre la espermatogénesis está mediado por las células de Sertoli, puesto que se han encontrado receptores de andrógenos (RA) en las células de Sertoli^{198,348} y no en las células germinales.

Se requiere la acción de la FSH para la regulación de la espermatogénesis y de la esteroidogénesis testicular.^{183,211} En el testículo de mamíferos, incluido el testículo humano, existe una íntima regulación paracrina que se establece fundamentalmente entre el epitelio seminífero y las células de Sertoli y entre éstas y las células de Leydig, aunque participan también en estos cambios paracrinos las células mioideas de la pared tubular y los macrófagos intersticiales.^{62,273} La espermatogénesis y la esteroidogénesis están reguladas, por tanto, por las hormonas hipofisarias y por un control paracrino intratesticular;^{19,65,235} de modo que las hormonas hipofisarias proporcionarían el estímulo básico del que dependen las funciones testiculares, mientras que la intensidad y el momento de la respuesta de las células testiculares a este estímulo estaría regulado por interacciones recíprocas entre las células de Sertoli y las células germinales, entre las células de Sertoli y las células de Leydig, y entre las células de Sertoli y las células mioideas peritubulares.²⁷³

Durante el ciclo del epitelio del túbulo seminífero humano, se han reconocido seis estadios madurativos correspondientes a las seis asociaciones de las células de la línea

germinal humana.⁴⁹ Estas asociaciones se han relacionado, en parte, con cambios morfológicos y funcionales de las células de Leydig peritubulares y de las células de Leydig intersticiales; a la vez que se correlacionan, en el hombre normal, con una inmunoexpresión de testosterona en las células de Leydig peritubulares mayor que en las intersticiales.²⁴¹ En el testículo humano, tanto las células de Leydig peritubulares como las células de Leydig intersticiales son de tamaño similar, y los cambios en el volumen de las células de Leydig peritubulares durante el ciclo del epitelio del tubo seminífero se deben a cambios en el número de células, pero el tamaño medio de ambos tipos de células de Leydig permanece constante durante todo el ciclo. Sin embargo, la afinidad para anticuerpos antitestosterona es mayor en las células peritubulares, lo que sugiere diferencias funcionales entre ambos tipos de células.²³¹ Además, se ha observado un aumento del número de células de Leydig peritubulares durante las fases I y II del ciclo asociado, a una disminución del número de células de Leydig intersticiales. Entre otras posibilidades, se puede especular que, en los estadios I y II del ciclo, las células de Leydig perivasculares dejarían el espacio intersticial y emigrarían a la túnica propia,²⁴¹ aumentando así el número de células de Leydig peritubulares y su contenido de testosterona. En los siguientes estadios de la espermatogénesis, muchas de las células de Leydig peritubulares involucionarían y su contenido en testosterona disminuiría.²³¹

En células de Leydig de rata, se ha encontrado que los niveles de LH y de RA son inferiores en las células de Leydig inmaduras que en las células de Leydig maduras adultas, lo que está en consonancia con la hipótesis de que las progenitoras de las células de Leydig de la rata son estimuladas por la LH y el RA.²⁹⁵ El hecho de que diferentes poblaciones de células del mismo tejido puedan responder a una determinada estimulación hormonal por diferentes vías, puede venir de la diferente actividad funcional de un determinado receptor hormonal específico;²⁰⁰ además, pueden existir múltiples regiones específicas en los sitios de transporte de la hormona a su receptor.²⁰⁰ Por ejemplo, las células responden al estradiol por tres mecanismos separados que incluyen la síntesis, la reutilización y el reciclaje;²⁰⁰ por el contrario, se ha visto que la progesterona presenta un incremento del control regulador negativo.²⁰⁰

Las células de Sertoli funcionalmente activas son absolutamente necesarias para la multiplicación y la maduración de las células germinales,⁶³ pero además, las células

germinales regulan la función cíclica de las células de Sertoli.²⁷³ Estas interacciones bidireccionales entre las células de Sertoli y las células germinales pueden establecerse por elementos de unión entre ambos tipos de células.²⁶⁸ La actividad funcional de las células de Sertoli, tanto humanas como de roedores, está también regulada por el estadio del ciclo espermatogénico. En la fase VII y VIII del ciclo de la rata, las células de Sertoli alcanzan su máxima secreción de proteína ligadora de andrógenos (ABP),²⁵⁹ de activador del plasminógeno³⁶² y de actividad de fosfodiesterasa,²³⁵ y la mínima estimulación por FSH de la producción de AMPc, con una mínima unión a FSH (I-125).²³⁵ Se han descrito también otros cambios ultraestructurales en la célula de Sertoli durante el ciclo del epitelio seminífero, principalmente acúmulo de gotas lipídicas,^{150,230} así como alteraciones en las uniones celulares.

Dado que las células de Sertoli y las células de Leydig se encuentran en dos compartimentos testiculares diferentes, es necesario que la testosterona sea una hormona difusible. La testosterona estimula la secreción de ABP³⁰⁸ en la célula de Sertoli, así como también la actividad de la RNA polimerasa.¹⁵⁹ El efecto regulador de la célula de Leydig sobre la célula de Sertoli podría estar mediado por algún péptido derivado de la propiomelanocortina (POMC).^{14,233} Uno de los factores de interacción paracrina entre las células de Leydig y las células de Sertoli serían los opioides testiculares,²³³ sintetizados por las células de Leydig, que tienen receptores específicos en las células de Sertoli. La célula de Sertoli respondería a la fijación de estos opioides en sus receptores con la síntesis y excreción de LHRH testicular. La demostración de receptores específicos de LHRH en las células de Leydig confirma el efecto local, o paracino de este péptido.²⁸ Es imprescindible que las células de Sertoli desarrollen completamente sus funciones normales para que se produzca la multiplicación y la maduración de las células germinales,²⁷³ lo que está favorecido por las diferentes productos de secreción de las células de Sertoli, que modulan la respuesta de las células de Leydig a la LH y HCG. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas esta regulación paracrina podría hacerse autónoma y estimular por sí sola, sin la acción de las gonadotropinas, una verdadera pubertad.²⁷³

Las células peritubulares proporcionan integridad estructural al tubo seminífero, son responsables de la contracción del mismo y actúan como una barrera inespecífica.²¹³ Además, las células mioideas peritubulares probablemente participen también en la

regulación de la función de la célula de Sertoli, a través de factores difusibles que estarían secretados por estas células mioideas.²⁷³ Es más, algunos de los efectos de la testosterona en los cultivos de células de Sertoli están mediados por las células mioideas que contaminan dichos cultivos.³⁰⁷

Los andrógenos son hormonas esteroideas secretadas primariamente por los testículos y las glándulas adrenales y desempeñan un papel crítico en la reproducción, coordinando diversas funciones fisiológicas que incluyen funciones cerebrales y procesos específicos de proliferación celular y de apoptosis.²⁶⁶ Los andrógenos son necesarios para la normal expresión del fenotipo masculino, ya que inducen el desarrollo de las características sexuales secundarias, así como la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis.⁵⁵ De hecho, los andrógenos son fundamentales en el desarrollo de la pubertad, de la fertilidad masculina y de la función sexual masculina.⁶⁹ Los dos andrógenos más importantes son la testosterona y la 5-alfadihidrotestosterona.³³ El desarrollo de una espermatogénesis normal exige una adecuada expresión y función de los andrógenos y de los RA.⁴² Para mantener una espermatogénesis correcta se necesitan niveles altos de testosterona intratesticular secretada por las células de Leydig, y esta testosterona es ofertada a los túbulos seminíferos uniéndose a la proteína transportadora de andrógenos (ABP). De este modo, la testosterona penetra en las células de Sertoli y se une a los receptores nucleares específicos del RA -un miembro de la superfamilia de receptores nucleares-,²⁶⁶ activando la síntesis y la secreción de proteínas y de otros factores de crecimiento que regulan la espermatogénesis; asimismo, facilita la meiosis e inhibe la apoptosis de las células germinales.⁶⁹

El mantenimiento de la espermatogénesis por la testosterona se realiza por las acciones directas de la FSH y de la LH que, a su vez, regulan la actividad de las células somáticas del testículo. La LH controla la producción de testosterona por las células de Leydig, mientras que la FSH actúa de forma indirecta a través de las células de Sertoli; esto es debido a que las células germinales carecen de receptores para esta hormona, por lo que la FSH influye indirectamente en la espermatogénesis.²⁹⁷ La activación de receptores esteroideos específicos, por medio de la traslocación reversible del complejo esteroide-receptor esteroideo hacia el núcleo -sitio donde se une al DNA-, provoca o inhibe la transcripción de determinados genes imprescindibles en la regulación funcional del testículo.

Algunos estudios realizados en primates no humanos y en el hombre no han conseguido encontrar una asociación entre el grado de relación del RA de las células de Sertoli y el estadio del epitelio seminífero;^{285,357} sin embargo, estudios previos realizados por nuestro grupo han confirmado una diferente expresión del RA en las células de Sertoli en las distintas fases del ciclo seminífero humano,³¹⁸ lo que permite relacionar el RA de forma muy directa con los mecanismos de la regulación que los andrógenos ejercen sobre la espermatogénesis.³²⁹ No obstante, la visualización de la inmunotinción del RA depende, entre otros, del tipo de anticuerpo anti-receptor de andrógenos utilizado; así, cuando se utiliza a altas concentraciones el anticuerpo anti-RA denominado PG21, todas las células positivas al RA del testículo humano presentan una intensa inmunotinción; al contrario, si disminuye la concentración de PG21, es posible distinguir diferente intensidad de inmunotinción del RA en los núcleos de las células de Sertoli relativamente próximos entre sí, mientras que no se aprecian variaciones del RA en las células mioideas peritubulares y, por el contrario, a bajas concentraciones de anticuerpo no se detecta RA en las células de Leydig. Es más, dentro del epitelio seminífero humano, la intensidad de la tinción de los núcleos de las células de Sertoli es menor en los estadios V y VI del ciclo del epitelio de los túbulos seminíferos, con respecto al estadio III; asimismo, en el estadio III, la intensidad de la tinción es mayor que en los estadios I y II. Por todo ello, se puede concluir que la expresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli humanas depende, al igual que ha sido previamente demostrado en roedores, de la función del ciclo del epitelio seminífero.³¹⁹

Los andrógenos participan en mecanismos de regulación no genómica en numerosas células somáticas. En muchas de estas células, los andrógenos producen señales de traducción que actúan sobre otros receptores de la superficie celular, los cuales regulan una gran variedad de funciones celulares.³⁶⁶ Además de esta vía alternativa de señalización mediada por andrógenos, los andrógenos pueden actuar por una vía clásica de estimulación del RA.³⁶⁶ De hecho, varios mensajeros secundarios pueden ser activados por los andrógenos, entre estos mensajeros se incluyen el AMPc, la fosfolipasa C y los iones de Ca^{++} .³⁶⁶ Cada uno de estos segundos mensajeros es capaz de activar múltiples quinasas, una de las más importantes regulada por los andrógenos es la denominada “cascada MAP quinasa”.³⁶⁶ Esta serie de reacciones quinasas son capaces de alterar la actividad de determinados factores de transcripción que están implicados directamente en la regulación de la expresión génica.³⁶⁶ En concreto, se ha demostrado que los andrógenos son capaces de

regular la expresión del gen CREB mediante la vía de las MAP quinasas, lo que ocurre en aquellas acciones de los andrógenos sobre las células de Sertoli que no dependen de regulación genómica. Esto es, en aquellas acciones que no dependen de las interacciones determinadas por los genes que codifican el RA.³⁶⁶ Esta regulación no clásica de la expresión génica en las células de Sertoli es particularmente relevante, ya que puede responder a la pregunta paradójica de por qué la testosterona puede mantener la espermatogénesis más allá de la regulación de los genes involucrados en la vía de acción del RA.³⁶⁶ Es más, esta acción no clásica en las células de Sertoli es un complemento necesario a la acción clásica para mantener una espermatogénesis completa.³⁶⁶

En definitiva si bien los andrógenos son innecesarios para mantener la vida, los andrógenos si son necesarios para la propagación de las especies y para el establecimiento y el mantenimiento de la cualidad masculina, así como para el soporte de su comportamiento, su función sexual y de la masa muscular.¹⁹² La testosterona actúa tanto como una hormona que como una pro-hormona; la testosterona actúa a través del RA y también por la vía de la 5- α -reductasa y curiosamente, activando la vía aromatasa, la testosterona se puede transformar en estrógeno y actuar mediante la estimulación de precursores de estrógenos.¹⁹² Pero además de dihidrotestosterona ligada, el receptor de estrógenos puede actuar como un inhibidor de la acción estrogénica.¹⁹² Por último, los productos del metabolismo androgénico pueden también participar en procesos regulatorios activos de hematopoyesis y en la regulación de ciertas enzimas hepáticas.¹⁹²

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

La acción de los andrógenos, principalmente testosterona y 5- α -dihidrotestosterona, está mediada por un receptor proteico específico denominado RA que es sintetizado por un gen localizado en el cromosoma X humano. Este receptor proteico es un miembro de la familia de receptores nucleares que modulan una gran variedad de procesos desde la embriogénesis hasta la vida adulta.⁹ El RA funciona como un factor de transcripción dependiente del ligando que regula la expresión de una gran variedad de genes diana, que son muy importantes en el desarrollo de la pubertad y de la fertilidad del varón.⁵⁵ En el testículo humano, el RA se expresa en las células de Sertoli, en las células de Leydig y en las células peritubulares.³⁶⁴ La forma no ligada del RA es una proteína citoplasmática que se transloca al núcleo, y es en el núcleo, en conjugación con otros factores de transcripción y

coactivadores, donde el RA regula la transcripción de genes diana que interactúan específicamente en múltiples procesos transcripcionales y post-transcripcionales.^{125,266} Recientemente, se ha establecido que el locus del gen del RA tiene un peso de 90 kilobases y ha sido localizado en la región q11-12 del cromosoma X humano.^{156,170} La organización genómica del RA tiene numerosos dominios estructurales de funciones específicas del RA, lo que determina un equilibrio entre los ligandos agonistas y los antagonistas en el movimiento intracelular del RA.²⁶⁶ De hecho, todos los andrógenos actúan a través de un único RA intracelular que es sintetizado por un gen simple del cromosoma X.²⁷⁵ El gen del RA es una secuencia repetitiva de DNA localizada en el exón 1 que codifica un tracto de poliglutamina.⁴² En concreto, la actividad del RA esta regulada por un trinucleótido CAG polimórfico que se repite en el gen del RA.¹⁰⁹ El gen del RA, localizado en el cromosoma X, codifica una proteína con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa.^{32,33} Sólo un RA puede identificar y unirse a estos dos diferentes ligandos, testosterona y 5-alfadihidrotestosterona.^{32,33} Estas acciones androgénicas están mediadas por la activación del RA que es un factor de transcripción nuclear que controla la regulación de numerosos genes.^{114,115}

Se han descrito un gran número de mutaciones de este gen en 2 diferentes exones: el 5 y el 7.^{31,32} Estas mutaciones pueden causar distintas anomalías fenotípicas del desarrollo sexual masculino,¹⁸⁶ desde fenotipo femenino hasta des-virilización o infertilidad masculina.^{186,373} En concreto, el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (AIS) es el resultado de una resistencia androgénica, causada por una alteración en los receptores de andrógenos, debida bien a una ausencia o bien a importantes anomalías cuantitativas o cualitativas.

La pérdida completa de la función del RA es la causa de distintos tipos de patologías genéticas incluyendo anomalías del RNAm Splicin.⁹ Se han encontrado alteraciones funcionales y moleculares del RA en hombres infértiles, cuando se investiga el RA en cultivos de fibroblastos de piel genital en pacientes con azoospermia idiopática o con oligospermia.³ Las variaciones genéticas dentro de esta cascada de eventos pueden interrumpir el normal desarrollo del varón y conducir a malformaciones de los genitales externos o internos.^{114,115} Además, existen dos tipos de patologías asociadas a anomalías funcionales y estructurales relacionadas con el RA: la denominada enfermedad de Kennedy

(también conocida bajo el nombre de atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA) -que será comentada posteriormente- y el cáncer de próstata.^{32,33}

DESARROLLO TESTICULAR NORMAL Y SU REGULACIÓN HORMONAL

La determinación sexual en mamíferos ocurre a tres niveles: a) la segregación de los cromosomas sexuales, que determinan el sexo cromosómico; b) la expresión del gen SRY del cromosoma Y, que induce la formación del testículo, lo cual es regulado por la hormona antimülleriana (AMH); y c) la síntesis de la testosterona que determinará el desarrollo y la maduración del tracto genital masculino y del fenotipo masculino de los genitales externos.⁷³

La diferenciación sexual masculina normal es el resultado de la interacción sincronizada de complejos mecanismos que depende de un estricto control genético y hormonal.^{114,115} La gónada bipotencial se origina en los tubérculos genitales, bajo el control de genes autosómicos que, así mismo, están involucrados en la formación de otros órganos,^{114,115} la progresión hacia un testículo diferenciado está mediada por la activación de genes autosómicos y gonosómicos que conducen a la diferenciación morfofuncional de las células de Sertoli y de las células de Leydig.^{114,115} Se ha descrito recientemente un incremento de alteraciones de la diferenciación sexual masculina que incluyen hipospadias, criptorquidia o micropenes y que se han relacionado con cambios químicos ambientales que afectan al desarrollo normal intrauterino del aparato reproductor masculino.³²² La diferenciación sexual masculina es un proceso que depende de la acción normal de los andrógenos y sobre todo del balance entre los niveles de andrógenos y de estrógenos.³²²

En la especie humana, los andrógenos participan en la diferenciación sexual prenatal y postnatal, en el desarrollo y mantenimiento de las características masculinas secundarias y durante la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis.^{32,33} Los andrógenos representan un papel imprescindible en el desarrollo fetal humano.²⁷⁵ Está bien establecido que en la especie humana, al igual que ocurre en otros mamíferos, las gónadas, los conductos genitales internos y las estructuras que constituyen los genitales externos, derivan de tejidos embriológicos con capacidad bipotencial, de modo que el desarrollo del genotipo masculino o femenino depende de una cascada de eventos que se inician ya desde la determinación del sexo genético, esto es, el sexo genético es el determinante de la diferenciación de la gónada primordial hacia un testículo o hacia un ovario, lo que se

denomina diferenciación gonadal.³⁰² Como previamente hemos comentado, el gen relacionado con el cromosoma Y, el denominado gen SRY, actúa como la señal inequívoca de la diferenciación testicular, pero además, el proceso de desarrollo testicular implica varias etapas controladas también por genes que no se localizan en el cromosoma Y, entre los que se encuentran el gen relacionado con el tumor de Wilms (Wtt1), el gen del factor esteroideogénico (SF-1), y el denominado “SRY box related Gene 9 (SOX 9)”.³⁰² Además de esta expresión génica la producción de hormonas por gónadas diferenciadas es un proceso que determina también la diferenciación de genitales externos e internos durante la vida fetal y que determina el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios durante la pubertad.³⁰² La hormona antimülleriana (AMH) secretada por las células de Sertoli inhibe el desarrollo de los órganos genitales internos femeninos; contrariamente, la testosterona secretada por la células de Leydig induce la estabilización de los conductos wolffianos, determinantes del desarrollo de los genitales masculinos internos; por último, la diferenciación de los genitales masculinos externos requiere la transformación de testosterona en dihidrotestosterona, mediada por la enzima 5-alfarreductasa de tipo 2 que se expresa en la piel genital y en el seno urogenital.³⁰² Todos estos efectos de los andrógenos ocurren en presencia de un RA funcional.³⁰²

En los primeros momentos del desarrollo embrionario, la síntesis de los andrógenos está inducida por la hormona gonadotropina coriónica y por la LH. Pero además, durante la embriogénesis, el funcionamiento normal del RA es completamente necesario para el desarrollo del fenotipo masculino, y las alteraciones del RA son causas de un amplio espectro de anomalías fenotípicas del desarrollo sexual masculino.⁹ Los andrógenos -la testosterona y la dihidrotestosterona- desempeñan un papel crucial en el desarrollo de los órganos reproductores masculinos, tales como el epidídimo, el conducto deferente, la vesícula seminal, la próstata y el pene.^{69,114,115} La testosterona es imprescindible en el desarrollo y la diferenciación de las estructuras derivadas de los conductos de Wolf;^{32,33} mientras que, la 5-alfadihidrotestosterona, un metabolito activo de la testosterona, es el ligando activo en las estructuras derivadas del seno urogenital y del tubérculo urogenital.^{32,33} Todas estas acciones están mediadas por la activación del RA en estas diferentes estructuras.^{32,33} En la especie humana es crucial para el desarrollo gonadal la presencia de una hiperplasia fisiológica de células de Leydig durante las semanas 14-18 de gestación.²⁰⁴ Sin embargo, en el testículo fetal humano el RA y la proteína Bcl-2 (una proteína anti

apoptótica) progresivamente queda restringida a las células mioides peritubulares a medida que avanza la gestación.²⁰⁴

Es más, los andrógenos -interaccionando con el RA- determinan la morfogénesis del tracto genital masculino.⁷³ El efecto de los andrógenos está mediado por interacciones celulares locales durante el desarrollo del conducto de Wolff, de modo que en el segmento craneal del conducto de Wolff el RA aparece en las células epiteliales y determina el mantenimiento del conducto a través de factores epiteliales;⁷³ mientras que, en la región caudal de este conducto, los RA se expresan en las células mesenquimales embrionarias.⁷³ Las vesículas genitales están inducidas morfogenéticamente por condensaciones activas de células mesenquimales, mientras que las células epiteliales son primariamente negativas para el RA.⁷³ Pero existen excepciones, así, el apéndice testicular humano es un derivado mülleriano y, sin embargo, sus células epiteliales superficiales son positivas para el receptor de andrógenos, y también lo son, aunque con menor intensidad, algunas células del estroma apendicular.²⁷⁷ El RA ya se expresa inmunohistoquímicamente en la novena semana de gestación, tanto en el epitelio como en el mesénquima del seno urogenital y de los conductos paramesonéfricos (müllerianos) y mesonéfricos (wolffianos) humanos.²⁷⁵ Cuando se compara la expresión del RA en el ovario y en el testículo humano, se ha comprobado que ambas gónadas lo expresan en la novena semana de gestación; no obstante, esta expresión es más evidente en el feto macho que en feto hembra humano a partir de la décima semana de gestación; por todo ello, el patrón específico del RA implica un papel fundamental en el desarrollo gonadal; sin embargo, la expresión del RA no es la llave determinante de la diferenciación gonadal humana.²⁷⁵

PATOLOGÍA TESTICULAR

Mutación del RA y Fertilidad

Existen numerosas hipótesis acerca del significado funcional de las mutaciones que afectan al RA en relación con las diferentes patologías testiculares, y de modo muy especial el Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (AIS).⁶⁰ De hecho, es extraordinariamente útil el análisis de la longitud del tracto CAG normal del gen del RA en relación con los diferentes tipos de patologías testiculares presentes en los hombres infértiles. Asimismo, existen diferencias significativas cuando se comparan los casos de hipoespermatogénesis con el grupo control, pero no se han encontrado diferencias significativas entre este grupo

control y los casos con parada en la maduración de células germinales.⁴² Todos estos datos sugieren que los pacientes infértiles con fallo testicular, sobre todo los que presentan evidente hipoespermatogénesis, tienen una mayor predisposición a presentar un tracto largo de poliglutamina en el RA con respecto al grupo control; es más, el polimorfismo presente en el tracto CAG del RA puede contribuir a las alteraciones en la modulación de la función del receptor que condicionen subsecuentemente alteraciones en la espermatogénesis.⁴² Recientemente, algunas alteraciones moderadas o graves que afectan a la masculinización del aparato genital se han asociado con una larga repetición de poliglutamina del RA, aunque aún se desconoce en qué medida contribuye esta larga repetición a la etiología y la gravedad de las malformaciones genitales, o a las alteraciones en el descenso testicular.^{162,163} Los resultados de este estudio sugieren la existencia de una etiología multifactorial en la que también influyen las alteraciones de la longitud de la poliglutamina del RA.^{162,163}

Pero además de mutaciones del RA relacionadas con patologías de la fertilidad, recientemente se ha identificado una región del cromosoma Y relacionada con la azoospermia, y denominado factor azoospermico AZF; de este modo, las deleciones del factor AZF de la subregión del cromosoma Y pueden estar presentes en un espectro variable de alteraciones de la espermatogénesis que incluyen desde casos ligeros de hipoespermatogénesis a una depleción absoluta de células germinales, que son la causa de infertilidad de estos varones.¹⁷¹ Para demostrar estos hechos, se han evaluado un grupo control y testículos de pacientes con síndrome de solo Sertoli idiopático, con atrofia mixta y con una espermatogénesis completa. En los pacientes que tienen microdelección se ha encontrado un diámetro de los tubos seminíferos significativamente menor, con respecto a aquellos pacientes con atrofia mixta.¹⁷¹ La microdelección del cromosoma Y representa un estadio intermedio entre el Síndrome de Solo Sertoli idiopático y una espermatogénesis normal. De otra parte, en algunos casos se ha observado una deleción de AZF con mutaciones del gen del RA y del gen del receptor de FSH.¹⁷¹ Todos estos datos sugieren que las microdeleciones de una región común del AZF del cromosoma Y conducen al desarrollo de un estatus intermedio entre una completa espermatogénesis y un Síndrome de Solo Sertoli idiopático, lo que explica la presencia de alteraciones histológicas heterogéneas en la biopsia testicular de un determinado paciente, lo que podría indicar diferentes comportamientos de los tubos seminíferos dispuestos en los lobulillos testiculares

adyacentes.¹⁷¹ Pero además, es importante destacar que la resistencia a los andrógenos puede ser la causa del 40% de la infertilidad masculina idiopática debida a azoospermia o a oligospermia severa, sobre todo en aquellos casos en los que no existe una alteración del eje hipofisario testicular.³

En definitiva, las alteraciones de la función testicular pueden desarrollarse durante el desarrollo fetal o en las primeras semanas del desarrollo postnatal, y en ellas pueden participar de manera importante alteraciones primarias de las células de Sertoli.²⁹⁷⁻³⁰⁰ Estas alteraciones primarias de las células de Sertoli pueden influir en las alteraciones de la espermatogénesis, dado que es necesario una normal proliferación y función de las células de Sertoli fetales para mantener una adecuada diferenciación de las células germinales totipotenciales en espermatogonias fetales.²⁹⁷⁻³⁰⁰ En la senectud, los hipogonadismos macroscópicos son poco frecuentes, la insuficiencia intermedia a los andrógenos es mucho más frecuente, especialmente en hombres de edad avanzada y en aquellos que reciben tratamientos médicos en enfermedades crónicas,¹⁹² por lo que es posible que estos individuos se beneficien de terapia androgénica adyuvante.¹⁹²

Receptor de Andrógenos y Envejecimiento Testicular

En el hombre viejo, el mantenimiento de niveles séricos normales de testosterona suele ser bastante constante; sin embargo, frecuentemente existe un incremento de LH.¹⁰⁹ Aún así, los niveles séricos de testosterona disminuyen progresivamente a medida que avanza la edad, aunque los niveles encontrados pueden variar notoriamente de unos individuos a otros,³⁵⁶ de modo que la aplicación terapéutica de geles de dihidrotestosterona sobre la piel de los hombres viejos incrementa significativamente los niveles bioactivos circulantes de andrógenos.²⁵⁰ En la andropausia frecuentemente, la circulación de andrógenos bioactivos en hombres mayores de 50 años y niveles séricos de testosterona inferiores a 15 nM -cuando se realiza un tratamiento previo de estimulación, o cuando los niveles séricos de globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG)- son superiores a 30 nM; sin embargo, aún es prematuro precisar si estos cambios dependen de diferente bioactividad o de la modulación selectiva del RA.²⁵⁰

Dado que la acción última de los andrógenos está mediada por el RA, es posible que diferencias en la sensibilidad a los andrógenos puedan contribuir a la variación de los

niveles de testosterona sérica y, en definitiva, a la retroregulación negativa de la testosterona.³⁵⁶ Por ello es interesante comparar la contribución del polimorfismo de la repetición del trinucleótido CAG en la variación interindividual, frente a los niveles de testosterona, en personas de edad avanzada.³⁵⁶ En relación con estos datos, es interesante evaluar si existen cambios en la longitud de la repetición de CAG en el exón 1 del gen del RA y si éstos se asocian con incrementos de la transcripción mediada por el RA.¹⁵⁴ De este modo, se ha diseñado un estudio molecular en 882 hombres de edad comprendida entre 40 y 70 años e incluidos en el “Massachusetts Male Aging Study”, de modo que la longitud repetida de CAG se asocia significativamente con los niveles de testosterona libre y de testosterona conjugada con albúmina, en relación con la edad y también en relación con los niveles basales de estas hormonas, determinados cuando estos pacientes eran más jóvenes y, además, también se correlacionan con datos antropométricos; de hecho los niveles de testosterona disminuyen cuando disminuye la repetición de CAG. Todos estos datos sugieren que los niveles de andrógenos están modulados por el genotipo del RA.¹⁵⁴ Sin embargo, hasta el momento presente no se ha encontrado una asociación significativa entre la longitud de la repetición de CAG del RA y los niveles de testosterona total y libre; tampoco se ha encontrado relación con los niveles de LH ni con el denominado índice de AIS, que viene determinado por la multiplicación de los niveles de testosterona y de LH.³⁵⁶ Tampoco se ha obtenido una relación entre la densidad mineral ósea medida en el antebrazo con el polimorfismo de la longitud repetida de CAG del RA, ni con otros marcadores bioquímicos de recambio óseo.³⁵⁶ Por último, no se han encontrado diferencias significativas entre la edad y el índice de masa corporal.³⁵⁶ Todos estos hallazgos permiten sugerir que el polimorfismo de la repetición de CAG en el gen del RA en hombres ancianos sanos no representa un sustancial e importante papel en la variabilidad interindividual de los niveles de testosterona sérica, ni en las determinaciones de recambio del mineral óseo.³⁵⁶

En la andropausia, por último, un sistema de regulación importante asociado directamente con la edad es la interleukina 6 que se incrementa notoriamente cuando los andrógenos declinan,¹¹⁰ por lo que la administración de los andrógenos en ancianos, siendo muy adecuado, no es el único tratamiento posible de la andropausia, máxime si tenemos presente que algunos andrógenos exógenos pueden modificar deletereamente la evolución del cáncer de próstata o de enfermedades del sistema cardiovascular; por ello, en estos pacientes ancianos deben vigilarse ambos órganos cuando se administran terapias

androgénicas.¹¹⁰ El tratamiento del hipogonadismo primario o secundario con testosterona está bien establecido, aunque no se han investigado los mecanismos íntimos que determinan los bajos niveles de testosterona presentes en varones ancianos. Una serie de estudios bien diseñados sugiere que la administración de testosterona en hombres ancianos aumenta la libido, incrementa las erecciones, aumentan la masa muscular y la densidad de mineralización del hueso.¹⁹⁴ Así mismo, la administración de testosterona disminuye la masa de tejido adiposo y los niveles de leptina en los hombres ancianos, lo que mejora el estatus de andropausia característico en este grupo de población.¹⁹⁴ Es necesario investigar posibles cambios de estos tripletes de CAG en pacientes de edad avanzada, mediante la ampliación por PCR de la región repetitiva CAG.¹⁰⁹ Sólo algunos cambios relacionados con la edad pueden asociarse con la longitud de las zonas repetidas de CAG, lo que sugiere que este parámetro puede desempeñar un papel en la diferente regulación de las acciones de los andrógenos en el hombre viejo.¹⁰⁹ En concreto, el número de repeticiones de CAG se incrementa a medida que avanza la edad y este incremento se correlaciona con alteraciones patológicas que pueden padecer los pacientes, incluidos depresión, ansiedad, deterioro del estado general, disminución de comunicación y, por último, fallecimiento del paciente.¹⁰⁹

Receptor de Andrógenos y Alteraciones del Desarrollo Testicular

Está generalmente aceptado que los defectos del gen del RA pueden determinar alteraciones del desarrollo de los genitales internos o de los genitales externos en varones 46 XY,^{32,33,69} y también ser la causa de la infertilidad del varón.⁶⁹ Mutaciones que codifican la secuencia del gen del RA determinan un grado variable del síndrome de insensibilidad a los andrógenos (AIS).⁹⁰ Estas mutaciones pueden darse en varios miembros de una misma familia aunque en generaciones diferentes.⁹⁰ La mutación del gen del RA o la administración de antiandrógenos pueden ser el resultado de una insuficiencia androgénica durante el desarrollo fetal masculino, lo que conlleva la presencia de recién nacidos con bajos niveles de virilización; de hecho, frecuentemente se pueden observar hipospadias debido a un defecto de la acción de los andrógenos subsecuente a la mutación de los genes de 5-alfarreductasa-2 o del RA.³²³ Las alteraciones de la diferenciación sexual cuyo resultado es el desarrollo de genitales ambiguos es un proceso multifactorial en el que pueden estar implicadas mutaciones de genes que codifican enzimas esteroideogénicas, pero también pueden deberse a mutaciones del gen de la hormona mülleriana, del gen del

receptor de la hormona antimülleriana, del gen que codifica la síntesis de 5-alfarreductasa y, sobre todo, de mutaciones del gen del RA.³⁰² La criptorquidia y el micropene pueden representar un fenotipo de intersexo incluso cuando aparecen como signos aislados, y en estos casos como factor etiológico suele involucrarse a las mutaciones del gen 5-alfarreductasa-2, pero también puede deberse a mutaciones del gen del RA o a alteraciones hormonales medioambientales.³²³ En un estudio de evaluación de las posibles causas de mutaciones del gen del RA en pacientes con criptorquidia aislada no se han encontrado anomalías dentro del exón 8 del gen del RA, por lo que las alteraciones del gen del RA no son la causa de la criptorquidia unilateral.³²⁴⁻³²⁷ En una misma familia con AIS el análisis molecular de la secuencia del gen del RA revela en todos los pacientes una mutación puntual en el exón 6, en el que se cambia la trionina por isoleucina en la posición 800 del codón.⁹⁰

De otra parte, es bien sabido que el RA es imprescindible para un adecuado control de la espermatogénesis humana; sin embargo, no se ha estudiado hasta el presente trabajo la comparación del número variable de repeticiones de CAG en el RA, en relación con las concentraciones de espermatozoides en hombres con parámetros eyaculatorios normales. En este trabajo, el análisis multivariante de la longitud de repeticiones CAG se correlaciona significativamente con la concentración de espermatozoides; sin embargo, paradójicamente no existen diferencias significativas cuando se comparan el grupo de hombres infértiles con historia familiar de infertilidad con el de hombres infértiles sin antecedentes familiares de infertilidad.³⁶⁴ Estos resultados indican que los hombres con repeticiones CAG cortas son los que tienen las concentraciones más altas de espermatozoides dentro de la población de hombres fértiles normales.³⁶⁴ Asimismo, el polimorfismo del RA contribuye a una espermatogénesis adecuada en los hombres normales y no tiene un papel predominante en la infertilidad masculina.³⁶⁴ Además, otros estudios sugieren que en los pacientes infértiles existe un incremento significativo de la longitud repetida de CAG siendo mayor que en los pacientes fértiles; esto es lo que ocurre en el síndrome de solo Sertoli, con respecto al hombre normal.⁴² Dentro del tracto normal el triplete CAG está inversamente relacionado con la actividad transcripcional del RA.⁴²

Receptor de Andrógenos y Criptorquidia

Está bien establecido que la formación de un testículo a partir de una gónada indiferenciada es el prelude de una serie de procesos que determinan la diferenciación sexual masculina y que dependen de la biosíntesis y de la acción de los andrógenos.^{125,126} La acción de los andrógenos puede ser modulada por un gen polimórfico, por lo que la influencia de la repetición poliglutamina del RA puede ser una causa multifactorial de formas graves o menos graves de alteraciones de la masculinización.^{125,126} Con el fin de valorar el estado de masculinización de un varón, es útil determinar la proporción entre testosterona y androstenediona después de la estimulación con HCG; esta proporción está baja en los pacientes con déficit de 18 betahidroxiesteroidesidrogenasa, pero también esta baja en otros pacientes con signos de desmasculinización.⁷⁸ En la mayoría de estos casos son frecuentes las disfunciones de los RA, por lo que es recomendable la determinación de las alteraciones de estos receptores en aquellos casos que presentan anomalías en el desarrollo testicular y sobretodo en los que presentan disgenesia testicular.⁷⁸ No obstante, aún existe controversia sobre el papel regulador del RA en el descenso testicular normal, pero dado que la criptorquidia es un componente constante del AIS, se sugiere que el descenso testicular está en parte controlado por la estimulación androgénica.³⁶⁹ En un estudio reciente, el 63% de los pacientes con testículos localizados en el escroto tenían niveles altos del RA; mientras que el 85% de los pacientes con maldescenso testicular tenían bajos niveles del RA, y estas alteraciones eran aún mayores en los pacientes con testículos intrabdominales.¹²² Sin embargo, en un grupo de 21 pacientes con criptorquidia unilateral no encuentran anomalías del gen de RA, por lo que no se considera como la principal causa de la criptorquidia aislada.³⁶⁹ Por otra parte, se ha señalado que la longitud del segmento de la poliglutamina del RA no influye en la gravedad de la desmasculinización o en el descenso testicular, pero sí contribuye a las anomalías genitales que presentan estos pacientes.¹⁶²

En la criptorquidia, la pérdida de AMH puede tener un efecto paracrino que determine posibles alteraciones durante el descenso testicular temprano.⁶⁰ Se han realizado estudios que relacionan mutaciones del RA con alteraciones del descenso testicular, indicando incluso que estos cambios pueden relacionarse con la posición del testículo o con las anomalías de los genitales externos.¹⁵ El gubernaculum testicular es una estructura dependiente de andrógenos que desempeña un papel importante en la fisiología del descenso

testicular,¹²² debido a que el gubernaculum es una estructura rica en RA; por ello, llama la atención que el descenso transabdominal del testículo parezca ser un proceso que no depende directamente de los andrógenos.¹²² Estudios inmunohistoquímicos realizados en testículos criptorquídicos abdominales e inguinales demuestran una disminución del RA en el gubernaculum testicular, con respecto al grupo control.¹²² Estos datos permiten establecer la hipótesis que postula que una estimulación directa de los andrógenos sobre el gubernaculum testicular humano probablemente determinaría un incremento de los polisacáridos, lo cual conduciría, a su vez, a un hinchamiento del gubernaculum, con ulterior dilatación del canal inguinal, facilitándose así el descenso testicular.¹²² Es más, es posible que ocurran procesos multifactoriales que afecten cualitativa o cuantitativamente al RA y que influyan en el descenso testicular transinguinal.¹²² La presencia de una producción de andrógenos normales y de un RA normal en pacientes con maldescenso testicular, sugiere que la relación entre el descenso testicular y las anomalías genitales constituyen unos procesos multifactoriales muy complejos y aún no muy bien precisados.¹⁶²

Receptor de Andrógenos y Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos

El síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (AIS), conocido también como Síndrome de feminización testicular, está relacionado con el pseudohermafroditismo masculino, que clínicamente se reconoce en pacientes con fenotipo femenino.¹⁹⁷ Se caracteriza por una resistencia, en órganos periféricos, a la acción de los andrógenos y esta alteración difiere de otras formas de pseudohermafroditismo masculino, entre las que se encuentran la deficiencia de 17-betahidroxisteroideshidrogenasa tipo 3, la hipoplasia de células de Leydig secundaria a mutación o inactivación del receptor de LH y la deficiencia de la 5-alfarreductasa tipo 2.^{32,33} La incidencia del AIS se ha cifrado en 1:20.400 recién nacidos.¹³ En pacientes postpuberales es una causa frecuente de consulta por amenorrea primaria; sin embargo, en la pubertad el AIS es diagnosticado frecuentemente durante estudios de hernia inguinal.¹³ La mayoría de los cariotipos de estos pacientes es 46 XY, aunque también se han publicado casos de mosaicismo cromosómico.^{96,316} En la mayoría de los pacientes con AIS, los testículos se encuentran alojados en la cavidad abdominal y menos frecuentemente en el conducto inguinal;¹⁵ por ello, cuando ocurre feminización, es aconsejable extirpar los testículos en la pubertad y así disminuir el riesgo de neoplasia.⁶⁸

Se han realizado revisiones amplias de la biología molecular del AIS,^{34,248,370} y, aunque en los pacientes con AIS se han descrito más de 150 mutaciones diferentes,^{32,33} son cuatro los tipos fundamentales de mutaciones del RA: 1) una mutación puntual sencilla consistente en la sustitución de un solo aminoácido o en una parada prematura de la expresión de su codón; 2) inserción o delección de nucleótidos; 3) una delección completa o parcial del gen, y 4) una mutación intrónica que afecta a la secuenciación del RNA del RA.^{32,33}

Se han definido dos formas del AIS: el AIS Completo (CAIS) y el AIS Incompleto (IAIS). La forma incompleta difiere de la completa en que presenta una ambigüedad verdadera de los genitales externos y una feminización incompleta en la pubertad.^{173,248} El CAIS es una forma de pseudohermafroditismo masculino causado por un defecto del RA, en concreto por la mutación de un gen localizado Xq11-12 lo que determina el desarrollo de pacientes con fenotipo femenino, pero con cariotipo masculino 46 XY.⁴ Estos pacientes con CAIS presentan genitales ambiguos, sin embargo el cariotipo es 46 XY por lo que se les atribuye un sexo masculino.⁹⁰ Una variante del CAIS es el también denominado síndrome de feminización testicular, que es el resultado de una ausencia de la acción de los andrógenos sobre los órganos diana.³⁴⁻³⁶ Dentro de este síndrome se han descrito dos variantes principales: una en la que no se detecta el RA intracelular específico y por ello se puede denominar bajo las siglas CAIS, AR negativo; y una segunda variante que se caracteriza por niveles normales del RA y que por ello se denomina CAIS, AR positivo.³⁴⁻³⁶

En el CAIS, el fenotipo más característico consiste en la presencia de genitales externos femeninos, una vagina corta y frecuentemente hendida, ausencia de estructuras derivadas del conducto de Wolf, ausencia de próstata, desarrollo de ginecomastia y ausencia de pelos axilares o pubianos.^{32,33} El estudio histológico de las gónadas de estos pacientes con CAIS demuestra cambios semejantes en testículos criptorquídicos, aunque en algunos casos las lesiones suelen ser menores e incluso no diferir en los primeros estadios evolutivos de la histología del testículo de un niño normal.⁴ Sin embargo, los cambios histológicos en el testículo extirpado de pacientes adultos con AIS son similares al de algunas criptorquidias,^{195,213} aunque también pueden semejarse a un testículo inmaduro e incluso a un testículo infantil normal. Los adenomas de células de Sertoli son frecuentes en los testículos de estos pacientes, aunque se consideran algunas diferencias histológicas

testiculares entre las formas completa e incompleta de AIS y que han sido publicadas en estudios clásicos.^{61,343} Trabajos posteriores de amplias series de pacientes concluyen que no hay diferencias histológicas en los testículos entre los dos tipos de AIS.²⁶⁹ En los pacientes con CAIS, tanto los niveles de testosterona después de la estimulación con HCG⁹⁰ como la testosterona basal están elevados en la edad puberal;^{32,33} mientras que los niveles basales de gonadotropinas⁹⁰ pueden ser normales, aunque también pueden encontrarse niveles elevados de la LH.^{32,33} En nuestra serie constituida por 5 casos con CAIS y uno con AIS, los niveles séricos de FSH son normales en todos los casos; sin embargo, los niveles séricos de LH están ligeramente elevados en los pacientes adultos. Los niveles séricos de testosterona se encuentran ligeramente disminuidos en los pacientes adultos y, contrariamente, ligeramente elevados en los pacientes prepuberales. El nivel de estradiol sérico está ligeramente aumentado en todos los pacientes. Durante la lactancia suelen ser normales.²⁵⁶

En AIS, los niveles séricos de testosterona son generalmente normales, pero los niveles de LH están frecuentemente elevados,^{248,256} estas alteraciones pueden ser debidas a anomalías del gen del RA que determinan una resistencia a los andrógenos en órganos periféricos.^{34-36,248,256} Con todo, se ha publicado que la concentración de la testosterona en la vena testicular es el doble que la concentración de testosterona en la sangre periférica, lo que indica el mantenimiento de la síntesis y secreción de testosterona en estos pacientes.¹⁸⁷ El incremento de estradiol puede ser el resultado de un incremento de la síntesis de esta hormona en los testículos,¹³⁴ puesto que los niveles de FSH en los pacientes con AIS son normales; en estos casos puede existir una alteración de la inhibina.²⁸⁸

Histopatológicamente, en los pacientes adultos con AIS se observa una disminución del volumen testicular y una alternancia de áreas nodulares con áreas difusas. El diámetro tubular está significativamente disminuido y la densidad del volumen de los túbulos seminíferos está aún más reducida.^{252-254,256,257} Un hallazgo característico es la presencia de un patrón de solo Sertoli con intensa expresión de filamentos intermedios de vimentina.^{8,252-254,256,257} No existen células germinales ni tampoco células de carcinoma in situ. Además, la lámina propia generalmente es muy delgada y contiene células peritubulares escasamente inmunoteñidas con inmunotinción de actina y dispuestas en una capa discontinua.²⁵⁶ En niños con AIS, las lesiones histológicas cambian, caracterizándose en estos casos por la existencia de lesiones difusas, en ausencia de lesiones nodulares, con una evidente

hipoplasia tubular, pudiéndose observar algunas células germinales aisladas.

Estudios previos de AIS han definido dos lesiones muy características, los denominados nódulos hamartomatosos y los denominados adenomas de células de Sertoli.²⁶⁹ Los hamartomas están formados por tubos seminíferos sólidos con células de Sertoli inmaduras asociadas a células de Leydig y a fascículos de músculo liso.²⁶⁹ Estos hamartomas suelen ser múltiples en el 63% de los casos con AIS y son bilaterales en el 40% de los casos.²⁶⁹ Los adenomas de células de Sertoli están constituidos por túbulos muy pequeños de células de Sertoli inmaduras, siendo escasas las células de Leydig. Adenomas de células de Sertoli se observan en el 23% de los pacientes con AIS.²⁶⁹ Las lesiones histopatológicas aparecen prematuramente en la infancia, aunque incrementan con la edad de los pacientes;²⁵⁶ asimismo, las lesiones son más intensas cuando el testículo de los pacientes de AIS está localizado intrabdominalmente.²⁶⁹ Aunque existen niños con AIS que pueden presentar un testículo prácticamente normal, a medida que alcanzan la pubertad el testículo se atrofia,²⁷⁶ disminuyendo significativamente el número de espermatogonias durante el desarrollo prepuberal.^{252-254,256,257,269,276} Si bien ha sido descrito el desarrollo de tumores en pacientes con AIS,^{54,55,269,276} estos son excepcionales en pacientes prepuberales.^{252-254,256,257} En el AIS existe un incremento en el número de células de Sertoli, lo cual ha sido encontrado previamente en los nódulos de solo Sertoli presentes en los testículos criptorquídicos.²¹⁰ La presencia de una pared peritubular hialinizada en el AIS es muy evidente,^{252-254,256,257} pero esta lesión también se puede ver en biopsias de infertilidad,²¹³ en testículos de hombres ancianos²⁰⁷ y en pacientes criptorquídicos cuyo testículo se extirpa después de la pubertad.^{252-254,256,257} La mayoría de los pacientes con AIS tienen hiperplasia de células de Leydig,^{79,81,,252-254,256,257,269,276} la cual se puede relacionar con las importantes alteraciones de la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-testicular, lo que frecuentemente se observa en estos pacientes.²⁴⁸ Además, las células de Leydig inmaduras presentes en el AIS se parecen a las células precursoras de Leydig observadas en testículos infantiles normales.²¹⁸ En el intersticio, las áreas de fibrosis presentes en el AIS^{34-36,178} pueden continuarse con áreas semejantes a estroma ovárico, hallazgo muy frecuente del testículo de estos pacientes.^{81,269,276}

En la forma parcial de AIS, el IAIS, los cambios fenotípicos son muy diversos, aunque en la mayoría de estos pacientes predomina la apariencia femenina con genitales

ambiguos, mientras que en otros casos existe un predominio del fenotipo masculino.^{32,33} Cuando llega la pubertad, se produce también una elevación de los niveles séricos de testosterona, de LH y de estradiol.^{32,33} En algunos pacientes con IAIS, se observa desarrollo de tumores de Leydig en ambos testículos.¹⁴⁰ De otra parte, existe una variante clínica peculiar del AIS, denominada enfermedad de Kennedy, en la que se asocian alteraciones del desarrollo neurológico, caracterizadas por atrofia muscular, bulbar y espinal, y en estos pacientes pueden existir anomalías cuantitativas del RA que se relacionan con la gravedad de los síntomas del AIS.¹⁷³ En todos estos casos de síndrome de Kennedy existe una correlación entre la longitud repetida de CAG y el desarrollo temprano de enfermedad neurológica, por lo que se demuestra que esta enfermedad tiene una relación directa con la alteración de la secuencia del RA.⁶⁷ Por último, se ha descrito todo un espectro de individuos con síntomas intermedios de AIS en los que el diagnóstico se descubre en la evaluación de una infertilidad de causa desconocida.^{32,33} Dentro de estas variantes clínicas, caben destacar varios estudios de pacientes con hipospadias graves y criptorquidia bilateral en los que pueden existir alteraciones del RA,¹¹⁹ incluidas la mutación puntual en el exón 8;¹¹⁵ no obstante, en la mayoría de los casos de hipospadia no se encuentran mutaciones específicas, por lo que es necesario establecer criterios genéticos que permitan clasificar y tratar correctamente a estos pacientes.^{115,119} Todo este espectro de enfermedades permiten concluir que las variaciones fenotípicas en los defectos moderados del RA podrían permanecer sin detectarse, incluso durante la exploración clínica en individuos adultos con AIS.^{90,15}

La presencia de derivados müllerianos en pacientes con AIS es un hallazgo clínico relativamente poco frecuente.⁶⁰ Asimismo, existen algunos pacientes con AIS en los que, además de mutaciones del RA, existen alteraciones en la síntesis o en los mecanismos de acción de la hormona antimülleriana. De otra parte, en hermafroditas verdaderos, con genitales ambiguos y cariotipo 46 XX, se ha encontrado tejido testicular que produce niveles significativamente altos de testosterona; sin embargo, en estos pacientes existe una relativa insensibilidad periférica a la testosterona, aun cuando las células somáticas del testículo de estos pacientes sean positivas al RA.²⁶⁵

Numerosos estudios han demostrado una considerable heterogeneidad en la expresión del RA, tal como se ha demostrado desde estadios precoces del desarrollo del cáncer de

próstata.⁹ En los pacientes con IAIS, el estudio de la secuenciación directa de los exones que codifican el gen del RA generalmente no revelan anomalías de este gen.¹³⁶ Es más, defectos parciales de la función del RA están causados por sustituciones de aminoácidos en el dominio hormonal activo del receptor de andrógenos en la cadena del DNA.⁹ Estos defectos parciales funcionales del receptor pueden determinar claramente cambios funcionales, pero también alteraciones cuantitativas en la abundancia del receptor.^{9,115} De hecho, cambios cualitativos del RA en pacientes de una misma familia con CAIS determinan una mayor afinidad del receptor por la 5-alfadihidrotestosterona, un mayor grado de termolabilidad del RA y una mayor afinidad del transporte de progesterona mediada por el RA, con respecto al control. Todos estos hallazgos sugieren la presencia de anomalías estructurales del RA en pacientes con CAIS RA positivo.^{35,36} Sin embargo, la disminución de la afinidad por la 5-alfadihidrotestosterona probablemente no explique la pérdida total de la acción androgénica en estos pacientes.^{35,36} En definitiva, existen múltiples factores y una heterogeneidad de respuesta que pueden ser los responsables o que, en cierta medida, modulen los defectos moleculares del RA en pacientes con CAIS RA positivo.^{35,36}

Receptores de Andrógenos y Síndrome de Klinefelter

El síndrome de Klinefelter es una de las causas genéticas más comunes de infertilidad masculina,¹⁶⁰ de hecho, es la causa más frecuente de las alteraciones de los cromosomas sexuales, afecta aproximadamente entre 1:500 y 1:1000 varones y al 10-20% de los hombres que consultan por infertilidad.^{325,326} Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de uno o varios cromosomas X extras en varones,¹⁷⁷ aunque se desconoce si el cromosoma X extra es de origen materno o paterno;^{325,326} no obstante, la secuenciación del cromosoma X sugiere que el origen de este cromosoma X extra procede de una ausencia de la disyunción materna en la meiosis II.²⁰¹ El error en la meiosis II sugiere que la base de la homocigosis proviene de una mutación del locus del RA.²⁰¹ En los pacientes de síndrome de Klinefelter con mosaicismos, la inactivación del cromosoma X podría explicar, en parte, el espectro de sintomatología clínica, tanto en relación con la deficiencia mental, como con las alteraciones fenotípicas observadas.^{325,326}

Histopatológicamente, en los pacientes adultos con síndrome de Klinefelter, los tubos seminíferos están completamente hialinizados o esclerosados,^{38,211} las células de Leydig forman grandes acúmulos entre los tubos esclerosados,²¹¹ y las fibras elásticas de la túnica

propia están ausentes.³⁸ La membrana basal aparece multiestratificada²¹⁷ y en ella se deposita un material electrodensó finamente granular. Todos estos datos indican que las lesiones son muy importantes e irreversibles.^{38,211} No obstante, algunos pacientes pueden presentar diferenciación parcial de la línea germinal, e incluso, excepcionalmente una espermatogénesis casi completa,¹⁵³ lo que explica la identificación de espermatozoides en el seminograma de pacientes 47 XXY. Puesto que el daño testicular en los pacientes con síndrome de Klinefelter está en relación con la presencia de un cromosoma X supernumerario, se ha sugerido que en estos pacientes con espermatogénesis existiría también un patrón de mosaicismo cromosómico en las células del epitelio germinal, lo que explicaría los casos excepcionales de paternidad en pacientes con síndrome de Klinefelter.^{160,317}

Existen evidencias de que son las células de Sertoli las que están primariamente lesionadas en los pacientes con síndrome de Klinefelter. Estas células son generalmente cromatina sexual positiva, pero un pequeño número de pacientes muestran tubos con células de Sertoli cromatina sexual positiva y negativa en la misma biopsia, lo que permite, en principio, diferenciar dos tipos de tubos seminíferos con solo células de Sertoli:⁸⁴ con células de Sertoli adultas y con células de Sertoli inmaduras –disgenéticas-.²¹¹ Estas células inmaduras ultraestructuralmente presentan escasas organelas, y aunque se ven mitocondrias elongadas, RER y cristales de Charcot-Bottcher,¹⁹³ son excepcionales las laminillas anulares RER,¹⁹³ y los denominados esferidios nucleares son poco prominentes;²¹⁴ sin embargo, los filamentos intermedios son numerosos, se ven vacuolas intracitoplasmáticas¹⁵⁵ y existen interdigitaciones de la membrana y uniones estrechas. Las células de Leydig también están notoriamente alteradas en el síndrome de Klinefelter: el citoplasma es eosinófilo,²¹⁷ y las mitocondrias poco abundantes.²⁷¹ En un pequeño número de pacientes la hiperplasia de células de Leydig es más moderada.²¹¹ La mayoría (50 y 90 %) de las células de Leydig están anormalmente diferenciadas –células de Leydig disgenéticas,²²⁸ aunque también se pueden observar células de Leydig multivacuoladas e inmaduras en variable proporción, siendo muy escasas las células de Leydig normales. En el 40-70 % de las células de Leydig, la cromatina sexual es positiva.²¹¹ La función de las células de Leydig, a pesar de la marcada hipertrofia o hiperplasia, es inadecuada, de modo que los niveles de andrógenos séricos en estos pacientes son muy inferiores a los del hombre normal.²¹¹ Si bien no se ha dilucidado si existe una correlación evidente entre la gravedad de la hialinización tubular y

de la hiperplasia de células de Leydig y el grado de androgenización de estos pacientes, cabe la posibilidad de una relación entre la intensidad de las alteraciones hormonales y el mayor número de variantes cromosómicas^{217,253} en estos pacientes. Los hallazgos ultraestructurales sugieren la posibilidad de una síntesis de esteroides alterada o modificada,^{193,217,271} puesto que, si bien en las células de Leydig normales el tratamiento con gonadotropinas provoca un aumento de lipofuscinas, su escasez en el síndrome de Klinefelter sugiere un efecto gonadotrópico disminuido,²¹⁷ lo que indicaría una irreversibilidad de las alteraciones funcionales de las células de Leydig en el síndrome de Klinefelter.³¹⁰

En definitiva, los hombres con Síndrome de Klinefelter presentan hipogonadismo, alteración de la espermatogénesis y deficiencia de andrógenos,¹⁷⁷ y existen importantes variaciones de los niveles de hCG y testosterona en los pacientes adultos;³⁷ sin embargo, en pacientes XXY infantiles, los niveles séricos de FSH, LH, inhibina B y AMH no difieren de los controles. En estos niños con síndrome de Klinefelter, aunque la secreción de testosterona está alterada, la normal secreción de inhibina B y de la AMH no permite dilucidar cuál es el mecanismo íntimo que determina la disminución de la función de las células de Sertoli después de la pubertad.¹⁵⁸ En un estudio reciente, no se han encontrado alteraciones del gen del RA, pro lo que, en principio, no constituyen un factor importante en el daño de la espermatogénesis en los pacientes con síndrome de Klinefelter.³⁷

FINALIDADES DEL PRESENTE ESTUDIO

Recientemente se ha acuñado el término de síndrome de disgenesia testicular, con el fin de integrar una serie de enfermedades primarias del testículo humano que se pueden presentar aisladamente, pero que más frecuentemente se pueden presentar asociadas en un mismo paciente; entre estas enfermedades destacan la criptorquidia, la hipospadia y el cáncer de células germinales testiculares, así como algunos pacientes con bajo recuento de espermatozoides de causa no conocida, de modo que se puede hipotizar que estos casos tienen en común alteraciones funcionales de las células de Sertoli y, posiblemente, de las células de Leydig que ocurren ya desde la vida fetal.²⁹⁷ En estos casos, la desdiferenciación morfológica y funcional de las células de Sertoli es evidente, por lo que se puede concluir que esta alteración de la maduración de las células de Sertoli puede ser la causa común,

aunque todavía desconocida, de las alteraciones del aparato reproductor masculino humano que se expresan a lo largo de la vida.²⁹⁷

Sin embargo, en la actualidad el reemplazo correcto de testosterona y los síntomas de deficiencia de andrógenos no han tenido efecto en la infertilidad.¹⁶⁰ La información que se tiene sobre las grandes variaciones del desarrollo de estructuras dependientes de andrógenos en un mismo individuo o en diferentes individuos, y la poca respuesta a la acción de dosis grandes y prolongadas de testosterona han sido interpretadas como una disminución de los RA dependientes del hipotálamo, de los tejidos periféricos, o del propio testículo que induce genéticamente una alteración de la receptividad.⁹⁷

Por ello, en el presente estudio se pretende evaluar el papel que desempeña la expresión del RA en relación con los estadios madurativos del epitelio seminífero, con los cambios tubulares que experimenta el testículo desde el desarrollo neonatal hasta la senectud y, por último, en relación con las lesiones de las células de Sertoli en pacientes criptorquídicos con extirpación del testículo después de la pubertad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Existen relaciones de la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli con la regulación de la espermatogénesis y con las diferentes fases del desarrollo e involución del testículo en hombres normales y con patologías congénitas testiculares.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinación de la expresión del receptor de andrógenos en los núcleos de las células de Sertoli en las diferentes fases del desarrollo e involución del testículo del hombre normal y en patologías congénitas testiculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

PRIMERO. Valoración inmunohistoquímica de los receptores de andrógenos en las células de Sertoli de testículos infantiles, puberales y de adultos normales.

SEGUNDO. Valoración inmunohistoquímica de los receptores de andrógenos en células de Sertoli en la involución testicular con la senectud.

TERCERO. Cuantificación microdensitométrica de la inmunoexpresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli de testículos de hombres adultos normales en relación con los diferentes estadios madurativos del epitelio seminífero.

CUARTO. Cuantificación microdensitométrica de la inmunoexpresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli de testículos criptorquídicos extirpados después de la pubertad.

QUINTO. Valoración de la inmunoexpresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli de testículos criptorquídicos extirpados en pacientes diagnosticados de síndrome de insensibilidad a los andrógenos.

SEXTO. Valoración de la inmunexpresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli de biopsias testiculares realizadas en pacientes diagnosticados de síndrome de Klinefelter.

SÉPTIMO. Detección del receptor de andrógenos mediante métodos de PCR en piezas de orquiectomía extirpadas en pacientes con criptorquidia, con síndrome de insensibilidad a los andrógenos y en casos de autopsia sin patología testicular.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

En este estudio, se ha evaluado el RA en las células de Sertoli, utilizando tejidos histológicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de los archivos de la Unidad de Histología de la UAM, del Hospital Universitario La Paz de Madrid (UAM) y del hospital universitario de Guadalajara (U. Alcalá). Se han seleccionado casos de diferentes edades, tanto normales como patológicos.

Grupo I. Testículos humanos normales infantiles para el estudio comparativo de la expresión del RA.

Se utilizaron 5 testículos y 1 epidídimo, obtenidos durante la autopsia de niños fallecidos por diferentes causas, pero sin alteración de los órganos genitales. Edad promedio 3,1 años.

Grupo II. Testículos humanos durante el periodo puberal temprano normal, para el estudio comparativo de la expresión del RA.

Se utilizaron 4 testículos procedentes de igual número de autopsias de niños fallecidos por causas que no comprometían lesiones de las gónadas. Edad promedio 8,8 años.

Grupo III. Testículos humanos normales durante el periodo puberal tardío, para el estudio de la expresión del RA.

Se utilizaron 8 testículos procedentes de igual número de autopsias de niños fallecidos por causas en las que no se reconocen lesiones primarias, ni secundarias, ni alteraciones funcionales testiculares. Edad promedio 14,1 años.

Grupo IV. Testículos humanos normales de hombres adultos, para el control del estudio de la inmunoexpresión del RA en las células de Sertoli.

Se utilizaron 8 testículos normales, procedentes de igual número de autopsias de hombres adultos, fallecidos por diversas causas, pero sin patologías primarias o secundarias del aparato genital. Edad promedio 42,1 años.

Grupo V. Testículos de hombres de edad avanzada, para valorar la inmunoexpresión del RA en relación con las lesiones del epitelio seminífero.

Se utilizaron 6 testículos normales de igual número de pacientes ancianos, procedentes del archivo de biopsias y autopsias del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz de Madrid (Edad promedio 73,5 años), y 5 testículos procedentes del archivo de biopsias y autopsias del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Guadalajara (Edad promedio 70,2 años).

Grupo VI. Testículos criptorquídicos humanos, para el estudio del RA.

Se utilizaron los testículos extirpados en 17 pacientes con criptorquidia unilateral; las orquiectomías se realizaron en los Servicios de Urología de los Hospitales La Paz y de Guadalajara (Edad promedio 19,7 años).

Grupo VII. Testículos de pacientes diagnosticados de síndrome de insensibilidad a los andrógenos, para el estudio del RA.

Se utilizaron ambos testículos extirpados en 6 pacientes con criptorquidia bilateral y CAIS; las orquiectomías se realizaron en el Servicio de Urología del Hospital La Paz (Edad promedio 12,7 años).

Grupo VIII. Biopsias testiculares obtenidas en pacientes diagnosticados de síndrome de Klinefelter, para el estudio del RA.

Se utilizaron pequeñas muestras tisulares de parénquima testicular en 9 pacientes clínica y genéticamente de síndrome de Klinefelter; las biopsias se realizaron en el Servicio de Urología del Hospital La Paz (Edad promedio 34,2 años).

Grupo IX. Cortes de tejido testicular obtenidos para la detección del receptor de andrógenos por métodos de PCR.

Se obtuvieron con el microtomo cortes gruesos de parénquima testicular para la extracción del DNA e identificación del receptor de andrógenos por PCR, evaluando 14 pacientes postpuberales diagnosticados de criptorquidia unilateral, 4 casos diagnosticados de síndrome de insensibilidad a los andrógenos y, por último, 3 piezas de orquiectomía (grupo control) extirpadas para terapia hormonal del cáncer de próstata. Como control positivo, se utilizó piel humana masculina.

MÉTODOS

Métodos de Estudio Histológico General

Fijación de las Piezas

La mayoría de las piezas de orquiectomía se fijaron por inmersión en formol neutro taponado al 4%, durante 72 horas, pero algunas piezas quirúrgicas y las correspondientes a las biopsias del grupo control se fijaron en líquido de Bouin, fijador habitual de conservación de todas las biopsias testiculares obtenidas en niños y en pacientes adultos para la evaluación diagnóstica y pronóstica de la fertilidad.

Formol tamponado:

Fosfato monosódico, monohidrato	4.00 g
Fosfato disódico anhidro	6.50 g
Agua destilada	900 ml
Formol puro (CH ₂ O 40%)	100 ml

Líquido de Bouin:

Ácido pícrico a saturación en agua destilada	750 ml
Formol puro (40%)	250 ml
Ácido acético glacial	50 ml

Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas

Las piezas de orquiectomía y de autopsia fueron seccionadas en cortes perpendiculares a todo lo largo del eje mayor del testículo, con un espesor de cada sección macroscópica de alrededor de 3 mm. A continuación, se procedió a la inclusión en parafina, bien de toda la pieza en los casos pediátricos, o bien de secciones seleccionadas al azar (siempre en número superior a 6 cortes por testículo) en las piezas extirpadas en pacientes adultos. De otra parte, las biopsias testiculares fueron incluidas *in toto*, debido a su pequeño tamaño. Todas estas piezas fueron incluidas en parafina en el procesador de tejidos marca Autotechnicon Duo®, lo que permitió realizar la deshidratación de las secciones fijadas mediante pases consecutivos en alcohol de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en acetato de butilo, dando dos pases de una hora cada uno.

Finalmente las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60° C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron 5 cortes seriados de 5 µm de espesor, mediante un microtomo de la marca Ernst Leitz GMBH (Typ 1212) Wetzlar Germany®, y las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE), PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff, con y sin digestión por la diastasa), tricrómico de Masson y técnica de fibras elásticas con coloración de van Giesen (EVG), siguiendo los métodos histológicos habituales. Las preparaciones de HE recién teñidas se aclararon en agua destilada. Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona).

Método Inmunohistoquímico para la Detección del Receptor de Andrógenos

Se ha utilizado el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa para evaluar la expresión del RA en los diferentes grupos, control y de patologías testiculares estudiadas, mediante el anticuerpo monoclonal anti-RA (Dako, Glostrup, Denmark), diluido habitualmente a 1:500.

Para realizar el método inmunohistoquímico de detección de la expresión del RA, se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor del material incluido en parafina y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina (Sigma, St Louis) durante 24 horas, con el fin de adherir mejor el corte al portaobjetos.

Las secciones se procesaron con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, descrito por Hsu⁷⁵, con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,¹²⁵ que se especifican a continuación: se realizó la desparafinación completa de las secciones, seguido de la hidratación en alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. A continuación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante diez minutos. Los cortes se lavaron en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente, pH 7,4, durante 5 minutos. Se procedió al desmascaramiento del epitopo mediante tratamiento por calor; para ello, las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con microundas en dos pases de 2,5 minutos, procurando

que las preparaciones no llegasen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases. Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado rápido, dos minutos, en H₂O destilada para retirar el sobrenadante del buffer citrato. Lavamos las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7,4. Seguidamente, realizamos el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente. A continuación, añadimos el anticuerpo primario anti-RA, diluido a 1:500, en una solución de PBS+ BSA al 1%. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Las secciones se lavaron en tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se añadió a las secciones el complejo biotinilado anti-ratón, con una dilución 1:200, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las preparaciones en tres pases de PBS, durante 5 minutos cada pase y a temperatura ambiente. Se incubaron las preparaciones en el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Zymet, San Francisco, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizamos tres lavados en PBS durante 5 minutos. La inmunorreacción se reveló con diaminobencidina (Sigma, St. Louis, USA) (30 mg de diaminobencidina en 10 ml de buffer tris-HCl, a pH 7,4 y con H₂O₂ al 0,015 %). El tiempo de revelado con diaminobencidina es de 3 minutos. A continuación, se hizo una tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se lavaron con abundante agua destilada, se deshidrataron en etanol en concentraciones crecientes, y se montaron en la resina sintética DePex.

Métodos Morfométricos

Valoración microdensitométrica de la expresión del RA

Se ha realizado un estudio prospectivo de la cuantificación microdensitométrica de la intensidad de expresión del RA, en relación con los diferentes estadios madurativos de los tubos seminíferos normales; así mismo, se ha cuantificado también el RA en diferentes patrones de lesiones tubulares de frecuente observación en los testículos de pacientes ancianos. Por último, la expresión del RA se cuantificó microdensitométricamente en diferentes patrones tubulares de distintas lesiones de testículos criptorquídicos.

Para el estudio microdensitométrico, se ha seleccionado una preparación histológica representativa de cada caso, en la que se comprobó una correcta realización del método inmunohistoquímico para la detección del RA.

Se han fotografiado entre 25 y 50 campos representativos de las diferentes lesiones encontradas, procurando que la elección de estas lesiones fuera al azar en cada caso. Las imágenes histológicas fueron capturadas con el objetivo de 40X de un microscopio Leica, asociado a una cámara digital Leica CD200. En cada uno de estos campos se han tomado mediciones mediante el analizador de imágenes Leica con el programa informático Leica DC-Viewer. Para ello, se tomaron las medidas microdensitométricas de alrededor de 20 puntos en cada núcleo de las células de Sertoli, y se calculó el valor medio por núcleo de la intensidad de expresión del RA, esto es, se obtuvo la densidad óptica integrada (DOI) del programa informático Leica Qwin, expresada en unidades arbitrarias, de la expresión del anticuerpo anti-RA, en relación con las áreas específicas de cada estadio madurativo de la espermatogénesis, o de cada lesión específica del epitelio seminífero. Se ha usado un Microdensitómetro estático Leica que está conectado a una cámara digital Leica en color, de alta precisión, y un analizador de imágenes digitalizadas, con un programa informático específico de Leica para las cuantificaciones densitométricas.

De cada determinación microdensitométrica en cada medida nuclear de la expresión del RA, se obtuvieron tres registros (canales) de color RGB (rojo, verde y azul); a cada uno de estos canales RGB, el sistema informático le aplicó una escala numérica de 0 a 255, de modo que la mayor intensidad de color de cada canal estaría en el número arbitrario 0 y la mínima intensidad de color para cada registro estaría en 255. Dado que la escala numérica es inversamente proporcional a la intensidad de color, la altura de las barras de los gráficos se ha representado con el número inverso de la cifra microdensitométrica; sin embargo, en las tablas se conserva la cifra emitida por el programa informático Leica QWin. De cada fotografía, además de las mediciones de los núcleos de las células de Sertoli, se tomaron 100 mediciones del valor “blanco”, esto es, del fondo de la preparación sin tejido; de este modo, esta DOI se consideró como el blanco absoluto microdensitométrico (ausencia de color), y las mediciones celulares se modificaron respecto de este blanco. Con esta modificación se consiguió que en todas las microfotografías pudiera compararse entre sí la intensidad de expresión del RA. Puesto que el revelado de la inmunotinción de SBP se realizó con

diaminobenzidina que marca la inmunoexpresión de color marrón, se compararon los valores microdensitométricos en los canales rojo y verde que forman aquel color; así mismo, dado que se realizó una contratinción nuclear con hematoxilina para identificar los núcleos de las células de Sertoli que no expresan RA, se valoraron también los datos microdensitométricos del canal azul, considerando como valor constante de este canal la DOI de los núcleos de las espermatogonias basales.

Método de PCR para la Detección de Alteraciones Moleculares del RA

Las muestras utilizadas han sido los cortes de tejido testicular obtenidos para la detección del receptor de andrógenos por métodos de PCR, descritos como Grupo IX. Se han probado tres métodos diferentes para la extracción del DNA: 1) método tradicional, 2) kit Gentra Puregene y 3) kit Epicentre Masterpure. La comparación de los tres procedimientos refleja que con el método tradicional, se obtiene más DNA, tanto en muestras fijadas en formol como en líquido de Bouin. Por ello, se ha seleccionado el método tradicional para la detección de las alteraciones moleculares del RA.

Método Tradicional de Extracción de DNA

En primer lugar, se añade a cada muestra 500 µl de buffer de lisis; a continuación, se procede al choque térmico a 100 °C durante 10 minutos, y se deja enfriar. Seguidamente, se añaden 10 µl de proteinasa k (20 mg/ml) y se incuba toda la noche a 55 °C. Pasado este tiempo, y una vez que las muestras están digeridas, se añaden 50 µl de CHELEX al 0,5% y se incuba durante 30 minutos a 55 °C; después, se inactiva la enzima a 100 °C durante 10 minutos, y se centrifuga a 13.200 rpm durante 15 minutos, a 4 °C. Seguidamente, se pasa el DNA a un tubo limpio y se conserva a 4 °C. Posteriormente, se añade un volumen (500 µl) de fenol / cloroformo / alcohol isoanílico, se mezcla con vórtex hasta obtener una emulsión lechosa y se centrifuga a 13.200 rpm durante 15 minutos, a 4 °C. A continuación, se pasa la fase acuosa a un tubo limpio, se añade un volumen de cloroformo (500 µl), se mezcla con vórtex hasta obtener una emulsión lechosa, se vuelve a centrifugar a 13.200 rpm durante 15 minutos, a 4 °C, y se pasa la fase acuosa a un tubo limpio. Seguidamente, se añade acetato sódico 0,3 M a pH 5,2 (45 µl para 450 µl de muestra), y dos volúmenes de etanol absoluto frío (1 ml), se mezcla con vórtex y se conserva a -20 °C para precipitar el DNA.

El procedimiento continúa centrifugando las muestras a 12.000 rpm durante 15 minutos, a 4 °C. Después, se elimina el sobrenadante y se lava el pellet con etanol al 70% frío (500 µl). Finalmente, se centrifuga a 12.000 rpm durante 2 minutos, a 4 °C, se elimina casi todo el etanol y se deja secar de 2,5 a 3 h; se resuspende con 50 µl de agua mili Q estéril y se puede conservar congelado a -20 °C.

La siguiente fase consiste en determinar la concentración de DNA y amplificar los fragmentos que contienen las repeticiones del triplete CAG del receptor de andrógenos por PCR.

Método de PCR para el Receptor de Andrógenos

Como cebadores, se han utilizado:

hARCAGf 5'-GCC TGT TGA ACT CTT CTG AGC-3'

hARCAGr 5'-CGA TGG GCT TGG GGA GAA CCA TCC TCA-3'

Para realizar el programa de PCR, se han utilizado los siguientes productos:

- | | |
|----------------------------|----------|
| • H ₂ O | 15,75 µl |
| • Tampón 10x | 2,00 µl |
| • dNTPs | 0,50 µl |
| • hARCAGf | 0,25 µl |
| • hRACAGr | 0,25 µl |
| • Hot Start Taq-Polimerasa | 0,25 µl |
| • Muestra de DNA | 1,00 µl |

Las condiciones del programa de PCR han sido:

- | | |
|------------------------|----------------------------------|
| Se repite
35 ciclos | • 15 min a 95 °C |
| | • 50 s a 94 °C |
| | • 40 s a 58 °C |
| | • 1 min a 72 °C |
| | • 10 min a 72 °C |
| | • El tiempo que se quiera a 4 °C |

A cada producto de PCR obtenido se le añaden 3 µl de buffer de carga y, a continuación, se corren las muestras en un gel de agarosa al 0,8%.

Métodos Estadísticos

Los datos obtenidos en el estudio microdensitométrico se sometieron a un análisis estadístico con el programa SPSS (“Statistical Package for Social Scienses”) versión 10.0, evaluándose los siguientes parámetros: media aritmética, desviación estándar y significación estadística mediante el test de la t de Student, y la correlación estadística y su significación mediante el test de Pearson.

Técnicas Fotográficas

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con una cámara digital Leica DC200, almacenadas en formato TIFF y tratadas con el programa Adobe Photoshop 5.0. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Quark X Press 4.0.

RESULTADOS

Evaluación Morfológica de la Expresión Inmunohistoquímica del RA

En este estudio hemos analizado la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli. Los cambios en su expresión, se han valorado desde la infancia (Grupo I), pasando por el periodo puberal temprano (Grupo II) y tardío (Grupo III), por la edad adulta (Grupo IV), y hasata la evolución senil en el hombre normal (Grupo V). Así mismo, se han estudiado los cambios en la expresión del RA en tres enfermedades congénitas en las que el testículo se encuentra muy dañado, como son la criptorquidia (Grupo VI), el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (AIS) (Grupo VII) y el síndrome de Klinefelter (Grupo VIII).

En los testículos del grupo control de hombres adultos normales, las células de Sertoli de los tubos seminíferos, que conservan una espermatogénesis completa, presentan una intensa expresión del RA, aunque su intensidad varía de unas células a otras dependiendo del estadio madurativo de la espermatogénesis. Todas las células de la línea germinal carecen de inmunoexpresión del RA. Las células mioides de la pared peritubular son positivas al RA (Fig. 1).

En el grupo de hombres de edad avanzada, gran parte de los tubos seminíferos muestran espermatogénesis conservada, aunque también se observa todo un espectro de lesiones, desde espermatogénesis moderada hasta atrofia del epitelio germinal, asociadas a la formación de grandes vacuolas intraepiteliales. En estas áreas la intensidad de inmunotinción del RA es, en algunos casos, aparentemente menor, aunque otras veces, no se aprecian diferencias con respecto a la inmunorreactividad del RA en las áreas de espermatogénesis conservada (Figs. 2,3).

Durante la infancia temprana, la mayoría de las células de Sertoli están desordenadas en el tubo seminífero, pero presentan una moderada o intensa inmunoexpresión del RA; contrariamente, las células germinales carecen de inmunomarcaje. Las células mioides peritubulares y los fibroblastos intersticiales sólo muestran trazas de inmunotinción. A los tres-cuatro años de edad, existe una mejor organización de los tubos seminíferos; sin embargo, la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli son negativos o sólo muestran vestigios del RA, siendo excepcionales los núcleos que presentan mayor inmunomarcaje. Las espermatogonias basales son rigurosamente negativas y la mayoría de las células intersticiales no muestran inmunotinción. Contrariamente, en los niños de cuatro años de

edad, se observa una intensa expresión del RA en los núcleos de las células principales del conducto epididimario (Fig. 4).

Al comienzo de la pubertad, en las áreas con inicio de la espermatogénesis, las células de Sertoli que están en íntima vecindad presentan intensa tinción nuclear del RA. En el intersticio, algunas células de Leydig inmaduras muestran inmunomarcaje, aunque la mayoría son negativas (Fig. 5).

Al final de la pubertad, La mayoría de los núcleos de las células de Sertoli son RA positivos, aunque otros sólo muestran vestigios o carecen de inmunotinción para el RA. Todas las células mioides de la pared peritubular expresan el RA (Fig. 6).

En los testículos criptorquídicos, se observan tubos seminíferos con espermatogénesis incompleta; las células de Sertoli muestran una inmunotinción variable del RA, aunque en la mayoría está disminuida, en otras sólo quedan vestigios, y otras son negativas. En el intersticio testicular, gran parte de las células de Leydig muestran un evidente inmunomarcaje nuclear del RA (Figs. 7-9).

En los pacientes con síndrome de AIS, se observan tubos seminíferos inmaduros con células de Sertoli disgenéticas y negativas al receptor, aunque otras muestran vestigios de inmunotinción, y otras son positivas. En el intersticio, las células de Leydig son escasas e inmaduras y, mayoritariamente, negativas al RA (Figs. 10-12).

En los pacientes con síndrome de Klinefelter, se observan tubos seminíferos con escasas células de Sertoli disgenéticas y con intensidad variable de expresión del RA. En el intersticio, las células de Leydig son hiperplásicas y carecen de inmunotinción (Figs. 13,14).

Evaluación Microdensitométrica de la Expresión Inmunohistoquímica del RA

Se ha realizado la evaluación de la intensidad de la inmunoexpresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli, tanto en los testículos normales de hombres adultos (Grupo Control: Grupo 4) y en los casos de edad avanzada (grupo control: Grupo5), así como en el grupo de pacientes postpuberales con testículos criptorquídicos (Grupo 6). Para ello se han obtenido las medidas microdensitométricas del RA en los 3 canales RGB que constituyen

cada color. Todas las preparaciones en las que se realizó el estudio inmunohistoquímico para la detección del RA se tiñeron, además, con la tinción nuclear de Hematoxilina (núcleos de color azul), con el fin de identificar también los núcleos de las células de Sertoli sin expresión de este receptor; por ello, lo primero que determinamos fueron las posibles modificaciones que esta contratinción nuclear podría provocar en los resultados cuantitativos del grado de inmunotinción del RA.

En el presente estudio, hemos considerado como tinción de fondo nuclear la tinción azul que origina la hematoxilina, los datos del canal azul, obtenidos en la cuantificación microdensitométrica de los núcleos de las espermatogonias basales, los cuales rigurosamente carecen de expresión del RA, tanto cuando se emplean métodos inmunohistoquímicos, como cuando se emplean métodos bioquímicos y de biología molecular. Una vez conocido este valor basal, se ha cuantificado la expresión del RA (canal azul) de los núcleos de las células de Sertoli localizadas en varias asociaciones celulares de la espermatogénesis normal, y también estos valores del RA en las células de Sertoli en aquellas áreas de atrofia del epitelio seminífero (grupo 5), caracterizadas por la presencia de espacios vacíos (“vacuolas”), consecuencia de la pérdida patológica de células germinales meióticas y postmeióticas (Tabla 1).

En relación con la espermatogénesis conservada, no se han encontrado diferencias en la intensidad de tinción del RA de las células de Sertoli, cuando se comparaban aquellas áreas del tubo seminífero con diferenciación de una espermatogénesis completa (grupo 4) - en las que se veían abundantes espermátides elongadas- con aquellos otros segmentos del tubo seminífero normal en los que el estadio madurativo solo alcanzaba hasta la diferenciación de espermátides redondas o, incluso, hasta la diferenciación de espermátocitos de 1^{er} orden. (Tabla 1). Sin embargo, sí se encontró una ligera mayor expresión del RA en las células de Sertoli en aquellas áreas del tubo seminífero en las que las únicas células germinales presentes eran espermatogonias basales.

Tabla 1 Cuantificación microdensitométrica (canal azul) de la intensidad de inmunotinción del RA en las células de Sertoli, en relación con los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis normal y en las áreas de atrofia tubular focal que contienen células de Sertoli vacuoladas. Se incluyen los valores de la densidad nuclear basal de la contratinción nuclear de las espermatogonias con hematoxilina.

Estadios de la Espermatogénesis	RA Sertoli (CanalAzul)
Diferenciación de Espermatozoides	116,3 ± 9,2
Diferenciación de Espermátides redondas	112,2 ± 19,7
Diferenciación de Espermatoцитos de 1^{er} Orden (Cito I)	114,9 ± 8,4
Diferenciación de Espermatogonias	111,9 ± 7,8 ^a
Presencia de Células de Sertoli Vacuoladas	119,2 ± 7,0 ^a
DOI de Espermatogonias: Hematoxilina	150,1 ± 4,1 ^a

DOI: Densidad Óptica Integrada; a: $p < 0.05$ respecto al grupo anterior.

En relación con el estadio madurativo del epitelio seminífero, también se ha cuantificado la intensidad del color marrón del revelado con diaminobencidina del método de Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) en los canales rojo y verde, de cuya mezcla surgen las diferentes gamas de colores marrón-pardos. En la tabla 2, se recogen los datos cuantitativos de la densidad óptica integrada (DOI) y, en la figura 15, se representa la proporción de tinción resultante de la división de la DOI del canal rojo entre la DOI del canal verde. Los valores representados son el resultado del número inverso de la DOI; de este modo podemos observar que la intensidad de expresión del RA de los núcleos de las células de Sertoli no varía en los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis normal, incluso en aquellos segmentos del tubo seminífero en los que el estado del ciclo celular aún se encuentra en la fase de divisiones mitóticas (señalados en el gráfico como el estado madurativo constituido exclusivamente por espermatogonias y células de Sertoli), previas a los procesos de formación de espermatoцитos de 1^{er} orden, y de procesos meióticos y postmeióticos. Por el contrario, la proporción entre estos dos canales rojo y verde de la intensidad de la expresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli está significativamente disminuida en los segmentos del tubo seminífero atrófico, con diferentes grados de hipoespermatogénesis que se asocian a áreas de formación de vacuolas intraepiteliales (Fig. 15).

Tabla 2. Cuantificación microdensitométrica (canales RGB: rojo, verde y azul) de la intensidad de inmunotinción del RA en las células de Sertoli, en relación con los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis normal y en las áreas de células de Sertoli vacuoladas. Los núcleos de las espermatogonias solo se tiñen con hematoxilina.

Estadios de la Espermatogénesis	Rojo	Verde	Azul
D. Espermatozoides	147,3 ± 7,1	124,0 ± 9,2	116,3 ± 9,2
D. Espermátides redondas	146,1 ± 5,9	122,3 ± 7,9	112,2 ± 19,7
D. Cito I	145,0 ± 7,0	121,9 ± 8,7	114,9 ± 8,4
D. Espermatogonias + Sertoli	145,3 ± 4,3	120,7 ± 8,3	111,9 ± 7,8 ^a
P. Vacuoladas	147,5 ± 5,1	125,9 ± 6,4	119,2 ± 7,0 ^a
DOI Espermatogonias Hxilina	152,9 ± 3,5	144,9 ± 4,6	150,1 ± 4,1 ^a

D.: diferenciación de; P.: presencia de; DOI: Densidad Óptica Integrada; a: $p < 0.05$ respecto al grupo anterior.

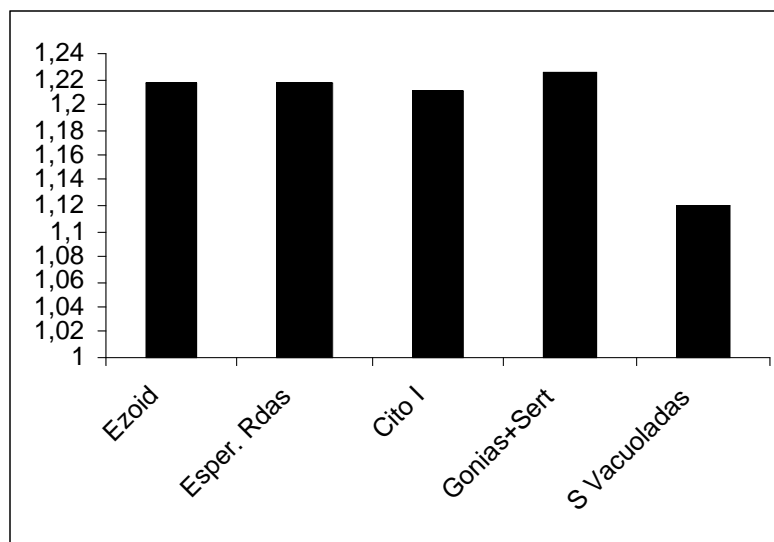


Figura 15. Proporción de la cuantificación microdensitométrica (canales rojo y verde) de la expresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli, en relación con los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis normal y en las áreas de atrofia tubular focal. Ezoid: espermatozoides; Esper Rdas: espermátides redondas; Cito I: espermatoцитos de 1^{er} orden; Gonias + Sert: espermatogonias + Sertoli; S Vacuoladas: células de Sertoli vacuoladas.

El estudio cuantitativo del RA en relación con las diferentes fases del ciclo del epitelio seminífero normal, cuando se valoró la DOI de los canales rojo y verde, no demostró cambios significativos; tampoco se encontraron valores distintos de esta densidad en relación con los diferentes grados de hipoespermatogénesis; dicho de otro modo, el comportamiento inmunohistoquímico de la expresión del RA no presentaba variaciones en las áreas de atrofia tubular frecuentemente observadas en pacientes ancianos (Tabla 2).

En este sentido, se ha encontrado un comportamiento idéntico de los canales rojo y verde en relación con el ciclo celular normal del epitelio seminífero y, así mismo, el mismo comportamiento en las áreas atróficas de vacuolización del epitelio seminífero (Figura 16).

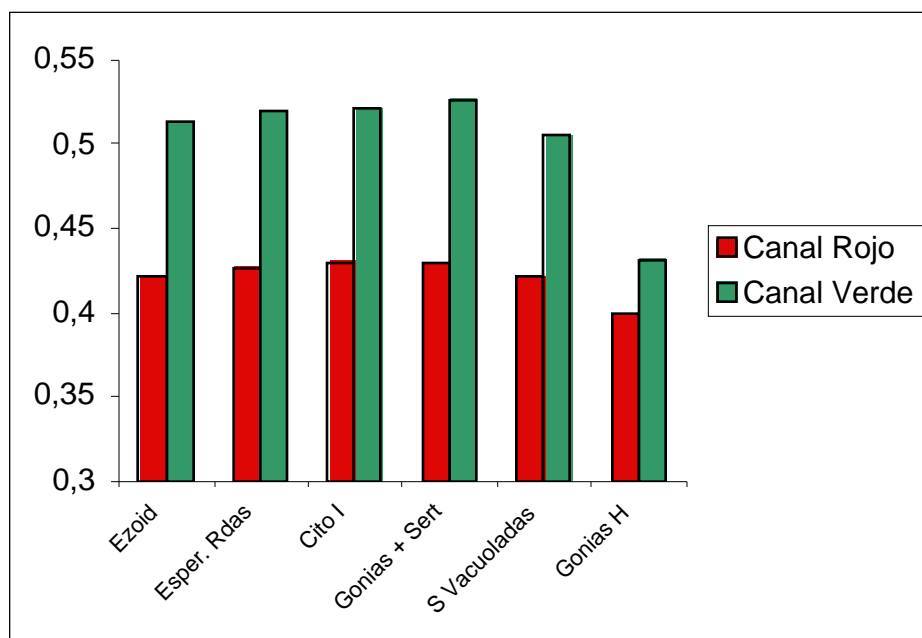


Figura 16. Comparación de la cuantificación microdensitométrica (canales rojo y verde) de la Intensidad de inmunotinción del RA en las células de Sertoli en los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis normal y en áreas de atrofia tubular focal que contienen células de Sertoli vacuoladas. Ezoid: espermatozoides; Esper Rdas: espermátides redondas; Cito I: espermatoцитos de 1^{er} orden; Gonias + Sert: espermatoгонias + Sertoli; S Vacuoladas: células de sertoli vacuoladas; Gonias H: espermatoгонias hematoxilina.

Una vez resueltos los patrones normales de la expresión del RA a todo lo largo del ciclo de células germinales y en la atrofia tubular propia de la senescencia, se ha cuantificado la expresión del RA en los testículos criptorquídicos extirpados en pacientes adolescentes y adultos que ya habían pasado la pubertad. Como bien ha quedado demostrado en la evaluación histológica de estas piezas quirúrgicas, la criptorquidia del adulto se caracteriza por una mezcla de diferentes patrones de maduración tubular presentes en el mismo testículo, de modo que, a veces, patrones muy diferentes aparecen en lobulillos testiculares contiguos. Con el fin de precisar mejor la cuantificación microdensitométrica del RA, hemos simplificado todo el espectro lesional en 5 patrones de tubos seminíferos del testículo criptorquídico: 1) Tubos seminíferos que presentan una diferenciación incompleta de espermatogénesis con diferenciación focal exclusivamente de espermatogonias y espermatocitos de 1^{er} orden (denominado con las siglas Criptorquid. Cito I); 2) tubos seminíferos con solo diferenciación de espermatogonias basales, en ausencia de diferenciación de espermatocitos de primer orden (denominado Criptorquid. Espermatogonia); 3) tubos seminíferos, con mayor diámetro, debido a que han experimentado un crecimiento después de la pubertad, pero que presentan un patrón de solo Sertoli con predominio de células de Sertoli de tipo adulto (denominado como Criptorquid Solo S. Adulto); 4) lobulillos testiculares constituidos exclusivamente por tubos seminíferos de pequeñas dimensiones con contornos muy irregulares y que tienen un patrón de solo Sertoli en el que la mayoría de las células de Sertoli son de tipo infantil, aunque con inmunomarcaje positivo del RA (Células RA +) (denominado como Criptorquid. Solo S. Infantil +), y 5) lobulillos testiculares, asimismo, constituidos exclusivamente por tubos seminíferos de pequeñas dimensiones con contornos muy irregulares y que tienen un patrón de solo Sertoli con predominio de células de Sertoli de tipo infantil, y carentes de inmunoexpresión de RA (Células RA-) (denominado como Criptorquid. Solo S. Infantil -). Los datos numéricos de la DOI de los canales RGB de la expresión del RA en estos diferentes patrones del testículo criptorquídico, con respecto al control (Grupos 4 y 5) se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación de la cuantificación microdensitométrica (canales RGB: rojo, verde y azul) de la intensidad de inmunotinción del RA en las células de Sertoli, localizadas en los diferentes patrones tubulares observados en los testículos criptorquídicos, en relación con los mismos patrones del grupo control.

Patrón Tubular	Rojo	Verde	Azul
Criptorquid. Solo S. Adulto	163,4 ± 3,4	151,0 ± 3,5	138,9 ± 2,8
Criptorquid. Solo S. Infantil +	156,3 ± 4,6	143,8 ± 6,8	139,5 ± 6,1
Criptorquid. Solo S. Infantil -	152,8 ± 1,8	143,0 ± 2,7	147,3 ± 2,3 ^a
Criptorquid. Cito I	162,0 ± 4,7	148,8 ± 6,9	138,4 ± 5,0 ^a
Criptorquid. Espermatogonias	161,6 ± 2,6	146,8 ± 3,7	134,8 ± 3,1 ^a
Normal Cito I	145,0 ± 7,0	121,9 ± 8,7	114,9 ± 8,4 ^b
Normal Espermatozoides	147,3 ± 7,1	124,0 ± 9,2	116,3 ± 9,2
Atrofia Tubular	145,3 ± 4,3	120,7 ± 8,3	111,9 ± 7,8 ^c

a: $p < 0.05$ respecto al grupo anterior; **b:** $p < 0.001$ respecto al estadio madurativo de espermatocito I del grupo de criptorquidia; **c:** $p < 0.001$ respecto al estadio madurativo de espermatogonias del grupo de criptorquidia.

Cuando se compara la expresión del RA en los diferentes patrones tubulares criptorquídicos con el patrón normal, se observa un doble comportamiento de la intensidad de tinción nuclear en las células de Sertoli: de una parte, todas las células de Sertoli tienen un evidente menor marcaje que las células de Sertoli presentes en los testículos normales, aunque en ambos grupos siempre son mayores los datos obtenidos de la DOI en el canal rojo con respecto al verde; de otra parte, es necesario destacar que mientras que en el testículo normal existe una homogeneidad de la altura de las barras en ambos canales, contrariamente, en los diferentes patrones tubulares del testículo criptorquídico existe una variación de la expresión del RA (Figura 17).

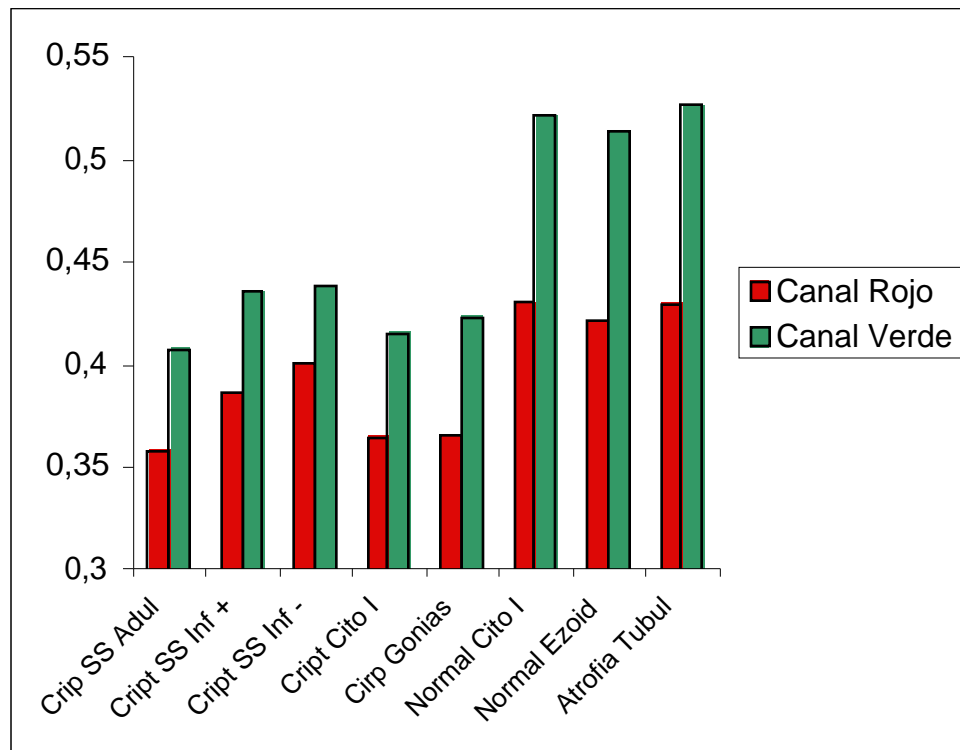


Figura 17. Comparación de la cuantificación microdensitométrica (canales rojo y verde) de la intensidad de inmunotinción del RA en las células de Sertoli, localizadas en los diferentes patrones tubulares observados en los testículos criptorquídicos, en relación con los mismos patrones del grupo control. Crip SS Adul: criptorquidia solo Sertoli adulto; Cript SS Inf+: criptorquidia solo Sertoli infantil positivas; Cript SS Inf-: criptorquidia solo Sertoli infantil negativas; Cript Cito I: criptorquidia espermatocitos de 1^{er} orden; Crip Gonias: criptorquidia espermatogonias; Normal Cito I: normal espermatocitos de 1^{er} orden; Normal Szoid: normal espermatozoides; Atrofia Tubul: atrofia tubular.

Esta disparidad de comportamiento del RA en el testículo normal y criptorquídico se comprueba mejor cuando se evalúa la proporción entre los canales rojo y verde observándose siempre una mayor intensidad de RA en el testículo normal con respecto al criptorquídico. Aparece una ligera disminución del RA en los patrones del testículo criptorquídico que carecen de diferenciación de la línea germinal; además, la proporción en el grupo de testículo criptorquídico con patrón de solo Sertoli de tipo infantil sin expresión del RA es la menor en todos los grupos estudiados (Figura 18).

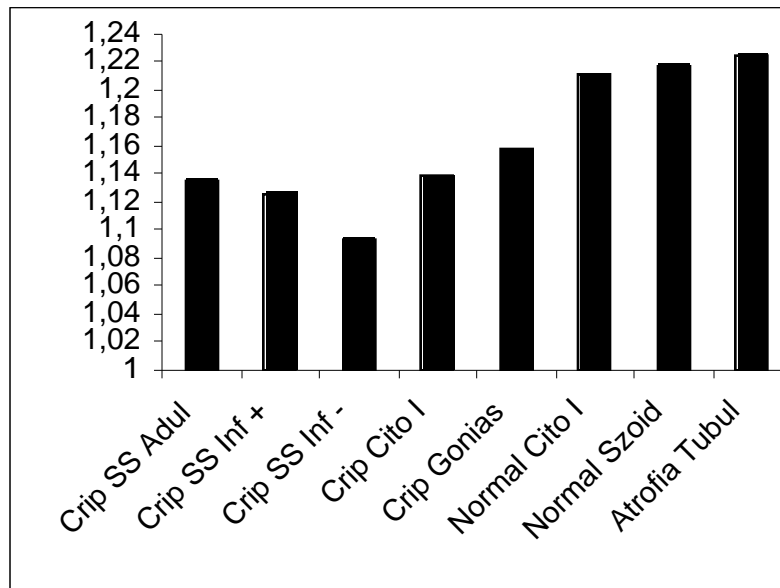


Figura 18. Proporción de la cuantificación microdensitométrica (canales rojo y verde) de la expresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli, en relación con los diferentes patrones tubulares del testículo criptorquídico, con respecto a los valores obtenidos en el grupo control. Crip SS Adul: criptorquidia solo Sertoli adulto; Cript SS Inf+: criptorquidia solo Sertoli infantil positivas; Cript SS Inf-: criptorquidia solo Sertoli infantil negativas; Cript Cito I: criptorquidia espermatocitos de 1^{er} orden; Crip Gonias: criptorquidia espermatogonias; Normal Cito I: normal espermatocitos de 1^{er} orden; Normal Szoid: normal espermatozoides; Atrofia Tubul: atrofia tubular.

Con el fin de resolver si existe un posible paralelismo en el comportamiento de la expresión inmunohistoquímica del RA de las células de Sertoli presentes en cada uno de los patrones tubulares del testículo criptorquídico, se ha realizado un estudio de correlación y su significación estadística, en cada uno de los canales RGB evaluados. En la tabla 4 se recogen los valores de correlación del canal azul, en la tabla número 5 los valores de correlación de los canales rojo y en la tabla 6 los valores de correlación del canal verde.

Los datos estadísticos obtenidos evaluando el canal azul de la intensidad de expresión del RA han demostrado una correlación positiva y significativa entre aquellos casos criptorquídicos en los que en el parénquima testicular se entremezclaban tubos seminíferos con diferenciación de espermatogonias basales, aunque sin progresión de la espermatogénesis, con todos los patrones de tubos con células de solo Sertoli de tipo disgenético. Con respecto al patrón de solo Sertoli, se ha demostrado una correlación inversa pero significativa, entre los que contenían células de Sertoli de tipo adulto y los de

aquellos tubos constituidos por células de Sertoli disgenéticas negativas al RA; sin embargo, esta significación sigue siendo inversa pero menos manifiesta ($p < 0.005$) cuando se comparan la tendencia de la intensidad del RA (canal azul) en los patrones de solo Sertoli con y sin expresión del RA (Tabla 4).

Tabla 4. Correlaciones de la cuantificación microdensitométrica (canal azul) de la expresión inmunohistoquímica del RA en las células de Sertoli presentes en los diferentes patrones tubulares de la criptorquidia, en comparación con los respectivos patrones normales.

Patrón Tubular	Solo Sert. Adulto	Solo Sert. Infantil +	Solo Sert. Infantil -	Criptorquid. Cito I	Criptorquid. Espermatogonias
Solo Sert. Adulto	---				
Solo Sert. Infantil +	t = - 0,29 p = 0,779	---			
Solo Sert. Infantil -	t = - 6,98 p = 0,0001	t = - 3,37 p = 0,005	---		
Criptorquid. Cito I	t = 0,26 p = 0,795	t = 0,34 p = 0,743	t = 4,40 p = 0,001	---	
Criptorquid. Espermatogonias	t = 3,51 p = 0,002	t = 2,48 p = 0,022	t = 10,06 p = 0,0001	t = 1,94 p = 0,069	---
Espermatogonias H-E	t = - 7,78 p = 0,0001	t = - 4,98 p = 0,0001	t = - 1,82 p = 0,083	t = - 5,22 p = 0,0001	t = 10,71 p = 0,0001

La valoración de la correlación estadística de la intensidad de expresión del RA en el canal rojo demuestra que los datos son heterogéneos; no obstante, cuanto más positiva es la inmun expresión del RA en los tubos seminíferos con crecimiento puberal y presencia focal de espermatogonias basales, menor es la cuantificación en los tubos disgenéticos con células de Sertoli maduras ($t = -3.64$; $p < 0.001$). Por último, cabe destacar que la correlación es positiva y significativa cuando se compara la intensidad del RA en los patrones de solo Sertoli de tipo adulto con los de solo Sertoli de tipo infantil con núcleos inmunomarcados (Tabla 5).

Por último, el poder discriminatorio, en relación con las determinaciones estadísticas de la correlación de la intensidad de inmunotinción del RA en el canal verde entre los

diferentes patrones tubulares del testículo criptorquídico, es completamente heterogéneo y no significativo (Tabla 6).

Tabla 5. Correlaciones de la cuantificación microdensitométrica (canal rojo) de la expresión inmunohistoquímica del RA en las células de Sertoli en diferentes patrones tubulares de la criptorquidia, en comparación con los respectivos patrones normales.

	Solo S. Adulto	Solo S. Infantil +	Solo S. Infantil -	Criptorq. Cito I	Criptorquidia Espermatogonias
Solo S. Adulto	---				
Solo S. Infantil +	t = 3,72 p = 0,002	---			
Solo S. Infantil -	t = 7,99 p = 0,0001	t = 2,00 p = 0,065	---		
Criptorq. Cito I	t = 0,67 p = 0,517	t = - 2,17 p = 0,053	t = - 5,05 p = 0,0001	---	
Criptorq. Espermatogonias	t = 1,56 p = 0,132	t = - 3,64 p = 0,001	t = - 8,52 p = 0,0001	t = - 0,27 p = 0,791	---
Espermatogonias H-E	t = 7,29 p = 0,0001	t = 1,96 p = 0,064	t = 0,14 p = 0,891	t = 7,89 p = 0,0001	t = - 4,65 p = 0,0001

Tabla 6. Correlaciones de la cuantificación microdensitométrica (canal verde) de la expresión inmunohistoquímica del RA en las células de Sertoli en diferentes patrones tubulares de la criptorquidia, en comparación con los respectivos patrones normales.

Patrón Tubular	Solo Sert. Adulto	Solo Sert. Infantil +	Solo Sert. Infantil -	Criptorquid. Cito I	Criptorquid. Espermatogonias
Solo Sert. Adulto	---				
Solo Sert. Infantil +	t = 2,83 p = 0,013	---			
Solo Sert. Infantil -	t = 5,24 p = 0,0001	t = 0,29 p = 0,776	---		
Criptorquid. Cito I	t = 0,81 p = 0,434	t = - 1,30 p = 0,220	t = - 2,17 p = 0,052	---	
Criptorquid. Espermatogonias	t = 2,76 p = 0,011	t = - 1,44 p = 0,164	t = - 2,56 p = 0,018	t = - 0,85 p = 0,407	---
Espermatogonias H-E	t = 3,41 p = 0,002	t = - 0,50 p = 0,623	t = - 1,09 p = 0,290	t = - 1,44 p = 0,166	t = 1,26 p = 0,219

Detección del Receptor de Andrógenos Mediante Métodos de PCR

La detección del receptor de andrógenos mediante métodos de PCR ha sido realizada en piezas de orquiectomía extirpadas en pacientes con criptorquidia, con síndrome de insensibilidad a los andrógenos y en casos de autopsia sin patología testicular. La relación de muestras analizadas y la concentración de DNA obtenida de cada una de ellas queda reflejada en la tabla 7. Para determinar la concentración de DNA se ha utilizado como Blanco: 100 μl de H_2O estéril, para las Muestra: 5 μl de DNA + 95 μl de H_2O estéril.

En el gel de agarosa, se ha utilizado el marcador de peso molecular recogido en la figura 19. Como control negativo (C-), se ha usado H_2O en lugar de DNA y como control normal positivo, DNA no testicular procedente de piel humana masculina de un paciente normal. Debido a que al principio no se obtenían bandas definidas, se realizaron diluciones de las muestras para obtener una concentración aproximada de 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, concentración similar a la de la muestra control (C3). Las figuras 20 y 21 son ejemplos de los resultados obtenidos en la detección del fragmento del gen del RA que contiene los triplete CAG por PCR. En todos los casos, independientemente de la patología, se obtiene una banda de 400 bp. Hay que destacar que la sensibilidad del método es de un máximo de 30 bp, es decir, que las diferencias de menos de 10 repeticiones no son detectables.



Figura 19. Marcadores de peso molecular utilizados en el gel de agarosa.

Tabla 7. Medida de la concentración de DNA en las muestras procedentes de piel humana masculina (control positivo), testículo normal (control), síndrome de insensibilidad a los andrógenos (AIS) y criptorquidia.

MUESTRA	DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	DNA/RNA
Piel Humana		
C1	0,0779	1,78
C2	0,0921	1,77
C3	0,1059	1,79
Testículo Normal		
R1	1,9715	1,84
R2	1,1135	1,67
R3	0,8854	1,70
AIS		
R4	2,3411	1,92
R5	1,1845	1,81
R6	1,0649	1,76
R7	1,8520	1,71
Criptorquidia		
R8	1,5204	1,66
R9	1,1944	1,46
R10	0,6340	1,65
R11	0,3510	1,54
R12	1,3612	1,67
R13	0,5425	1,59
R14	0,0494	1,15
R15	0,0685	1,66
R16	1,2079	1,90
R17	0,2587	1,78
R18	0,4585	1,66
R19	0,6703	1,68
R20	0,9944	1,77
R21	1,1342	1,89

DNA/RNA: (R260/280)

	C	PH	TN	AIS	AIS	AIS	Crip	Crip	Crip
PM	-	3	1	4	5	6	13	16	21

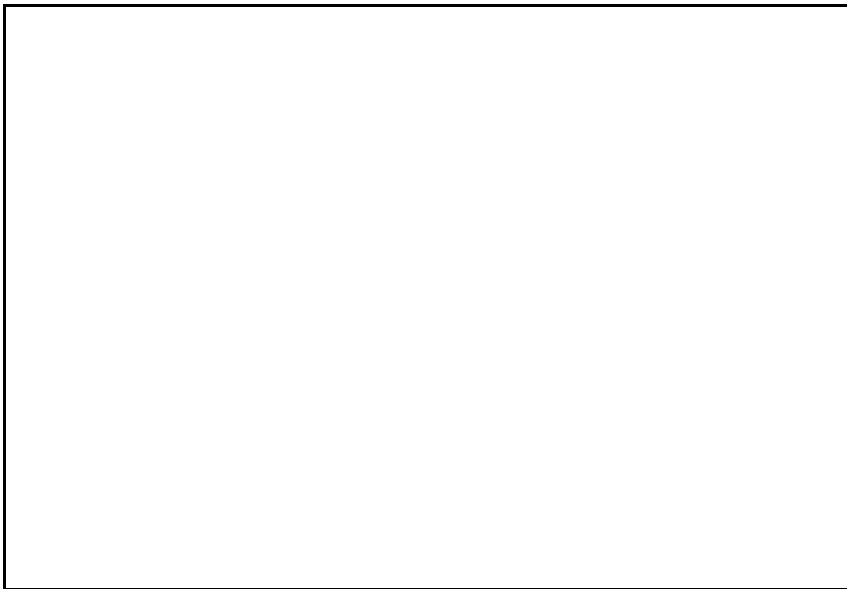


Figura 20. Detección de los triplete CAG en el receptor de andrógenos por PCR. PM: peso molecular; C -: control negativo; PH: piel humana, control positivo; TN: testículo normal; AIS: síndrome de insensibilidad a los andrógenos; Crip: criptorquidia.

	C	PH	AIS	Crip	TN	Crip	AIS	Crip	AIS
PM	-	2	4	21	1	16	5	13	6 PM




Figura 21. Detección de los triplete CAG en el receptor de andrógenos por PCR PM: peso molecular; C-: control negativo; PH: piel humana, control positivo; AIS: síndrome de insensibilidad a los andrógenos; Crip: criptorquidia; TN: testículo normal.

Fig. 1. Expresión del RA en el testículo normal

a) Tubo seminífero normal con espermatogénesis conservada. La mayoría de las células de Sertoli presentan intensa expresión nuclear del RA, aunque varía de unas células a otras. La pared peritubular es fina y destacan varias células mioides con evidente marcaje del RA intranuclear. Nótese que todas las células de la línea germinal carecen de RA.

b) Sección tangencial de un tubo seminífero en donde se demuestra una intensa inmunorreactividad intranuclear del RA en la mayoría de las células de Sertoli, estando ausente el inmunomarcaje en las células germinales, las cuales, en algunas áreas, están descamadas a la luz.

c) La imagen representa dos secciones tubulares con ligera dilatación luminal y moderada disminución de la altura del epitelio seminífero. En la sección superior, la inmunorreactividad del RA es idéntica en todas las células de Sertoli; sin embargo, en la sección inferior existen segmentos tubulares, con distinta inmunorreactividad, siendo menor en el área donde se localiza la asociación de espermátocitos de primer orden y espermátides inmaduras.

d) Sección transversal de un tubo seminífero en el que todo el segmento luminal está ocupado por espermátidas redondas. Los núcleos de las células de Sertoli subyacentes contienen una alta expresión del RA.

Fig. 2. Expresión del RA en lesiones focales de la espermatogénesis

a) La mayor parte de los tubos seminíferos muestran espermatogénesis conservada con diferentes estadios madurativos. Sólo focalmente existe una disminución de la altura del epitelio del tubo seminífero, asociado a espacios vacíos (“vacuolas”) en la porción adluminal del epitelio; sin embargo, aparentemente no existen cambios relevantes de la expresión intranuclear del RA en las células de Sertoli.

b) Maduración completa con abundantes espermatozoides, en contigüidad con otro estadio con espermatoцитos de primer orden. En ambos estadios existen pequeñas vacuolas del citoplasma de las células de Sertoli, pero no se evidencia cambio aparente del RA en las células de Sertoli presentes en ambos estadios madurativos.

c) Destaca el intenso marcaje intranuclear del RA de las células de Sertoli en áreas de espermatogénesis conservada, con respecto a otras de marcada hipoespermatogénesis. Los núcleos de las células de Sertoli presentes en las áreas del epitelio con vacuolas no experimentan cambios significativos del inmunomarcaje del RA.

d) Tubo seminífero con descamación celular intraluminal. Se aprecia una variada reactividad del RA, que es máxima en aquellas células de Sertoli localizadas en las áreas más maduras y que disminuye progresivamente en las áreas de hipoespermatogénesis y de formación de cavidades intraepiteliales.

e) Se observa todo un espectro de lesiones que incluye desde áreas con espermatogénesis conservada a otras con moderada o incluso atrofia del epitelio germinal, asociadas a la formación de grandes vacuolas intraepiteliales. En estas áreas, la intensidad del RA es aparentemente menor, si se compara con la intensa inmunorreactividad del RA en las áreas con espermatogénesis conservada. Las células mioides muestran escasa inmunotinción. En el intersticio se observan algunas células de Leydig con moderada inmunoeexpresión del RA.

Fig. 3. Expresión del RA en tubos con hipoespermatogénesis intensa

a) Se observa una importante descamación del epitelio tubular, asociado a intensa atrofia de las células germinales. La mayoría de los núcleos de las células de Sertoli presentan una robusta inmunotinción para el RA.

b) Marcada dilatación luminal asociada a intensa hipoespermatogénesis, solo muy focalmente se observa diferenciación de espermátides elongadas. Existe todo un espectro de densidad de inmunotinción del RA, el cual está ausente en aquellas áreas de máxima lesión epitelial.

c) La hipoespermatogénesis es moderada y el marcaje del RA de las células de Sertoli es homogéneo, si se compara con la figura anterior.

d) Nótese la pequeña variabilidad del inmunomarcaje del RA, en contraposición con la importante alteración de la maduración de las células germinales.

e) Importante atrofia del epitelio germinal en donde predominan las áreas de un patrón de solo Sertoli, asociado a importantes pseudovacúolas de atrofia epitelial; sin embargo, persiste un evidente marcaje del RA.

f) Diferentes grados de hipoespermatogénesis sin cambios aparentes de la intensidad de tinción del RA.

Fig. 4. Expresión del RA en el recién nacido y durante la infancia temprana

a) Tubo seminífero hipercurvado en un testículo normalmente distendido. La mayoría de las células de Sertoli están desordenadas en el tubo seminífero, pero presentan una moderada o intensa inmunoexpresión del RA; contrariamente, las células germinales carecen de inmunomarcaje. Las células mioides peritubulares y los fibroblastos intersticiales solo muestran trazas de inmunotinción.

b) Muestra testicular de un niño de tres años de edad. Nótese una mejor organización de los tubos seminíferos. La mayoría de los núcleos de las células de Sertoli son negativos o sólo muestran vestigios del RA, siendo excepcionalmente los núcleos que presentan mayor inmunomarcaje. Las espermatogonias basales son rigurosamente negativas y la mayoría de las células intersticiales no muestran inmunotinción.

c) Intensa inmunoexpresión del RA de los núcleos de las células principales del conducto epididimario del mismo paciente que la figura anterior. Nótese la débil tinción de las células basales epiteliales y de las células musculares lisas.

Fig. 5. Expresión del RA en el testículo pre-puberal

a) Tubos seminíferos formados exclusivamente por células de Sertoli y espermatogonias. La expresión del RA en las células de Sertoli es muy variable: predominan las células negativas, aunque existen algunas células con robusto inmunomarcaje nuclear. Solo algunas células intersticiales y peritubulares expresan trazas del RA.

b) Parénquima testicular con evidentes signos de maduración prepuberal, caracterizado por un mayor diámetro tubular y diferenciación de espermatoцитos de primer orden. Destaca una intensa tinción intranuclear en todas las células de Sertoli y algunas células intersticiales. En el intersticio algunas células de Leydig inmaduras muestran inmunomarcaje aunque la mayoría son negativas.

Fig. 6. Expresión del RA en el testículo puberal

a) Tubo seminífero puberal revestido por espermatogonias basales y abundantes células de Sertoli que delimitan una amplia luz. La mayoría de los núcleos de las células de Sertoli son RA positivos, aunque otros sólo muestran vestigios o carecen de RA. Todas las células mioides de la pared peritubular expresan el RA.

b) Dos secciones tubulares con diferenciación focal de espermátides elongadas. Todavía persiste una desorganización de los núcleos de las células de Sertoli, los cuales contienen abundante RA. Las células germinales carecen de RA. Las células mioides son RA positivas. La mayoría de las células de Leydig peritubulares expresan RA.

c) Testículo puberal con espermatogénesis completa. La mayoría de los núcleos de las células de Sertoli contienen un robusto marcaje del RA, lo que contrasta con el tenue marcaje de las células mioides peritubulares adyacentes.

Fig. 7. Expresión del RA en tubos seminíferos de testículo puberal criptorquíidico formado exclusivamente con patrón de solo Sertoli

a) Se observan tubos seminíferos de moderadas dimensiones, rodeados por una gruesa pared peritubular, el tubo inferior muestra espermatogénesis incompleta con diferenciación focal de espermátocitos de primer orden y espermátides inmaduras, otros tubos seminíferos solo contienen espermatogonias basales asociadas a células de Sertoli. Las células de Sertoli presentan un citoplasma bajo y denso y la expresión del RA en los núcleos está disminuida, y en algunas células sólo quedan vestigios del receptor o la inmunotinción es negativa. En el tubo superior la expresión del RA es aún menor, sobre todo en las áreas de patrón de solo Sertoli y que carecen de espermatogonias. Las células mioides muestran trazas del RA y también algunas células de Leydig son RA positivas.

b) Tubos con diferenciación postpuberal de pequeño tamaño, con desorganización de las células de Sertoli, las cuales presentan variable inmunomarcaje del RA. En el intersticio, la mayoría de células de Leydig muestran evidente y visible inmunomarcaje nuclear del RA.

c) Tubos seminíferos con predominio de patrón de solo Sertoli, importante heterogeneidad de intensidad de expresión del RA, si se compara con la intensa inmunotinción de las células de Leydig adyacentes.

Fig. 8. Expresión del RA en tubos seminíferos de testículo puberal criptorquíidico formado exclusivamente con patrón de solo Sertoli

- a) Los núcleos de las células de Sertoli son pequeños, redondos y con nucleolo poco evidente, estando la tinción del RA muy disminuida.
- b) Tubos seminíferos disgenéticos, con células de Sertoli muy inmaduras que carecen de RA, sólo las células de Sertoli más diferenciadas, con núcleo mayor y nucleolo evidente presentan vestigios de inmunotinción.

Fig. 9. Expresión del RA en tubos seminíferos de testículo puberal criptorquídic formado exclusivamente con patrón de solo Sertoli

a) Se observan diferencias ostensibles entre la moderada tinción del RA en el tubo que ha experimentado crecimiento postpuberal, con respecto a la ausencia de inmunomarcaje en los tubos disgenéticos.

b) Testículo disgenético con tubos muy inmaduros constituidos exclusivamente con células de Sertoli indiferenciadas RA negativas. Adyacentemente, se observa un tubo con crecimiento postpuberal y diferenciación focal de espermatogonias basales y células de Sertoli disgenéticas, aunque con mayor grado de diferenciación y evidente marcaje de inmunorreceptor.

c) A la derecha de la imagen se observan tubos disgenéticos RA negativos. Además, en esta área el intersticio es virtual y no se distinguen células de Leydig. En la vecindad, existe parénquima testicular que ha experimentado la maduración puberal, evidenciándose un mayor marcaje del RA en los núcleos de las células de Sertoli y en los nódulos intersticiales de las células de Leydig.

d) Tubos criptorquídicos de tipo postpuberal con marcada atrofia del epitelio y cambios disgenéticos en algunas células de Sertoli, las cuales presentan tenue inmunotinción del RA, si se compara con el robusto marcaje intranuclear en las células de Sertoli más inmaduras.

Fig. 10. Expresión del RA en piezas de orquiectomía procedentes de un paciente diagnosticado de síndrome de AIS

a) Tubos seminíferos con un patrón de solo Sertoli de tipo infantil. La mayoría de los núcleos de las células de Sertoli son RA positivas, aunque algunos núcleos son rigurosamente negativos y otros sólo muestran vestigios del RA. El intersticio contiene abundantes acúmulos de células de Leydig que no muestran inmunomarcaje del RA.

b) En el mismo testículo, se observan lobulillos constituidos por tubos seminíferos de pequeño tamaño, con fina pared peritubular y en cuyo interior las células de Sertoli son de tipo disgenético fetal, no evidenciándose expresión de RA o sólo mínimas trazas a nivel nuclear. En el intersticio, las células de Leydig son escasas e inmaduras y algunos fibroblastos presentan marcaje de RA.

c) Tubos seminíferos en diferente grado de maduración, en los que predominan las células de Sertoli de núcleo redondo RA negativas. No obstante, algunas células de Sertoli presentan moderado inmunomarcaje.

d) Fibrosis intersticial con abundantes acúmulos de células de Leydig RA negativas. Se representa un tubo seminífero muy disgenético con escasa expresión del RA en las células de Sertoli. En la vecindad, un conducto recto dilatado quísticamente y revestido por un epitelio atrófico en el que predominan células RA negativas.

Fig. 11. Biopsia testicular de un paciente diagnosticado de síndrome de AIS

a) Extensa hiperplasia de células de Leydig que muestran moderado citoplasma, núcleos redondos y ausencia de expresión del RA. Los tubos seminíferos son muy inmaduros y predominan células de Sertoli muy disgénéticas, de núcleo fusiforme y rigurosamente RA negativas; Adyacentemente, se observan también células de sertoli de núcleo redondo con citoplasma vesiculoso y vestigios de expresión del RA. la pared peritubular contiene células mioides con abundante marcaje nuclear del RA.

b) Destaca una intensa expresión del AR en las células peritubulares y en la mayoría de las células de Sertoli disgenéticas, si se compara con la ausencia de inmunomarcaje de la mayoría de las células de Leydig hiperplásicas adyacentes.

Fig. 12. Pieza de orquiectomía extirpada en un niño diagnosticado de síndrome de AIS

a) La mayoría de los tubos seminíferos son inmaduros y están constituidos exclusivamente por un patrón de solo Sertoli con núcleos redondos, siendo la inmunotinción mínima o ausente. La pared peritubular es muy fina y está formada por una sola capa discontinua de células mioides, alguna de las cuales muestra expresión del RA. Se observan células intersticiales con variable inmunotinción del RA.

b) Sección oblicua de la porción inicial del conducto propio del epidídimo del caso anterior. El epitelio de revestimiento es cúbico simple y destaca una intensísima expresión del RA en la mayoría de los núcleos de las células epiteliales, si se compara con la mínima inmunoexpresión en el intersticio periductal y en las células de Sertoli de la imagen anterior.

***Fig. 13. Pieza de orquiectomía extirpada en un paciente puberal con
síndrome de Klinefelter***

a) Extensa hiperplasia de células de Leydig carentes de inmunotinción del RA. Estas células se entremezclan con células fusiformes inmaduras de tipo fibroblástico y con moderado inmunomarcaje. En el centro de la imagen, se observa un único tubo seminífero en cuyo interior se visualizan escasas células de Sertoli disgenéticas con variable intensidad de expresión del RA.

b) Extensa hiperplasia de células de Leydig que rodean a un tubo seminífero constituido exclusivamente por células de Sertoli disgenéticas, de núcleos redondos o fusiformes y con escasa expresión del RA.

Fig. 14. Pieza de orquiectomía extirpada en un paciente adulto con síndrome de Klinefelter

a) Secciones de tubos seminíferos de moderado diámetro y que han experimentado el crecimiento postpuberal. La pared peritubular está ligeramente engrosada y en el interior se observa un epitelio pseudoestratificado constituido exclusivamente por células de Sertoli con núcleos disgenéticos que aún conservan una moderada inmunoexpresión del RA. No se evidencia diferenciación de células germinales.

b) Detalle de un lobulillo del caso anterior formado por tubos seminíferos con un patrón de solo Sertoli, con células disgenéticas dispuestas anárquicamente. Nótese la ausencia de inmunotinción de RA en las células de Sertoli, si se compara con la robusta inmunotinción en los núcleos de las células mioides peritubulares adyacentes y de los fibroblastos intersticiales.

c) En el detalle, se observan abundantes células de Leydig. Sus núcleos son disgenéticos y carecen de expresión del RA, lo cual es más evidente si se compara con el fuerte marcaje del RA en los fibroblastos intersticiales adyacentes. En la vecindad, se observa un segmento de un tubo seminífero con pared muy hialinizada, y células mioides con variable marcaje del RA. Las células de Sertoli son muy disgenéticas y muestran todo un espectro de inmunoexpresión del RA, desde núcleos moderadamente positivos hasta núcleos rigurosamente negativos.

DISCUSIÓN

La regulación de la espermatogénesis está determinada por una integridad morfofuncional de las células de Sertoli, que en el caso de los testículos de mamíferos está constituida por uniones estrechas especializadas entre las células de Sertoli adyacentes, las denominadas uniones Sertoli-Sertoli. Además, las células de Sertoli son unas células muy polarizadas que sintetizan las moléculas constitutivas de la membrana basal, y se adhieren a la misma por hemidesmosomas. Esta polarización del citoplasma de las células de Sertoli determina movimientos selectivos de las moléculas e intercambios de moléculas entre la pared peritubular, las propias células de Sertoli y las células de la línea germinal. De hecho, las uniones específicas Sertoli-Sertoli condicionan la formación de la denominada barrera hematotesticular, que es la barrera específica determinante del paso de macromoléculas y de otros productos desde el compartimento basal de los tubos seminíferos (formado por las espermatogonias y la porción subnuclear de las células de Sertoli) y el compartimento adluminal, en el cual las células de Sertoli se relacionan con elementos celulares meióticos y postmeióticos de la espermatogénesis, gracias al establecimiento de uniones específicas Sertoli-espermátidas. Todos estos datos estructurales también favorecen una perfecta sincronización entre la oferta de testosterona al tubo seminífero y la adecuada expresión del RA en las células de Sertoli. En este sentido, se ha demostrado que la testosterona, actuando a través del RA, regula la expresión de claudina III componente específico de las uniones Sertoli-Sertoli; pero además, la alteración del RA incrementa la permeabilidad de la barrera hematotesticular, lo que favorece el paso de moléculas indeseables a través de las uniones Sertoli-Sertoli. Por todo ello, se sugiere que la acción de los andrógenos en las células de Sertoli regula la diferenciación de las células germinales, controlando el microambiente de los tubos seminíferos.¹⁸⁸

En el presente estudio, se ha evaluado morfológica y densitométricamente la expresión inmunohistoquímica del RA; de una parte, en hombres de edad avanzada con respecto al grupo control, constituido por testículos de hombres jóvenes que fueron autopsiados y que no tenían enfermedades primarias o secundarias de reconocida afectación de la estructura y función testiculares; además, de otra parte, se ha evaluado la expresión del RA en tres enfermedades congénitas en las que el testículo se encuentra muy dañado, como son la criptorquidia, el síndrome de feminización testicular (síndrome de insensibilidad a los andrógenos completo, CAIS, y la variante incompleta, IAIS) y, por último, en pacientes en los que se efectuó el diagnóstico de síndrome de Klinefelter durante su consulta por

infertilidad. En algunos casos particulares de síndrome de Klinefelter, estaba indicado realizar una biopsia testicular para confirmar el diagnóstico, emitir un juicio pronóstico y obtener gametos con el fin de efectuar técnicas de reproducción asistida, ya que consultaron por infertilidad.

La intensidad de la inmunoeexpresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli de los casos patológicos y del grupo control se determinó mediante el uso de un microdensitómetro Leica, constituido por un programa morfométrico y digitalizando directamente las imágenes histológicas. Con el fin de realizar mediciones aleatorias, se eligieron campos microscópicos al azar de todos y cada uno de los casos estudiados, usando preparaciones inmunohistoquímicas para la detección del epítipo del RA, el estudio aleatorio se efectuó mediante una tabla de números aleatorios. La identificación de los diferentes patrones histológicos tubulares se realizó por dos investigadores (E.-D. G. y J. R.), emitiendo un diagnóstico secreto el cual fue después consensuado. Una vez establecido el diagnóstico del patrón de asociación tubular o del patrón lesional, se procedió a la identificación de todas las células de la imagen digitalizada con un objetivo de 20 aumentos.

Las medidas microdensitométricas del RA se realizaron en los tres canales RGB que constituyen cada color. Todas las preparaciones en las que se realizó el estudio inmunohistoquímico para la detección del RA se tiñeron además con la tinción nuclear de Hematoxilina (núcleos de color azul), con el fin de identificar también los núcleos de las células de Sertoli sin expresión de este receptor; por ello, lo primero que determinamos fueron las posibles modificaciones que esta contratinción nuclear podría provocar en los resultados cuantitativos del grado de inmunotinción del RA.

En el presente estudio, hemos considerado como tinción de fondo nuclear la tinción azul que origina la hematoxilina, los datos del canal azul, obtenidos en la cuantificación microdensitométrica de los núcleos de las espermatogonias basales, los cuales rigurosamente carecen de expresión del RA, tanto cuando se emplean métodos inmunohistoquímicos, como cuando se emplean métodos bioquímicos y de biología molecular. Hubiera sido posible considerar como control del canal azul las propias células de Sertoli dispuestas en relación con aquellos estadios madurativos de la espermatogénesis que carecen de RA,³¹⁹ pero es posible que vestigios de inmunotinción, imperceptibles para el poder discriminatorio del ojo humano, pudieran sesgar los datos microdensitométricos de

control negativo de inmunotinción. Por ello, una vez conocido este valor basal, se ha cuantificado la expresión del RA (canal azul) de los núcleos de las células de Sertoli localizadas en seis estadios madurativos correspondientes a las seis asociaciones de las células de la línea germinal humana,⁴⁹ pero también los valores del RA en las células de Sertoli en aquellas áreas de atrofia del epitelio seminífero (grupo 5), caracterizadas por la presencia de espacios vacíos en el epitelio tubular, consecuencia de la pérdida patológica de células germinales meióticas y postmeióticas. Estas asociaciones están integradas dentro de los mecanismos de regulación paracrina testicular, ya que no se dispone al azar, antes bien se relaciona con peculiaridades morfológicas y funcionales de las células de Leydig del hombre normal,²⁴¹ estas células se disponen en íntima vecindad de la capa externa de la pared peritubular -por ello, se denominan células de Leydig peritubulares, distintas de las células de Leydig intersticiales-, en donde se encuentran también células mioideas que expresan RA y, a diferencia de las células de Sertoli, siempre de forma e intensidad constantes.

En aquellos tubos seminíferos normales que conservan una espermatogénesis completa, la mayoría de las células de Sertoli presentan intensa expresión nuclear del RA, aunque su intensidad es variable de unas células a otras, dependiendo, en parte, del estadio madurativo de la espermatogénesis; sin embargo, todas las células de la línea germinal, incluidas las espermatogonias basales, carecen rigurosamente de expresión inmunohistoquímica del RA. Estos datos permiten confirmar que la regulación de la espermatogénesis en el testículo humano normal, al igual que lo que ocurre en roedores y en primates no humanos, la formación de los diferentes estadios madurativos tubulares es un proceso que depende de la acción de los andrógenos sobre las células de Sertoli.³³⁵

El presente estudio de inmunorreactividad del RA en el testículo humano normal, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-RA comercializado, confirma además el estudio previamente publicado en el mismo laboratorio, usando un anticuerpo policlonal anti-RA no comercializado, lo cual confirma que la inmunorreactividad del RA es moderadamente menor en el área donde se localiza la asociación de espermátocitos de primer orden y espermátides inmaduras, estadio madurativo en el que los procesos de mitosis y de meiosis de las células germinales han concluido. Estos datos acerca de la regulación de los procesos del ciclo celular en relación con la expresión del RA en humanos son sugerentes y aún no

han sido, en nuestro conocimiento, explorados en el testículo humano. En este sentido, no obstante, la relación del RA con el ciclo celular sí se ha investigado en las células de Sertoli prepuberales de la rata; en concreto, la inmunexpresión intranuclear de ciclina D2 aparece claramente en el día 10° postnatal y persiste hasta el día 35°, para desaparecer en las ratas adultas. Estudios de microscopía confocal demuestran la co-expresión del RA y de ciclina D2 dentro del mismo tubo seminífero. En ratones, la destrucción selectiva del RA en las células de Sertoli determina alteraciones de la inmunexpresión de ciclina D2. Estos estudios demuestran que no existe un papel específico en el ciclo celular de la ciclina D2 en las células de Sertoli maduras que se localizan específicamente en aquellos estadios madurativos de la espermatogénesis del ratón; los cuales son regulados selectivamente por la acción de los andrógenos y por la expresión del RA.³³⁵

En relación con la espermatogénesis conservada (testículos del grupo control de hombres adultos normales), no se han encontrado diferencias en la intensidad de tinción del RA de las células de Sertoli, cuando se comparaban aquellas áreas del tubo seminífero con diferenciación de una espermatogénesis completa (grupo 4) -en las que se veían abundantes espermátides elongadas- con aquellos otros segmentos del tubo seminífero normal en los que el estadio madurativo sólo alcanzaba hasta la diferenciación de espermátides redondas o, incluso, hasta la diferenciación de espermátocitos de 1^{er} orden.

Con el fin de corroborar nuestros hallazgos morfológico-descriptivos y de obtener una mayor objetividad de los resultados, se procedió a realizar estudios microdensitométricos estáticos del RA. Para ello, la cuantificación de la intensidad del color marrón en los núcleos de las células de Sertoli -color resultante del revelado de la inmunotinción con diaminobencidina del método de Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) y de cuya mezcla surgen las diferentes gamas de colores marrón-pardos- se valoró en los canales rojo y verde del espectro de color RGB de la imagen digitalizada. Los datos cuantitativos de la densidad óptica integrada (DOI), representados gráficamente en el presente estudio mediante el número inverso de la DOI, demuestran que la intensidad de expresión del RA de los núcleos de las células de Sertoli no varía en los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis normal, incluso en aquellos segmentos del tubo seminífero en los que el estado del ciclo celular aún se encuentra en la fase de divisiones mitóticas (señalados en el gráfico como el estado madurativo constituido exclusivamente por espermatogonias y

células de Sertoli) previas a los procesos de formación de espermatoцитos de 1^{er} orden, y de procesos meióticos y postmeióticos. Estos datos numéricos ponen de manifiesto la subjetividad de la cuantificación de la intensidad del color cuando se realiza por simple estudio visual de la preparación, tal como incluso nos ha ocurrido durante la evaluación de nuestro material. Además, curiosamente, sí se encontró una ligera mayor expresión del RA en las células de Sertoli en aquellas áreas del tubo seminífero en las que las únicas células germinales presentes eran espermatogonias basales. Aunque es especulativo, pudiera sugerirse que existe un exceso de expresión del RA, lo cual es necesario para activar todos los procesos de señalización y regulación hormonal que intervienen en al mitosis y antes o durante el inicio de la primera división meiótica.

En los segmentos del tubo seminífero atrófico, contrariamente a lo que ocurre cuando la espermatogénesis está coservada, la proporción entre estos dos canales rojo y verde de la intensidad de la expresión nuclear del RA en las células de Sertoli está disminuida; aunque aparentemente no existen cambios relevantes de la expresión intranuclear del RA en las células de Sertoli. En este sentido, cabe precisar que estas áreas se asocian con la formación de espacios vacíos (“las denominadas vacuolas de los tubos seminíferos”), dispuestas en la porción adluminal del epitelio, consecuencia de la pérdida de células espermatogénicas.

Se sabe que las gonadotropinas tienen como acción principal mantener la función de las células somáticas testiculares; de hecho, son los andrógenos, y primariamente la testosterona, quienes actúan sobre las células somáticas para regular la diferenciación de las células germinales. El mantenimiento de la espermatogénesis por la testosterona se realiza por la acción directa de la FSH y la LH que, a su vez, regulan la actividad de las células somáticas del testículo. La LH controla la producción de testosterona por las células de Leydig; mientras que la FSH actúa de forma indirecta a través de las células de Sertoli, dado que las células germinales carecen de receptores para esta hormona, por lo que influye indirectamente en la espermatogénesis.²⁹⁷ La activación de receptores esteroideos específicos, por medio de la traslocación reversible del complejo esteroide-receptor esteroideo hacia el núcleo, sitio donde se une al DNA, provoca o inhibe la transcripción de determinados genes imprescindibles en la regulación funcional del testículo. Estudios recientes de destrucción de la función del RA han demostrado que es un requisito imprescindible la participación de los andrógenos y del RA en los procesos de señalización

que regulan la espermatogénesis.¹¹⁸

Está establecido que la activación funcional del RA en la células de Sertoli depende de los niveles intratesticulares de testosterona y de dihidrotestosterona.³¹² Las células de Sertoli del testículo adulto, además de contener receptores nucleares para los andrógenos, también contienen en el núcleo receptores de estrógenos tipo Beta.³¹²

Pero además, los mecanismos de señalización de las células de Sertoli normales dependen de la regulación del RA mediada por las hormonas esteroideas, manteniendo la normal estructura y función de la células de Sertoli. En este sentido, los andrógenos, a través de la regulación de los RA, determinan la normal constitución en las células de Sertoli de su citoesqueleto rico en filamentos intermedios de vimentina y filamentos finos de actina, además de retículo endoplásmico liso, un número variable de mitocondrias y la presencia de lisosomas primarios y secundarios. Sin embargo, en la patología congénita testicular, incluida la criptorquidia, las células de Sertoli cambian el perfil inmunohistoquímico normal, incrementando los filamentos de vimentina y sobretodo de queratinas de bajo peso molecular y aumentando el número de lisosomas secundarios y de cuerpos residuales.

Y estas consideraciones acerca de la regulación autocrina del RA sobre las células de Sertoli, recientemente han sido corroboradas mediante estudios experimentales; en los que el diseño de un modelo de ratón “knock-out” de RA específico de las células de Sertoli ha permitido ver que la expresión de vimentina en las células de Sertoli está significativamente incrementada, y la laminina está disminuida; lo que sugiere una relación íntima de los defectos del citoesqueleto de las células de Sertoli con las alteraciones de los mecanismos de unión de las propias células de Sertoli a la lámina basal. De otra parte, cuando existe defecto de la expresión del RA, se produce una alteración de la síntesis de claudina y ocludina, que son dos moléculas que sellan las carillas laterales de las células de Sertoli y que están relacionadas con las uniones Sertoli-Sertoli; la disminución de estas moléculas de comunicación celular en estos ratones “knock-out” conducen a una alteración de la integridad de la barrera hematotesticular. En esos ratones con defectos del RA, también existe disminución de la transferrina, una molécula indicadora de la función normal de las células de Sertoli; por ello, en estos ratones con alteración del gen del RA se producen defectos funcionales importantes de las células de Sertoli en la producción y secreción de

proteasas, proteínas de transporte, y factores paracrinos, que conducen a alteraciones en la maduración y normal función de las células germinales.³⁶⁸

Los resultados previamente descritos en estos modelos experimentales confirman, además, la teoría bien establecida de que los andrógenos participan en mecanismos de regulación no genómica en numerosas células somáticas. Se sabe que en muchas de estas células somáticas, se producen señales de transducción determinadas por los andrógenos que actúan sobre otros receptores de superficie celular, los cuales regulan una gran variedad de funciones celulares.³⁶⁶ Además de esta vía alternativa de señalización mediada por andrógenos, los andrógenos pueden actuar por una vía clásica de estimulación del RA.³⁶⁶ De hecho, varios mensajeros secundarios pueden ser activados por los andrógenos.³⁶⁶ Cada uno de estos segundos mensajeros es capaz de activar múltiples quinasas (cascada MAP quinasa).³⁶⁶ Esta serie de reacciones quinasa son capaces de alterar la actividad de determinados factores de transcripción que están implicados directamente en la regulación de la expresión génica.³⁶⁶

El estudio de los testículos criptorquídicos en humanos constituye un excelente modelo experimental natural para el estudio de las alteraciones de las células de Sertoli. De hecho, en algunos casos de testículos criptorquídicos extirpados en la infancia y de otros extirpados en la pubertad, se pueden ver en múltiples tubos seminíferos incursiones granulares eosinófilas en el interior del citoplasma de las células de Sertoli, las cuales son positivas para marcadores lisosomales, incluidos alfa-1-antitripsina y CD 68. Estos cambios granulares de las células de Sertoli, se producen por una acumulación anormal de gran cantidad de lisosomas secundarios; además, estas células presentan alteraciones del citoesqueleto con disminución de filamentos de vicentina, y no muestran inmunorreactividad con anticuerpos anti-inhibina, lo que sugiere que estas células de Sertoli granulares presentan importantes alteraciones funcionales. Es muy probable que estas alteraciones lisosómicas determinen una disfunción irreversible de la actividad fagocítica realizada por la célula de Sertoli normal. Por ello, es asimismo verosímil especular que estas lesiones constituyen una anomalía primaria e irreversible de la célula de Sertoli que puede contribuir, entre otros varios factores, al desarrollo de infertilidad en los pacientes criptorquídicos.²¹⁹

Es interesante destacar que el mantenimiento de una buena espermatogénesis depende

muy directamente de complejos entramados de regulación estructural y funcional de las células de Sertoli, pero también la espermatogénesis, y en íntima relación con las células de Sertoli, depende de la regulación de las hormonas esteroideas. En concreto, para mantener una espermatogénesis correcta se necesitan altos niveles de testosterona intratesticular secretada por las células de Leydig, y esta testosterona es ofertada a los túbulos seminíferos uniéndose a la proteína transportadora de andrógenos (ABP). De este modo, la testosterona penetra en las células de Sertoli y se une a los receptores nucleares específicos del RA -un miembro de la superfamilia de receptores nucleares-,²⁶⁶ activando la síntesis y secreción de proteínas y otros factores de crecimiento que regulan la espermatogénesis, facilitando la meiosis e inhibiendo la apoptosis de las células germinales.⁶⁹

La concentración de testosterona intratesticular en hombres normales es mucho más alta que la concentración de testosterona en el suero, llegando a ser 10 veces mayor. Desgraciadamente, existen muy escasos estudios que aborden la concentración de andrógenos en el fluido testicular del testículo humano normal, y también son de difícil diseño los estudios que pretenden relacionar la concentración intratesticular de andrógenos con la espermatogénesis en el hombre normal. En hombres, se ha demostrado que existe un gradiente entre la concentración de testosterona en el suero y dentro del testículo, aunque la concentración de testosterona intratesticular puede ser incluso 100 veces más alta que los niveles de testosterona sérica en hombres normales. Sin embargo, se ha demostrado que los niveles de 5-alfadihidrotestosterona intratesticular sólo representan el 2% de toda la testosterona, a pesar de la gran afinidad por el RA. En este sentido, la cuantificación de la dihidrotestosterona intratesticular no parece ser un marcador significativo en el hombre normal. Con todo, está claro que es necesario que se produzca una adecuada síntesis de testosterona dentro del testículo normal, con el fin de mantener o restaurar cuantitativamente una espermatogénesis normal.¹³⁹

Con el incremento de la edad de los pacientes adultos es frecuente observar patología obstructiva en la biopsia testicular, como consecuencia de obstrucciones de la vía espermática, la cual muy frecuentemente es secundaria a la patología hiperplásica o neoplásica prostática. En el presente estudio, hemos encontrado una importante descamación del epitelio tubular, asociado a intensa atrofia de las células germinales en los casos de edad avanzada. Sin embargo, estos aparentemente son independientes de la

actividad morfológica del RA, ya que la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli presentan una robusta inmunotinción para el RA, o los cambios en la intensidad del marcaje no son tan manifiestos como el grado de atrofia del epitelio seminífero. Incluso en las áreas con importante atrofia del epitelio germinal, en donde predomina un patrón de solo Sertoli - asociado con importantes pseudovacúolas de atrofia epitelial-, curiosamente persiste un evidente marcaje del RA.

Estos datos morfológicos también están en consonancia con la experiencia del grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis, puesto que también en pacientes jóvenes que consultan por azoospermia u oligozoospermia grave pueden observarse signos obstructivos en la biopsia testicular, caracterizados por un incremento significativo del número de espermátidas de tipo adulto, con respecto al número de espermátidas inmaduras (espermátidas redondas), patrón completamente opuesto al característico del hombre adulto normal, en que la biopsia testicular demuestra un menor número de espermátidas maduras que de espermátidas redondas. Estas lesiones obstructivas en el hombre joven no sólo se ven en las azoospermias idiopáticas, sino que suelen ser un dato de frecuente observación en aquellos pacientes vasectomizados que evolucionan con granulomas espermáticos en el extremo proximal de la sección del conducto deferente ipsilateral. Estos granulomas pueden producir un exceso de reabsorción del fluido testicular y epididimario, además de incremento notorio de la reabsorción de lípidos provenientes de la destrucción de espermatozoides, lo que origina una microvacuolización del citoplasma de las células del epidídimo.²⁰⁸

Se ha evaluado la inmunolocalización del RA en una serie de testículos de hombres azoospermicos, observándose un mayor número e intensidad de inmunomarcaje del RA en las células de Sertoli de los casos que presentaban un patrón de solo Sertoli, con respecto a aquellos casos diagnosticados de parada de la espermatogenesis, y también con respecto al encontrado en el testículo de hombres normales (grupo control).¹⁶⁸ Dado que la acción última de los andrógenos está mediada por el RA, es posible que diferencias en la sensibilidad a los andrógenos puedan contribuir a la variabilidad de los niveles de testosterona sérica, y en definitiva a la retroregulación negativa de la testosterona.³⁵⁶ El presente estudio cuantitativo del RA en relación con las diferentes fases del ciclo del epitelio seminífero normal, cuando se valoró la DOI de los canales rojo y verde, no

demostró cambios significativos; tampoco se encontraron valores distintos de esta densidad en relación con los diferentes grados de hipoespermatogénesis; dicho de otro modo, el comportamiento inmunohistoquímico de la expresión del RA no presentaba variaciones en las áreas de atrofia tubular, frecuentemente observadas en pacientes ancianos. Además, se ha encontrado un comportamiento idéntico de los canales rojo y verde en relación con el ciclo celular normal del epitelio seminífero y, así mismo, el mismo comportamiento en las áreas atróficas de vacuolización del epitelio seminífero.

Los datos obtenidos en nuestro estudio, acerca de los relativamente pocos cambios de la expresión del RA en pacientes ancianos, pueden estar en consonancia con el hecho de que en el hombre viejo suele ser bastante constante el mantenimiento de niveles séricos normales de testosterona, pero en estas personas ancianas existe frecuentemente un incremento de LH;¹⁰⁹ con todo, los niveles séricos de testosterona disminuyen progresivamente a medida que avanza la edad, aunque los niveles encontrados pueden variar notoriamente de unos individuos a otros.³⁵⁶ La circulación de andrógenos bioactivos en hombres mayores de 50 años con síntomas de andropausia se asocian con niveles séricos de testosterona relativamente disminuidos;²⁵⁰ pero aún es prematuro precisar si estos cambios dependen de la diferente bioactividad o de la modulación selectiva del RA.²⁵⁰ Pero además, es importante destacar que la resistencia a los andrógenos puede ser la causa del 40% de la infertilidad masculina idiopática debida a azoospermia o a oligospermia grave, sobre todo en aquellos casos en los que no existe una alteración del eje hipofisario testicular; por lo que serán necesarios nuevos estudios del RA de andrógenos en biopsias testiculares de pacientes jóvenes que consultan por subfertilidad o por infertilidad.

Los estudios moleculares del RA en pacientes que están entrando en el climaterio masculino son escasos, con datos poco contrastados y a veces bastante contradictorios. En la andropausia, sólo algunos cambios relacionados con la edad pueden asociarse con la longitud de las zonas repetidas de CAG, lo que sugiere que este parámetro puede representar un papel en la diferente regulación de las acciones de los andrógenos en el hombre viejo.¹⁰⁹ En concreto, el número de repeticiones de CAG se incrementa a medida que avanza la edad, y este incremento se correlaciona con las alteraciones patológicas que pueden padecer los pacientes, incluidos depresión, ansiedad, deterioro del estado general, disminución de la comunicación y, por último, fallecimiento del paciente.¹⁰⁹ Sin embargo, hasta el momento

presente no se ha encontrado una asociación significativa entre la longitud de la repetición CAG del RA y los niveles de testosterona total y libre; tampoco se ha encontrado relación con los niveles de LH ni con el denominado índice de AIS, que viene determinado por la multiplicación de los niveles de testosterona y los de LH.³⁵⁶ Todos estos hallazgos permiten sugerir que el polimorfismo de la repetición CAG en el gen del RA en hombres ancianos sanos no desempeña un sustancial e importante papel en la variabilidad interindividual de los niveles de testosterona sérica, ni en las determinaciones de recambio del mineral óseo.³⁵⁶

En la actualidad, aún persisten dudas acerca de la implicación de las alteraciones del gen del RA en la hipoespermatogénesis presente en hombres normales de edad avanzada; por ello, se ha investigado el tamaño de las repeticiones del trinucleótido CAG presente en el exón I del RA. En este sentido, no se han obtenido diferencias significativas entre los pacientes ancianos con espermatogénesis conservada y aquellos que tienen hipoespermatogénesis o diferentes grados de parada de la maduración de la espermatogénesis. En consecuencia, se puede concluir que las alteraciones de la espermatogénesis con la edad en ancianos no se correlacionan con la longitud de las repeticiones CAG del gen del RA; dicho de otro modo, las repeticiones de este gen, en sí mismas, no parecen constituir un factor de riesgo para las alteraciones de la espermatogénesis en pacientes ancianos.⁵⁹

En el testículo criptorquídic humano, se ha realizado un estudio preliminar no cuantitativo centrado en las alteraciones inmunohistoquímicas de la expresión del RA, en relación con el estado madurativo de los tubos seminíferos. Se han considerado tres patrones específicos de tubos seminíferos en pacientes con testículos criptorquídicos después de la pubertad: 1) tubos seminíferos con diferenciación focal de células germinales, pero sin alcanzar una espermatogénesis completa; 2) tubos compuestos exclusivamente de solo Sertoli, en los que predominaban las células de Sertoli maduras, aunque presentaban algunas células de apariencia inmadura (células de Sertoli de tipo infantil) y otras con cambios disgenéticos; y 3) tubos seminíferos de muy pequeñas dimensiones, de contornos irregulares y compuestos exclusivamente de células de Sertoli disgenéticas.²⁵⁵ La mayoría de tubos seminíferos que han experimentado crecimiento postpuberal mostraban una robusta o moderada intensidad del RA. Contrariamente, los tubos con células de Sertoli inmaduras o disgenéticas no se marcaban con el anticuerpo anti-RA. Estos resultados sugieren que existe

una correlación directa entre la disminución de la expresión de RA y la gravedad de las lesiones disgenéticas en la criptorquidia.²⁵⁵

Dado que estas lesiones disgenéticas del testículo criptorquídico muy probablemente se produzcan antes del nacimiento, resulta necesario evaluar si en estos cambios también pudieran estar implicadas alteraciones de la expresión del RA antes del nacimiento. El primer problema que se presenta es el escasísimo número de publicaciones y la poca experiencia en el estudio pormenorizado de la expresión del RA en el testículo fetal humano normal. En nuestro conocimiento, sólo se ha realizado un estudio del RA en 5 fetos humanos, comprendidos entre la 7ª y 22ª semanas de gestación. Ya desde la 7ª semana de gestación, el RA está presente en las células germinales indiferenciadas, en las células mioides peritubulares y en algunas células de Leydig y del tejido mesenquimal intersticial. A medida que avanza la gestación, el número de células mioides peritubulares positivas al RA permanece constante hasta la 22ª semana de gestación; pero el número de células estromales del intersticio positivas al RA incrementa notoriamente en la segunda fase de la gestación. En la especie humana, es crucial para el desarrollo gonadal la presencia de una hiperplasia fisiológica de células de Leydig durante la 14-18 semanas de gestación.²⁰⁴ Sin embargo, en el testículo fetal humano, el RA y la proteína Bcl-2 (una proteína antiapoptótica) progresivamente quedan restringidos a las células mioides peritubulares a medida que avanza la gestación.²⁰⁴

Se sabe que, a partir de la 12ª semana de gestación, se ha inmunodetectado un receptor de estrógenos alfa en la región perinuclear de las células de Leydig, siendo su mayor intensidad en la 16ª semana, para disminuir progresivamente hasta la 22ª semana. Por el contrario, el receptor de estrógenos beta ha sido observado en las células gonadales indiferenciadas en la 7ª semana de gestación, siendo aún mucho más aparente en las células germinales y en las células de Leydig a partir de la 12ª semana de gestación. Estos hallazgos están en consonancia con el bien establecido papel de los andrógenos en los mecanismos de señalización de la diferenciación sexual y de la espermatogénesis en el testículo humano fetal; sin embargo, aún se desconoce con exactitud el papel que representan los estrógenos en el desarrollo del testículo y del epidídimo humanos.²⁹⁶

En nuestro laboratorio, aún son muy preliminares los datos obtenidos del marcaje del RA en el testículo fetal; sin embargo, dado que las biopsias de los testículos criptorquídicos

deben realizarse durante la infancia temprana, es necesario disponer de un patrón normal de posibles cambios de expresión del RA en las diferentes fases del desarrollo testicular postnatal, durante la infancia, el crecimiento testicular prepuberal y el inicio de la pubertad. Aunque aún los datos son preliminares, sí hemos podido estudiar e incluir en el presente estudio la evaluación de la expresión del RA en el testículo infantil normal (obtenido durante la autopsia de niños fallecidos por causas que no conllevan alteraciones testiculares ni endocrinológicas). Durante la infancia temprana, la mayoría de las células de Sertoli están desordenadas en el tubo seminífero, pero presentan una moderada o intensa inmunoexpresión del RA; contrariamente, las células germinales carecen de inmunomarcaje. Las células mioides peritubulares y los fibroblastos intersticiales sólo muestran trazas de inmunotinción. A los tres-cuatro años de edad, existe una mejor organización de los tubos seminíferos; sin embargo, puede resultar paradójico que la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli sean negativos o sólo muestren vestigios del RA, siendo excepcionales los núcleos que presentan mayor inmunomarcaje. Las espermatogonias basales son rigurosamente negativas y la mayoría de las células intersticiales no muestran inmunotinción. Sin embargo, esta ausencia de inmunotinción para el RA está en consonancia con el periodo de quiescencia morfo-funcional en el que se encuentra el testículo en los niños de cuatro años de edad. Contrariamente, en esta edad, el RA está constantemente inmunolocalizado y con intensa expresión del RA de los núcleos de las células principales del conducto epididimario y en otros órganos genitales y extragenitales, en los cuales cumple su función de masculinización del niño para preparar todas las células dependientes de hormonas del organismo para adaptarse y experimentar la pubertad.

Durante la pubertad, las células de Sertoli normales experimentan cambios morfológicos dramáticos con maduración de las células de Sertoli infantiles (aún inmaduras presentes en el testículo de los niños menores de 6-8 años) y su transformación como células de Sertoli, primero de tipo prepuberal-puberal y luego de tipo adulto, con completa actividad funcional y que expresan abundantes filamentos intermedios de vimentina. La maduración de las células de Sertoli, se acompaña por una disminución de su actividad mitótica antes incluso de que se diferencien las ondas de espermatogénesis durante el período prepuberal y puberal. Estos cambios son paralelos a las pérdidas de los marcadores inmunohistoquímicos propios de las células de Sertoli infantiles, la cuales pueden conservar trazas de filamentos de queratina, que son vestigios de las queratinas de bajo peso molecular

siempre presentes en las células de Sertoli de tipo fetal. En nuestro estudio, hemos observado que en las muestras testiculares procedentes de niños de edades comprendidas entre cuatro y seis u ocho años, la expresión del RA en las células de Sertoli es muy variable: predominan las células negativas, aunque existen algunas células -si bien muy escasas- que presentan un robusto inmunomarcaje nuclear; además, en las áreas adyacentes sólo algunas células intersticiales y peritubulares expresan trazas del RA. Pero a medida que avanza el desarrollo prepuberal, hecho que ocurre en edades muy variables comprendidas entre nueve y once o doce años, se evidencia un aumento del diámetro medio de los tubos seminíferos, y la diferenciación de espermatozoides de primer orden. En esta áreas con inicio de la espermatogénesis, las células de Sertoli dispuestas en su íntima vecindad presentan una intensa tinción intranuclear del RA; y estos cambios de actividad del RA no son exclusivos de la células de Sertoli prepuberales, sino que también ocurren en las células mioideas (con constante y evidente inmunomarcaje del RA); asimismo ocurren, incluso, en el intersticio testicular, en el que si bien aún persisten algunas células de Leydig inmaduras con inmunomarcaje negativo, aparecen algunas células de Leydig poligonales con signos de maduración puberal, algunas de las cuales pueden ser positivas al RA. Con todo, al igual que ocurre en el testículo adulto normal, la mayoría de las células de Leydig normales de tipo adulto paradójicamente no presentan inmunoexpresión del RA. En definitiva, en el testículo puberal cuando ya se alcanza una espermatogénesis completa, prácticamente igual a la propia del testículo adulto del hombre normal, la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli contienen un robusto marcaje del RA, lo que contrasta con el tenue marcaje de las células mioideas peritubulares adyacentes.

En relación con las alteraciones del tracto genital masculino en pacientes que consultan por subfertilidad o por infertilidad de causa congénita, se sabe que los andrógenos desempeñan un papel crucial en el desarrollo del tracto reproductor masculino, y por ello, defectos en el RA pueden determinar un desarrollo sexual masculino anormal, lo que muy probablemente determinaría un alto potencial de infertilidad. En este sentido, se ha encontrado que los niveles circulantes de testosterona son significativamente inferiores en el 20-30% de los varones infértiles, con respecto a los hombres normales; sin embargo, la administración terapéutica de testosterona o de gonadotropina en estos pacientes no siempre mejora la producción de espermatozoides; asimismo, el abuso de la administración de esteroides anabolizantes frecuentemente causan infertilidad del varón.¹⁶⁷ Está demostrado

completamente que el CAIS está causado por una mutación en el gen del RA, la cual se asocia a anomalías del desarrollo testicular y a un incremento del riesgo de neoplasias malignas de células germinales en el testículo;¹⁰⁴ sin embargo, estos cambios malignos son muy bajos en los niños prepuberales o durante la pubertad.¹⁰⁴ De otra parte, se ha demostrado que el parénquima testicular que rodea a los tumores malignos de células germinales, en algunos caso no muy evolucionados, presenta importantes lesiones testiculares, las cuales son primarias e irreversibles. Dentro de este espectro de lesiones caben destacar: hiperplasia focal y a veces difusa de células de Leydig, microlitiasis, angiopatías e hiperplasia adenomatosa de la rete testis. Además, se han encontrado cambios muy importantes de las células de Sertoli, incluidos la presencia de nódulos de células de Sertoli, células de Sertoli con cambios disgenéticos e involutivos, tubos con un patrón de solo Sertoli, diferentes grados de hialinosis peritubular y esclerosis tubular, y lesiones del compartimento adluminal de los tubos seminíferos. El presente estudio sugiere que las células de Sertoli anormales desempeñan un papel muy importante en la creación de un microambiente que facilita el desarrollo y la activación del carcinoma in situ, y posteriormente de los tumores germinales infiltrantes. Por todo ello, es posible especular que en estos pacientes con tumores testiculares de células germinales, las células de Sertoli ya desde la vida fetal o durante la infancia presentan una diferenciación anormal que pudiera estar causada por anomalías genéticas o por agentes ambientales aún no bien conocidos. Esta diferenciación anormal de las células de Sertoli puede causar no sólo fallo primario de la espermatogénesis y parada de la maduración de la espermatogénesis en diferentes estadios celulares, sino también puede contribuir, en parte, a fallos primarios que impidan o dificulten la diferenciación de los gonocitos en espermatogonias. Estos gonocitos anómalos podrían ser células germinales disgenéticas, que posteriormente se transformarían en células de carcinoma in situ testicular.²⁰⁹

Los datos anteriormente descritos en humanos, acerca de la naturaleza primaria de las lesiones disgenéticas encontradas en los pacientes subfértiles (algunos portadores además de tumores de células germinales), están -en parte- en consonancia con experimentos recientes en testículos de ratón, en los que se ha podido identificar y localizar una proteína específica que interactúa con el RA; dado que esta proteína pertenece a una familia de proteínas relacionadas con la remodelación de la cromatina, con funciones reparadoras del DNA y con procesos de recombinaciones homólogas.⁷⁰ Esta proteína ha sido detectada

inmunohistoquímicamente en el núcleo de la célula de Sertoli normal desde las primeras fases del desarrollo postnatal; así mismo, se ha inmunolocalizado en todas las células del ciclo espermatogénico. Además, en aquellos ratones hipogonadales, esta proteína está significativamente disminuida en las células de Sertoli y en las células germinales. Esta alteración no mejora cuando se administra testosterona o FSH. Estos datos sugieren que esta proteína es un co-regulador del RA de las células de Sertoli in vivo.⁷⁰ En la última década, se han creado ratones “knock-out” específicos para el RA en las células de Sertoli.³⁵⁹ En definitiva, estos resultados permiten sugerir que el RA funciona como un factor de transcripción dependiente del ligando que regula la expresión de una gran variedad de genes diana, que son muy importantes en el desarrollo de la pubertad y de la fertilidad del varón.⁵⁵ Las acciones de los andrógenos están mediadas por el RA que en el testículo humano se expresa en las células de Sertoli, en las células de Leydig y en las células peritubulares.³⁶⁴

Es más, se han realizado modelos experimentales de creación de ratones “knock-out” con RA completo, y de otros “knock-out” con RA selectivo de células de Sertoli que permiten estudiar los mecanismos de regulación del RA en las células de Sertoli. De este modo, se ha encontrado que el efecto de los andrógenos sobre los mecanismos de proliferación de las células de Sertoli y, por ello, sobre su número total, no están mediados por una vía directa de estimulación del RA. En los ratones “knock-out” para el RA completo, se observa una drástica disminución de varias moléculas de las células de Sertoli, incluidas la proteína transportadora de ácidos grasos, el factor de crecimiento plaquetario y la transferrina; contrariamente, se incrementa la actividad del receptor de FSH y los niveles de AMH. Todos estos datos permiten concluir que no se requiere la acción de los andrógenos en relación con los diferentes cambios proliferativos y madurativos dependientes de la inmunoexpresión en las células de Sertoli de marcadores tales como AMH, p27 y glicoproteínas sulfatadas-2; pero en contraposición, sí es esencial la expresión de otros genes de las células de Sertoli que regulan el desarrollo de los procesos meióticos y postmeióticos de las células germinales.³³³

Estos datos de laboratorio corroboran una vez más que la espermatogénesis está regulada en roedores (y también en primates, incluido el hombre) por complejos mecanismos paracrinos, en los que son cruciales también los niveles intratesticulares y circulantes de andrógenos -la dihidrotestosterona y la testosterona, respectivamente. En

concreto, en la rata, una espermatogénesis cuantitativamente normal es posible sólo cuando los niveles de testosterona intratesticular son significativamente mayores que la concentración de testosterona en sangre periférica. Cuando la concentración de testosterona intratesticular falla, se produce una pérdida de células germinales, sobre todo en aquellos estadios de la espermatogénesis que dependen de los andrógenos; en estos casos, la administración de testosterona revierte la pérdida de células germinales dado que la testosterona estimula la actividad funcional del RA en las células de Sertoli. En la actualidad, se sabe que la concentración de testosterona intratesticular puede regular la proliferación y la muerte celular, siendo estos efectos dependientes de la localización del RA y del mRNA para el RA en las células de Sertoli, cuyas concentraciones varían en aquellos estadios madurativos de la espermatogénesis que son sensibles a la acción de los andrógenos. Esto es, son las células de Sertoli localizadas en los estadios VII-VIII del epitelio seminífero de la rata los que normalmente contienen un intenso marcaje del RA. El tratamiento con cápsulas de testosterona y estrógenos produce ausencia de la inmunotinción del RA en los núcleos de las células de Sertoli; sin embargo, cuando se restauran los niveles normales de testosterona aparece de nuevo la expresión del RA en las células de Sertoli. La pérdida de la inmunolocalización nuclear del RA en las células de Sertoli se correlaciona con el incremento del número de células germinales en apoptosis.¹¹³

La degeneración de espermatocitos primarios por apoptosis ocurre durante la espermatogénesis normal, pero se incrementa en numerosas condiciones patológicas testiculares, incluyendo la exposición a agentes tóxicos para el testículo. En este sentido, la administración de ácido metoxiacético -modelo bien conocido de apoptosis masiva de espermatocitos paquiteno de la rata- ha demostrado que esta apoptosis está mediada por el incremento de la expresión intracitoplásmica del receptor de estrógenos beta (ER-beta).³⁴⁸

Así mismo, en la especie humana, un número apreciable de pacientes diagnosticados de diversos grados de subfertilidad o de infertilidad absoluta presentan alteraciones genéticas, de expresión de señales o metabólicas que intervienen y regulan las divisiones meióticas de las células germinales. En este sentido, se sabe que la progresión de la primera división meiótica de las células germinales está regulada por los andrógenos y muy probablemente por los estrógenos. Cuando esta regulación falla, se producen paradas de las meiosis en los espermatocitos primarios, los cuales degeneran por apoptosis. Se ha visto que

la hiperexpresión de proteína transportadora de andrógenos (ABP) en el testículo de ratones transgénicos induce una parada parcial de la meiosis, lo cual es debido a apoptosis de espermatocitos paquitenos. Recientemente, se ha demostrado que en el citoplasma de los espermatocitos paquitenos se inmunolocaliza el ER-beta, el cual podría estar implicado en mecanismos de represión de la proliferación y de los procesos de meiosis celular. Se ha encontrado que la inmunoexpresión de ER-beta es muy intensa en el citoplasma de los espermatocitos paquitenos presentes en los testículos de ratones transgénicos para el ABP, y que esta robusta inmunotinción se localiza en aquellos estadios tubulares de la maduración del epitelio seminífero durante la espermatogénesis en los cuales la apoptosis es máxima. Todos estos datos permiten sugerir que los espermatocitos paquitenos que degeneran son los que más expresan ER-beta, o dicho de otro modo, que el ER-beta regula negativamente la progresión de la meiosis, lo que conduce a una apoptosis de los espermatocitos.²⁹³

Existen numerosas hipótesis acerca del significado funcional de las mutaciones que afectan al RA en relación con las diferentes patologías testiculares y, de modo muy especial, con el Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (AIS).⁶⁰ De hecho, es extraordinariamente útil el análisis de la longitud del tracto CAG normal del gen del RA en relación con los diferentes tipos de patologías testiculares presentes en hombres infértiles. Pero además de mutaciones del RA relacionadas con patologías de la fertilidad, recientemente se ha identificado una región del cromosoma Y relacionada con la azoospermia, denominado factor azoospermico AZF; de este modo, deleciones del factor AZF de la subregión del cromosoma Y pueden estar presentes en un espectro variable de alteraciones de la espermatogénesis, que incluyen desde casos ligeros de hipoespermatogénesis hasta una depleción absoluta de células germinales, que son la causa de infertilidad de estos varones.¹⁷¹ La microdeleción del cromosoma Y representa un estadio intermedio entre el síndrome de solo Sertoli idiopático y una espermatogénesis normal. De otra parte, en algunos casos se ha observado una deleción de AZF con mutaciones del gen del RA y del gen del receptor de FSH.¹⁷¹ Todos estos datos sugieren que microdeleciones de una región común de AZF del cromosoma Y conducen al desarrollo de un estatus intermedio entre una completa espermatogénesis y un síndrome de solo Sertoli idiopático, lo que explica la presencia de alteraciones histológicas heterogéneas en la biopsia testicular de un determinado paciente, lo que podría indicar diferentes comportamientos de los tubos seminíferos dispuestos en lobulillos testiculares adyacentes.¹⁷¹

En relación con las alteraciones de los mecanismos implicados en el descenso testicular de los testículos criptorquídicos, existe un consenso científico al considerar que no es sólo el resultado de un defecto mecánico en el normal descenso del testículo fetal desde la cavidad abdominal a la bolsa escrotal, si no que es una alteración global y multifactorial de las células germinales, las células de Sertoli, las células intersticiales y de las células peritubulares, tanto de sus características morfológicas como de su regulación hormonal y paracrina.

En el presente estudio, se abordó muy pormenorizadamente la expresión del RA en los núcleos de las células de Sertoli en relación con las diferentes lesiones presentes en los testículos criptorquídicos humanos. En comparación con la identificación de los patrones normales de la expresión del RA a todo lo largo del ciclo de las células germinales y en la atrofia tubular propia de la senescencia, se ha cuantificado la expresión del RA en los testículos criptorquídicos extirpados en pacientes adolescentes y adultos que ya habían pasado la pubertad. Como bien ha quedado demostrado en la evaluación histológica de estas piezas quirúrgicas, la criptorquidia del adulto se caracteriza por una mezcla de diferentes patrones de maduración tubular presentes en el mismo testículo, de modo que a veces patrones muy diferentes aparecen en lobulillos testiculares contiguos. Con el fin de precisar mejor la cuantificación microdensitométrica del RA, hemos simplificado todo el espectro lesional en 5 patrones de tubos seminíferos del testículo criptorquídico: 1) Tubos seminíferos que presentan una diferenciación incompleta de espermatogénesis con diferenciación focal exclusivamente de espermatogonias y espermatoцитos de 1^{er} orden; 2) tubos seminíferos con solo diferenciación de espermatogonias basales, en ausencia de diferenciación de espermatoцитos de primer orden; 3) tubos seminíferos con mayor diámetro, debido a que han experimentado un crecimiento después de la pubertad, pero que presentan un patrón de solo Sertoli con predominio de células de Sertoli de tipo adulto; 4) lobulillos testiculares constituidos exclusivamente por tubos seminíferos de pequeñas dimensiones, con contornos muy irregulares y que tienen un patrón de solo Sertoli en el que la mayoría de las células de Sertoli son de tipo infantil, aunque con inmunomarcaje positivo del RA; y 5) lobulillos testiculares, asimismo, constituidos exclusivamente por tubos seminíferos de pequeñas dimensiones con contornos muy irregulares y que tienen un patrón de solo Sertoli con predominio de células de Sertoli de tipo infantil, y carentes de inmunoeexpresión del RA (células RA-).

En el presente estudio, hemos encontrado que en la inmunoexpresión del RA en los tubos seminíferos del testículo puberal criptorquídico, cuando no se identifican células germinales (patrón de solo Sertoli), se observa una importante heterogeneidad de intensidad de expresión del RA, si se compara con la intensa inmunotinción de las células de Leydig adyacentes. Sin embargo las células de Sertoli de aquellos tubos adyacentes a los anteriores, de mayor tamaño y que además aún conservan una diferenciación de la línea germinal –aunque siempre de modo incompleto-, presentan un citoplasma bajo y denso y también la expresión del RA en los núcleos está disminuida, y en algunas células sólo quedan vestigios del receptor o la inmunotinción es negativa. Además, la expresión del RA es aún menor, sobre todo en las áreas de patrón de solo Sertoli y que carecen de espermatogonias. Las células mioides muestran trazas del RA y también algunas células de Leydig son positivas al RA. Los tubos seminíferos completamente disgenéticos, con células de Sertoli muy inmaduras, carecen de RA, y sólo algunas (y en número muy escaso) células de Sertoli más diferenciadas, con núcleo mayor y nucleolo evidente presentan vestigios de inmunotinción. En definitiva, los testículos disgenéticos con tubos muy inmaduros constituidos exclusivamente con células de Sertoli indiferenciadas son rigurosamente negativas al RA.

Cuando se comparan los datos microdensitométricos de la expresión del RA en los diferentes patrones tubulares criptorquídicos con el patrón normal, se observa un doble comportamiento de la intensidad de tinción nuclear en las células de Sertoli: de una parte, todas las células de Sertoli tienen un evidente menor marcaje que las células de Sertoli presentes en los testículos normales, aunque en ambos grupos siempre son mayores los datos obtenidos de la DOI en el canal rojo con respecto al verde; de otra parte, es necesario destacar que mientras que en el testículo normal existe una homogeneidad de la altura de las barras en ambos canales, contrariamente, en los diferentes patrones tubulares del testículo criptorquídico existe una variación de la expresión del RA. Esta disparidad de comportamiento del RA en el testículo normal y criptorquídico se comprueba mejor cuando se evalúa la proporción entre los canales rojo y verde, observándose siempre una mayor intensidad del RA en el testículo normal con respecto al criptorquídico. Aparece una ligera disminución del RA en los patrones del testículo criptorquídico que carecen de diferenciación de línea germinal; además, la proporción en el grupo de testículo criptorquídico con patrón de solo Sertoli de tipo infantil sin expresión del RA es la menor en todos los grupos estudiados.

Se ha realizado un estudio de correlación y su significación estadística, en cada uno de los canales RGB evaluados; de este modo es posible verificar si existe relación de la expresión inmunohistoquímica del RA de las células de Sertoli, con respecto a cada uno de los patrones tubulares del testículo criptorquídic. Hemos obtenido una correlación positiva y significativa de la DOI del RA en aquellos tubos que conservaban una cierta, aunque incompleta, espermatogénesis, con respecto a los tubos que mostraban patrones con células de solo Sertoli de tipo disgenético. Con respecto al patrón de solo Sertoli, se ha demostrado una correlación inversa pero significativa, entre los que contenían células de Sertoli de tipo adulto, respecto de aquellos tubos constituidos por células de Sertoli disgenéticas y que eran negativas al RA.

La criptorquidia puede presentarse como un hallazgo aislado en la exploración clínica o puede estar asociada con otros defectos malformativos del aparato genital masculino. De hecho, las alteraciones de la diferenciación sexual cuyo resultado es el desarrollo de genitales ambiguos es un proceso multifactorial en el que pueden estar implicados mutaciones de genes que codifican enzimas esteroidogénicas; pero también pueden deberse a mutaciones del gen de la hormona mülleriana, del gen del receptor de la hormona antimülleriana, del gen que codifica la síntesis de 5- α -reductasa y, sobre todo, de mutaciones del gen del RA.³⁰² En este sentido, se ha realizado un estudio comparativo de la inmunotinción del RA con respecto a la expresión del mRNA del RA en el músculo cremáster, con el fin de valorar su posible participación en los mecanismos de regulación del descenso testicular. En el grupo control, los niños con descenso normal del testículo en la bolsa escrotal no presentaron tinción positiva del RA en la biopsia del músculo cremáster; al contrario, 4 de 8 casos de niños con testículos no descendidos mostraron inmunotinción positiva para el RA, así mismo, la evaluación molecular del mRNA del RA demostró una disminución, siendo 10 veces inferior, en los músculos cremastéricos de niños con normal descenso testicular, con respecto a lo observado en los niños con criptorquidia. No se han visto cambios de las hormonas séricas en el grupo de niños criptorquídicos, con respecto al grupo control. Por ello, cabe concluir que la mayor expresión de RA en los músculos cremastéricos se asocia con el maldescenso testicular, lo cual paradójicamente no conlleva efectos nocivos sobre el grado de masculinización mediado por andrógenos en estos niños con criptorquidia unilateral.³³⁶

En la criptorquidia y con el fin de valorar la posible implicación de las alteraciones de la expresión del RA en los mecanismos de descenso testicular, se han realizado estudios inmunohistoquímicos del RA en testículos intrabdominales e inguinales, los cuales han demostrado una disminución del RA en el gubernáculum testicular, con respecto al grupo control.¹²² Estos datos permiten crear la hipótesis acerca de una estimulación directa de los andrógenos sobre el gubernáculum testicular humano que probablemente determine un incremento de los polisacáridos, lo cual conduciría a un hinchamiento del gubernáculum, con ulterior dilatación del canal inguinal, facilitándose así el descenso testicular.¹²² Es más, es posible que ocurran procesos multifactoriales que afecten cualitativa o cuantitativamente al RA y que influyan en el descenso testicular transinguinal.¹²² La presencia de una producción de andrógenos normales y de un RA normal en pacientes con maldescenso testicular, sugiere que la relación entre el descenso testicular y las anomalías genitales constituyen unos procesos multifactoriales muy complejos y aún no muy bien precisados.¹⁶²

En un estudio reciente, el 63% de los pacientes con testículos localizados en el escroto tenían niveles altos del RA, mientras que el 85% de los pacientes con maldescenso testicular tenían bajos niveles del RA; estas alteraciones eran aún mayores en los pacientes con testículos intrabdominales.¹²² Sin embargo, en un grupo de 21 pacientes con criptorquidia unilateral no se han encontrado anomalías del gen del RA, por lo que no se considera como la principal causa de la criptorquidia asilada.³⁶⁹ Por otra parte, se ha señalado que la longitud del segmento de la poliglutamina del RA no influye en la gravedad de la desmasculinización o en el descenso testicular, pero sí contribuye a las anomalías genitales que presentan estos pacientes.¹⁶² Sin embargo, en nuestra casuística, el estudio del RA por PCR lo hemos podido realizar en 14 casos de pacientes postpuberales con criptorquidia, en el resto de los casos, la escasez de material testicular archivado desaconsejaba obtener muestra para estudios moleculares por motivos éticos, ya que se debe preservar este material para usarlo exclusivamente con el fin de realizar nuevos estudios diagnósticos. Con todo, en ninguno de estos 14 casos se objetivaron bandas anómalas por PCR con respecto a los testículos normales (y obviamente con respecto a los controles positivos de piel humana normal obtenidos en varones sanos), por lo que podemos sugerir que en la criptorquidia unilateral no existen cambios mutacionales importantes en el RA.

En un estudio de evaluación de las posibles causas de mutaciones del gen del RA en pacientes con criptorquidia aislada, no se han encontrado anomalías dentro del exón 8 del gen del RA, por lo que las alteraciones del gen del RA no son la causa de la criptorquidia unilateral.³²⁴⁻³²⁷ Sin embargo, otros estudios sugieren que en los pacientes infértiles existe un incremento significativo de la longitud repetida de CAG, que es mayor que en los pacientes fértiles; esto es lo que ocurre en el síndrome de solo Sertoli, con respecto al hombre normal.⁴² Dentro del tracto normal, el triplete CAG está inversamente relacionado con la actividad transcripcional del RA.⁴²

En los pacientes con criptorquidia unilateral, la longitud repetitiva del triplete CAG del gen del RA no parece desempeñar un papel importante. Sin embargo, en pacientes con criptorquidia bilateral se ha visto una menor actividad funcional del RA, debido a una cadena más larga de poliglutamina, lo que podría representar un papel importante en la patogénesis de la criptorquidia bilateral. Además, en pacientes con criptorquidia unilateral, la biopsia del proceso vaginal contralateral presenta una repetición de CAG más larga, lo cual podría ser la causa de las alteraciones del descenso testicular y de un cierre incompleto del proceso vaginal.³⁰²

En los varones infértiles, es notorio destacar que sus testículos presentan numerosos signos histológicos incluidos en el denominado síndrome de disgenesia testicular, entre estos datos histológicos se incluyen la microlitiasis, los tubos seminíferos con un patrón de solo Sertoli, la presencia de carcinoma *in situ* testicular (CIS) y, por último, tubos seminíferos muy inmaduros que contienen células de Sertoli disgenéticas y que constituyen los denominados nódulos de células de Sertoli. Estos nódulos de células de Sertoli presentan cambios significativos de la expresión de marcadores característicos de las células de Sertoli, como son la vimentina, la inhibina alfa, la AMH, la citoqueratina 18, el RA y la conexina 43. El presente estudio contradice, en parte, estudios previos que establecen que las alteraciones de las células de Sertoli después de la pubertad, en pacientes criptorquídicos, son secundarias a los efectos deletéreos de la temperatura o metabólicos sobre el testículo no descendido; antes bien, nuestros resultados de las alteraciones morfológicas y cuantitativas de la expresión del RA indican que la baja expresión, o la ausencia de ella, está correlacionada con los cambios disgenéticos que expresan las células de Sertoli durante el desarrollo fetal o la infancia, mucho antes de que las células de Sertoli

comiencen la maduración prepuberal, y antes del desarrollo de la completa pubertad de estos pacientes. Se trata, pues, de células disgenéticas que difieren de las células fetales o neonatales.²⁹ Pero además, la actividad mitótica de las células de Sertoli disgenéticas que forman los nódulos de las células de Sertoli se detiene mucho antes de la pubertad; esto es, la ausencia del RA en las células de Sertoli fusiformes y completamente disgenéticas sugiere que la alteración de la expresión del RA es completamente irreversible, es una lesión primaria de las células de Sertoli que ya está condicionada desde el desarrollo fetal del testículo, que en el futuro será incapaz de experimentar el normal descenso a la bolsa escrotal.

Esta disgenesia testicular está siempre presente en las piezas de orquiectomía realizadas en los pacientes con AIS. Pero además, estudios previos de los testículos de casos con AIS han definido dos lesiones muy características, los denominados nódulos hamartomatosos y los denominados adenomas de células de Sertoli.²⁶⁹ Los hamartomas están formados por tubos seminíferos sólidos con células de Sertoli inmaduras asociados a células de Leydig y a fascículos de músculo liso.²⁶⁹ Los adenomas de células de Sertoli son frecuentes en los testículos de estos pacientes, aunque se consideran algunas diferencias histológicas testiculares entre las formas completa e incompleta de AIS y que han sido publicadas en estudios clásicos.^{61,343} Si bien estos hallazgos son patognomónicos de AIS y confirman el diagnóstico patológico, en otros muchos casos, sobre todo en los pacientes con CAIS y en los que presentan la variante incompleta (IAIS), es muy importante destacar que, en general, estos cambios histológicos en el testículo extirpado de pacientes adultos con AIS son, en cierta medida, bastante semejantes en sus patrones lesionales a los encontrados en algunos testículos de pacientes que sólo tenían criptorquidia aislada no asociada con otros cuadros polimalformativos, ni cromosómicos.^{195,213} De hecho, en algunos casos con IAIS, el diagnóstico patológico es difícil, puesto que las lesiones encontradas pueden ser poco expresivas, e, incluso, semejar testículos inmaduro o un testículo infantil normal. Por todo ello, cabe concluir que el diagnóstico del AIS comporta estudios multidisciplinarios en los que los datos de patología deben cotejarse con los datos clínicos y de laboratorio hormonal, dado que estudios previos que incluyen la evaluación de series de pacientes concluyeron que no encontraron diferencias histológicas en los testículos entre los dos tipos de AIS.²⁶⁹

La detección de la expresión inmunocitoquímica del RA en las piezas de orquiectomía

extirpadas en pacientes con AIS ha demostrado cambios heterogéneos. En la mayoría de los casos hemos encontrado que los tubos seminíferos eran de tipo infantil y presentaban un patrón de solo Sertoli de tipo infantil. En estos tubos, asimismo la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli eran positivas al RA, pero también se veían algunos núcleos que contenían vestigios del RA y otros que eran rigurosamente negativos para el RA. En el intersticio se identificaban abundantes acúmulos de células de Leydig, pero sin inmunomarcaje del RA. En los casos de AIS estudiados, la mayoría de los tubos seminíferos tenían bajo diámetro tubular y la pared peritubular era fina. En estos tubos, las células de Sertoli siempre mostraron cambios de tipo disgenético fetal, no evidenciándose expresión del RA o sólo mínimas trazas a nivel nuclear. Las células intersticiales eran de tipo inmaduro y carecían de expresión del RA; sin embargo, algunos fibroblastos presentaban marcate del RA. Además, en numerosos compartimentos intersticiales existían áreas de células fusiformes arremolinadas, entremezcladas con acúmulos de células de Leydig negativas al RA.

En aquellos casos de AIS con tubos seminíferos muy disgenéticos, existía una muy escasa expresión del RA en las células de Sertoli, sobretodo en las células de núcleo fusiforme indiferenciado que carecían rigurosamente de inmunomarcaje del RA, aunque adyacentemente podían verse algunas células de Sertoli de núcleo redondo con citoplasma vesiculoso y vestigios de expresión del RA, lo cual contrastaba con la alta intensidad de inmunomarcaje del RA en las células mioides de la pared peritubular; y lo que es más destacable: el epitelio de revestimiento del conducto epididimario, cuando lo hemos podido estudiar en estos caso con AIS, mostraba una intensísima expresión del RA en la mayoría de los núcleos de las células epiteliales principales y basales, y también muy evidente inmunomarcaje del RA en las células musculares lisas que son muy abundantes en la cola del conducto epididimario.

Nuestros datos acerca de las importantes alteraciones de inmunomarcaje que experimenta el RA, y de su amplio espectro de expresión en relación con las distintas variedades morfológicas de las células de Sertoli disgenéticas, están en consonancia con estudios previos que demuestran que las determinaciones bioquímicas de hormonas esteroideas en pacientes con AIS es muy variable, dependiendo de si el paciente presenta un síndrome completo o incompleto de feminización testicular. Con todo, en general, en AIS,

los niveles séricos de testosterona son generalmente normales, pero los niveles de LH están frecuentemente elevados;^{248,256} estas alteraciones pueden ser debidas a anomalías del gen del RA que determina una resistencia a los andrógenos en órganos periféricos.^{34-36,248,256}

En los pacientes con AIS y también en numerosos casos de varones infértiles de causa aún no bien precisada, se ha encontrado que la pérdida completa de la función del RA es la causa de distintos tipos de patologías genéticas, incluyendo anomalías del RNAm Splicin.⁹ Se han encontrado alteraciones funcionales y moleculares del RA en hombres infértiles, cuando se investiga el RA en cultivos de fibroblastos de piel genital en pacientes con azoospermia idiopática o con oligospermia.³ Las variaciones genéticas dentro de esta cascada de eventos pueden interrumpir el normal desarrollo del varón y conducir a malformaciones de los genitales externos o internos.^{114,115} Además, existen dos tipos de patologías asociadas a anomalías funcionales y estructurales relacionadas con el RA: la denominada enfermedad de Kennedy (también conocida bajo el nombre de atrofia muscular espinal y bulbar, SBMA) -que será comentada posteriormente- y el cáncer de próstata.^{32,33} Numerosos estudios han demostrado una considerable heterogeneidad en la expresión del RA, tal como se ha demostrado desde estadios precoces del desarrollo del cáncer de próstata.⁹

Se han descrito un gran número de mutaciones de este gen en 2 diferentes exones: el 5 y el 7.^{31,32} Estas mutaciones pueden causar distintas anomalías fenotípicas del desarrollo sexual masculino,¹⁸⁶ desde fenotipo femenino hasta desvirilización o infertilidad masculina.^{186,373} En concreto, el síndrome de insensibilidad a los andrógeno (AIS) es el resultado de una resistencia androgénica, causada por una alteración en los RA, debida bien a una ausencia o bien a importantes anomalías cuantitativas o cualitativas. En nuestro estudio de PCR hemos identificado bandas correspondientes al RA, pero su peso molecular no difiere del encontrado en las muestras obtenidas para PCR de testículos normales, las cuales, obviamente, no diferían de las bandas de piel normal de varón sano incluida como control positivo del RA. Con todo, dada la muy baja incidencia de AIS en la población general y aún menor de los casos en los que se dispone de muestra suficiente de tejido testicular para los estudios moleculares, y ,de otra parte, dado el efecto deletéreo que la fijación y la inclusión en parafina pueden determinar en la conservación del DNA en estos casos, es obvia la necesidad de estudiar nuevos casos, con el fin de demostrar posibles

cambios mutacionales o epigenéticos en el RA de las células de Sertoli en los testículos extirpados en pacientes con CAIS o con IAIS.

De otra parte, en la enfermedad de Kennedy -paciente con AIS y con alteraciones del desarrollo neurológico-¹⁷³ existe una correlación entre la longitud repetida de CAG y el desarrollo temprano de enfermedad neurológica, por lo que se demuestra que esta enfermedad tiene una relación directa con la alteración de la secuencia del RA,⁶⁷ pero carecemos de experiencia en estudios de muestras testiculares de pacientes con este síndrome. Por último, se ha descrito todo un espectro de individuos con síntomas intermedios de AIS en los que el diagnóstico se descubre en la evaluación de una infertilidad de causa desconocida.^{32,33} Dentro de estas variantes clínicas, cabe destacar varios estudios de pacientes con hipospadias graves y criptorquidia bilateral en los que pueden existir alteraciones del RA,¹¹⁹ incluidas la mutación puntual en el exón 8;¹¹⁵ no obstante, en la mayoría de los casos de hipospadia no se encuentran mutaciones específicas, por lo que es necesario establecer criterios genéticos que permitan clasificar y tratar correctamente a estos pacientes.^{115,119} Todo este espectro de enfermedades permiten concluir que las variaciones fenotípicas en los defectos moderados del RA pudieran permanecer incluso no detectadas durante la exploración clínica en individuos adultos con AIS.^{90,15}

El síndrome de Klinefelter es una de las causas genéticas más comunes de infertilidad masculina,¹⁶⁰ de hecho, es la causa más frecuente de las alteraciones de los cromosomas sexuales, afecta aproximadamente a 1:500 y 1:1000 varones y al 10-20% de los hombres que consultan por infertilidad.^{325,326} Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de uno o varios cromosomas X extras en varones,¹⁷⁷ aunque se desconoce si el cromosoma X extra es de origen materno o paterno;^{325,326} no obstante, la secuenciación del cromosoma X sugiere que el origen de este cromosoma X extra procede de una ausencia de la disyunción materna en la meiosis II.²⁰¹ El error en la meiosis II sugiere que la base de la homocigosis proviene de una mutación del locus del RA.²⁰¹ En los pacientes con síndrome de Klinefelter con mosaicismos, la inactivación del cromosoma X podría explicar, en parte, el espectro de sintomatología clínica, tanto en relación con la deficiencia mental, como con las alteraciones fenotípicas observadas.^{325,326}

Histopatológicamente, en los pacientes adultos con síndrome de Klinefelter, los tubos seminíferos están completamente hialinizados o esclerosados,^{38,211} las células de Leydig forman grandes acúmulos entre los tubos esclerosados,²¹¹ y las fibras elásticas de la túnica propia están ausentes.³⁸ En nuestros casos estudiados en pequeñas biopsias testiculares, las secciones de los tubos seminíferos eran de moderado diámetro y, dado que las muestras se obtenían en pacientes adultos que consultaban por infertilidad, todos los tubos seminíferos habían experimentado el crecimiento postpuberal. La pared peritubular estaba ligeramente engrosada y en el interior se observaba un epitelio pseudoestratificado, constituido exclusivamente por células de Sertoli con núcleos disgenéticos que aún conservan una moderada inmunoexpresión del RA. En ninguno de los casos estudiados hemos podido encontrar la diferenciación de células germinales.

Existen evidencias claras de que son las células de Sertoli las que están primariamente lesionadas en los pacientes con síndrome de Klinefelter. Estas células son generalmente positivas para la cromatina sexual, pero un pequeño número de pacientes muestran tubos con células de Sertoli que son positivas y negativas para la cromatina sexual en la misma biopsia, lo que permite, en principio, diferenciar dos tipos de tubos seminíferos con sólo células de Sertoli:⁸⁴ con células de Sertoli adultas y con células de Sertoli inmaduras y disgenéticas. Cuando los lobulillos estaban formados por tubos seminíferos con un patrón de solo Sertoli, con células disgenéticas dispuestas anárquicamente, era evidente la ausencia de inmunotinción del RA en las células de Sertoli, sobre todo si se comparaba con la robusta inmunotinción en los núcleos de las células mioides peritubulares adyacentes y de los fibroblastos intersticiales. Pero además, las abundantes células de Leydig, presentes en el intersticio de las biopsias de los pacientes diagnosticados de síndrome de Klinefelter, mostraban núcleos disgenéticos y carecían de expresión del RA, lo cual, asimismo, es más evidente si se compara con el fuerte marcaje del RA en los fibroblastos intersticiales adyacentes. Estos datos están en relación con los datos bien conocidos de que la función de las células de Leydig en los pacientes con síndrome de Klinefelter, a pesar de la marcada hipertrofia o hiperplasia, es inadecuada, de modo que los niveles de andrógenos séricos en estos pacientes son significativamente muy inferiores a los del hombre normal. En conclusión, en el síndrome de Klinefelter, el presente estudio confirma que las células de Sertoli son muy disgenéticas y hemos demostrado que sus núcleos presentan todo un

espectro de inmunexpresión del RA, desde núcleos moderadamente positivos hasta núcleos rigurosamente negativos.

Estos datos obtenidos en el presente estudio, que demuestran profundas alteraciones de la expresión del RA, confirman claramente que los hombres con síndrome de Klinefelter presentan hipogonadismo, alteración de la espermatogénesis y deficiencia de andrógenos,¹⁷⁷ y existen importantes variaciones de los niveles de hCG y testosterona en los pacientes adultos;³⁷ sin embargo, en pacientes XXY infantiles, los niveles séricos de FSH, LH, inhibina B y AMH no difieren de los controles. En estos niños con síndrome de Klinefelter, aunque la secreción de testosterona está alterada, la normal secreción de inhibina B y de la AMH no permite dilucidar cuál es el mecanismo íntimo que determina la disminución de la función de las células de Sertoli después de la pubertad.¹⁵⁸ Dadas las consideraciones éticas, debido a las pequeñas muestras testiculares contenidas en la biopsia efectuada exclusivamente con fines diagnósticos y terapéuticos y a la necesidad de conservar el material patológico parafinado para posibles estudios futuros con los mismos fines, ha sido imposible realizar en nuestro laboratorio estudios moleculares de detección del RA por PCR, en los casos de síndrome de Klinefelter que hemos evaluado. No obstante, en un estudio reciente, no se han encontrado alteraciones del gen del RA, por lo que, en principio, no constituyen un factor importante en el daño de la espermatogénesis en los pacientes con síndrome de Klinefelter.³⁷

En definitiva y como recapitulación de nuestras investigaciones, el presente estudio de tejido testicular humano ha evaluado la expresión del RA por métodos inmunohistoquímicos, microdensitométricos y moleculares de PCR, relacionando los cambios de inmunomarcaje del RA con los estadios madurativos del epitelio seminífero, y con las características tubulares que experimenta el testículo desde el desarrollo neonatal hasta la maduración puberal; así mismo, hemos precisado que la expresión del RA aparentemente no se modifica sustancialmente en la senectud, ni en las áreas de hipoespermatogénesis y de atrofia de los tubos seminíferos de los hombres de edad avanzada. Por último, hemos precisado que las lesiones morfológicas de las células de Sertoli, en pacientes criptorquídicos, en testículos de pacientes con AIS y en biopsias testiculares de pacientes con síndrome de Klinefelter, se asocian con alteraciones de la inmunexpresión del RA, aunque, aparentemente, estas alteraciones no se deben a

mutaciones importantes del RA, ya que no hemos encontrado bandas anómalas del triplete CAG del RA en los estudios de PCR realizados en casos con criptorquidia y con AIS.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. La expresión inmunohistoquímica del receptor de andrógenos de los núcleos de las células de Sertoli del hombre adulto normal, en aquellos estadios madurativos del epitelio seminífero en los que está presente, no experimenta cambios significativos respecto a las distintas asociaciones de las células germinales.

SEGUNDA. En las áreas de hipoespermatogénesis intensa y de atrofia tubular, presentes en los testículos de sujetos de mediana edad o de edad avanzada, las células de Sertoli no presentan cambios significativos en la expresión del receptor de andrógenos, por lo que los mecanismos de desarrollo de las lesiones de los tubos seminíferos en la senectud no dependen de alteraciones morfofuncionales del receptor de andrógenos.

TERCERA. Durante el desarrollo testicular en la infancia temprana, se observa ausencia de la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli; contrariamente, el receptor de andrógenos de las células de Sertoli comienza a expresarse durante la infancia tardía y el periodo de preadolescencia, lo que indica su participación en el desarrollo de la pubertad del varón.

CUARTA. Los cambios disgenéticos que experimentan las células de Sertoli de los testículos criptorquídicos extirpados en pacientes adultos siempre están correlacionados directamente con la disminución o la ausencia de inmunomarcaje del receptor de andrógenos. Sin embargo, estos cambios fenotípicos del receptor no se acompañan de alteraciones de la longitud del triplete CAG en los estudios de PCR del receptor de andrógenos realizados en los testículos criptorquídicos de pacientes adultos, lo que sugiere que las lesiones de la criptorquidia no dependen de mutaciones del receptor de andrógenos.

QUINTA. La disgenesia testicular presente en los pacientes con síndrome de insensibilidad a los andrógenos se asocia a una intensa disminución de la inmunoexpresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli, no evidenciándose expresión en las células de Sertoli más disgenéticas. Estos cambios de inmunomarcaje del receptor de andrógenos tampoco se relacionan con alteraciones importantes de la longitud del triplete CAG, lo que sugiere que no existen mutaciones del receptor de andrógenos.

SEXTA. En el síndrome de Klinefelter, la disminución o ausencia de expresión inmunohistoquímica del receptor de andrógenos en las células de Sertoli se relaciona con cambios morfológicos y funcionales de los mecanismos de regulación paracrina de sus células de Sertoli.

RESUMEN

RESUMEN

En el presente estudio, se ha evaluado la inmunexpresión del receptor de andrógenos (RA) en testículos de la infancia (5 casos), del hombre adulto normal (8 casos), en la senectud (6 casos) y durante el desarrollo prepuberal, tanto temprano como tardío (12 casos). Así mismo, se ha evaluado la expresión del RA en tres enfermedades congénitas en las que el testículo se encuentra muy dañado, como son la criptorquidia (17 casos), el Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (6 casos) y el Síndrome de Klinefelter (9 casos). Se ha realizado una evaluación tanto morfológica como mediante métodos inmunohistoquímicos, morfométricos-microdensitométricos y, asimismo, la detección molecular del triplete CAG del RA por métodos de PCR.

En los tubos seminíferos normales con espermatogénesis completa, la mayoría de las células de Sertoli presentan intensa expresión nuclear del RA, aunque su intensidad es variable de unas células a otras, dependiendo, en parte, del estadio madurativo de la espermatogénesis; encontrándose ausente en todas las células de la línea germinal. Estos datos son sugerentes y confirman, en el testículo humano normal, que la regulación de los diferentes estadios madurativos de la espermatogénesis es un proceso que depende de la acción de los andrógenos sobre las células de Sertoli.

En los pacientes adultos, la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli presentan una intensa inmunotinción para el RA. Los cambios en la intensidad del marcaje no son parejos al grado de atrofia del epitelio seminífero tan frecuentemente observados con el incremento de la edad, ya que incluso en las áreas con importante atrofia del epitelio germinal, en donde predomina un patrón de solo Sertoli, asociado a importantes pseudovacúolas de atrofia epitelial, persiste curiosamente un evidente marcaje del RA.

En los testículos de hombres azoospermicos, se observa un mayor número e intensidad de inmunomarcaje del RA en las células de Sertoli de los casos que presentaban un patrón de solo Sertoli, con respecto a aquellos casos diagnosticados de parada de la espermatogénesis y también con respecto al encontrado en el testículo de hombres normales (grupo control). En el presente estudio cuantitativo del RA, no se encontraron valores distintos de esta densidad en relación con los diferentes grados de hipoespermatogénesis.

En testículo criptorquídico humano, el estudio no cuantitativo de las alteraciones inmunohistoquímicas de la expresión del RA, en relación con el estado madurativo de los tubos seminíferos demuestra que la mayoría de tubos seminíferos que han experimentado crecimiento postpuberal mostraban una marcada o moderada intensidad del RA. Contrariamente, los tubos con células de Sertoli inmaduras o disgenéticas no se marcaban con el anticuerpo anti-RA. Estos resultados sugieren que existe una correlación directa entre la disminución de la expresión del RA y la gravedad de las lesiones disgenéticas en la criptorquidia.

En el presente estudio, hemos incluido la evaluación de la expresión del RA en el testículo infantil normal. Durante la infancia temprana, la mayoría de las células de Sertoli presentan una moderada o intensa inmunoexpresión del RA, negativizándose o mostrando sólo vestigios del RA a los tres-cuatro años de edad. Entre cuatro y seis u ocho años, la expresión del RA en las células de Sertoli es muy variable: predominan las células negativas, aunque existen algunas células, si bien muy escasas, que presentan un robusto inmunomarcaje nuclear. En áreas con inicio de la espermatogénesis, las células de Sertoli presentan una intensa tinción intranuclear del RA. Y estos cambios de actividad del RA no son exclusivos de las células de Sertoli prepuberales, sino que también ocurren en las células mioideas, en el intersticio testicular. En definitiva, en el testículo puberal cuando ya se alcanza una espermatogénesis completa, prácticamente igual a la propia del testículo adulto del hombre normal, la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli contienen un robusto marcaje del RA, lo que contrasta con el tenue marcaje de las células mioideas peritubulares adyacentes.

La detección de la expresión inmunocitoquímica del RA en las piezas de orquiectomía extirpadas en pacientes con AIS ha demostrado cambios heterogéneos. En la mayoría de los casos los tubos seminíferos eran de tipo infantil y presentaban un patrón de solo Sertoli de tipo infantil. En estos tubos, asimismo, la mayoría de los núcleos de las células de Sertoli eran RA positivos, pero también se veían algunos núcleos que contenían vestigios del RA y otros que eran rigurosamente negativos para el RA. En el intersticio se identificaban abundantes cúmulos de células de Leydig, pero sin inmunomarcaje del RA.

En el síndrome de Klinefelter, el presente estudio confirma que las células de Sertoli son muy disgenéticas y hemos demostrado que sus núcleos muestran todo un espectro de inmunoexpresión del RA, desde núcleos moderadamente positivos hasta núcleos rigurosamente negativos.

En definitiva y como recapitulación de nuestras investigaciones, en el presente estudio de tejido testicular humano, se ha evaluado la expresión por métodos inmunohistoquímicos, microdensitométricos y moleculares de PCR la expresión del RA, relacionando los cambios de inmunomarcaje del RA con los estadios madurativos del epitelio seminífero, las características tubulares que experimenta el testículo desde el desarrollo neonatal hasta la maduración puberal; así mismo, hemos precisado que la expresión del RA aparentemente no se modifica sustancialmente en la senectud ni en las áreas de hipoespermatogénesis y de atrofia de los tubos seminíferos de los hombres de edad avanzada. Por último, hemos precisado que las lesiones morfológicas de las células de Sertoli en pacientes criptorquídicos, en testículos de pacientes con AIS y en biopsias testiculares en pacientes con síndrome de Klinefelter se asocian a alteraciones de inmnoexpresión del RA, aunque aparentemente esta alteraciones no se deben a mutaciones importantes del RA, ya que no hemos encontrado bandas anómalas del triplet CAG del RA en los estudios de PCR realizados en casos con criptorquidia y con síndrome de AIS.

SUMMARY

SUMMARY

In the present study the immunoexpression of the androgen receptor (AR) has been evaluated in testis of childhood (5 cases), normal adult man (8 cases), aged man (6 cases) and testis with pubertal development, either precocious or late (12 cases). The AR expression has also been studied in three congenital diseases where the testis are severely damaged which are cryptorchidism (17 cases), Androgen Insensitivity Syndrome (AIS) (6 cases) and Klinefelter syndrome (9 cases). A morphologic, immunohistochemical, and morphometric-microdensitometric evaluation have been performed, as well as the molecular detection of the CAG triplet of the AR by PCR methods.

In the seminiferous tubules with complete spermatogenesis most of the Sertoli cells show an intense nuclear expression of AR, although the intensity is variable from one cell to another, in part, depending on the maturation stage of the spermatogenesis; and it is completely absent in germ cells. These data confirm that the regulation of the different maturation stages of spermatogenesis is a process that depend on the action of the androgens on the Sertoli cells.

In adult patients most of the Sertoli cell nuclei present an intense AR immunoexpression. The changes in the intensity of immunostaining are not parallel to the tubular atrophy so frequently found in the aged testis, as an evident AR staining persists even in intensively atrophic areas with a predominant Sertoli cell only pattern.

In azoospermic man testis, the AR expression in Sertoli cell nuclei is higher in number and intensity in those testis with Sertoli cell only pattern than in those testis diagnosed as spermatogenesis arrest and also compared to the testis of normal men (control group). The quantitative study did not show different values in this density comparing different grades of hypospermatogenesis.

In human cryptorchidic testis, the non-quantitative study of immunohistochemical alterations in the AR expression in relation to the seminiferous tubule maturation stages demonstrate that most of the tubules that have undergone a postpubertal development showed an intense or moderate AR expression. On the contrary, those tubules with disgenetic or immature Sertoli cells did not stain with anti-AR antibody. These results

suggest a direct correlation between AR expression decrease and the criptorchidic disgenetic lesions severity.

The present study have included the AR expression evaluation in normal infantile testis. In the early infancy most of the Sertoli cells show a moderate or intense AR expression, becoming negative or nearly negative about three to four years of age. About four and six or eight years of age, the AR expression in Sertoli cells is very variable, negative cells predominates, although there were some scarce cells with an intense nuclear immunostaining. In those areas where spermatogenesis had started, Sertoli cells showed an intense nuclear staining with anti-AR antibody. These changes in AR activity are not exclusive of prepubertal Sertoli cells, but also occurs in myoid cells in testicular interstice In short, in the pubertal testis with complete spermatogenesis, similar to the normal adult spermatogenesis, most of the Sertoli cells shows an intense AR expression, contrasting with the light staining of adjacent peritubular myoid cells.

The orchiectomy specimens of Androgen Insensitivity Syndrome patients showed an heterogeneous pattern of AR immunohistochemical expression. Most cases had infantile seminiferous tubules with an infantile Sertoli only cell pattern. In those tubules, most of the Sertoli cell nuclei were AR positive, although some slightly stained or completely negative nuclei can also be observed. Numerous AR-negative Leydig cells nodules were identified.

In Klinefelter syndrome, the present study confirms that Sertoli cells are very disgenetic and we have demonstrate that their nuclei show an AR-immunoexpression spectrum, varying from moderately positive nuclei to completely negative nuclei.

In summary, in the present study on human testicular tissue AR-expression has been evaluated by immunohistochemical, microdensitometric, and PCR molecular methods. The changes in AR immunoexpression have been related to the seminiferous epithelium maturation stages and the tubular characteristics that testis undergone from neonatal development to pubertal maturation. The present study has also demonstrate that AR-expression is not substantially modified in aged testis nor in hypospermatogenic areas nor atrophic areas of seminiferous tubules of aged man. Finally, we have precised that morphologic testicular lesions in chytorchidic patients, in AIS testis, and in testicular biopsies of patients with Klinefelter syndrome are associated to AR immunoexpresion alterations, although, apparently, those alterations are not due to AR important mutations as

we have not found abnormal bands of CAG triplet of AR in the PCR studies performed in cryptorchidism and IAS.

REFERENCIAS

1. **Adams JC.** Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 1992;40:1457-1463.
2. **Adeeko AO, Dunne E, Mather J, Moore A, Morris ID.** Testicular germ cell populations in the adult rat after continuous in-vivo testicular infusion of inhibin-A and activin-A. *Int J Androl* 1996;19:69-76.
3. **Aiman J, Griffin JE.** The frequency of androgen receptor deficiency in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:725-732.
4. **Alvarez-Nava F, Gonzalez S, Soto M, Martinez C, Prieto M.** Complete androgen insensitivity syndrome: clinical and anatomopathological findings in 23 patients. *Genet Couns* 1997;8:7-12.
5. **Anthony CT, Kovacs WJ, Skinner MK.** Analysis of the androgen receptor in isolated testicular cell types with a microassay that uses an affinity ligand. *Endocrinology* 1989;125:2628-2635.
6. **Anthony CT, Skinner MK.** Cytochemical and biochemical characterization of testicular peritubular myoid cells. *Biol Reprod* 1989;40:811-823.
7. **Aoki A, Massa EM.** Subcellular compartmentation of free and sterified cholesterol in the interstitial cells of the mouse testis. *Cell Tissue Res* 1975;165:49-62.
8. **Aumüller G, Peter ST.** Immunochemical and ultrastructural study of Sertoli cells in androgen insensitivity. *Int J Androl* 1985;9:99-108.
9. **Avila DM, Zoppi S, McPhaul MJ.** The androgen receptor (AR) in syndromes of androgen insensitivity and in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;76:135-142.
10. **Awoniyi CA, Sprando RL, Santulli R, Chandrashekar V, Ewing LL, Zirkin BR.** Restoration of spermatogenesis by exogenously administered testosterone in rats made azoospermic by hypophysectomy or withdrawal of luteinizing hormone alone. *Endocrinology* 1990;127:177-184.
11. **Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Strehler E, Piomboni P.** Recent advances in human sperm pathology. *Contraception* 2002;65:283-287.
12. **Bankfalvi A, Navabi H, Bier B, Bocker W, Jasani B, Schmid KW.** Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J Pathol* 1994;174:223-228.
13. **Bangsboll S, Qvist I, Lebech PE, Lewinsky M.** Testicular feminization syndrome and associated gonadal tumors in Denmark. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992;71:63-66.
14. **Bardin CW, Shaha C, Mather J, Jacomon Y, Margioris AN, Lidtta AS, Gerandai I, Chen CL, Brieger DT.** Identification and possible function of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the testis. *Ann N Y Acad Sci* 1984;438:346-364.
15. **Barthold JS, Kumasi-Rivers K, Upadhyay J, Shekarriz B, Imperato-Mcginley J.** Testicular position in the androgen insensitivity syndrome: implications for the role of androgens in testicular descent. *J Urol* 2000;164:497-501.
16. **Batch JA, Davies HR, Evans BA, Hughes IA, Patterson MN.** Phenotypic variation and detection of carrier status in the partial androgen insensitivity syndrome. *Arch Dis Child* 1993;68:453-457.
17. **Bedford JM.** The status and the state of the human epididymis. *Hum Reprod Update* 1994;9:2187-2199.
18. **Bergh A.** Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *Int J Androl* 1982;5:325-330.
19. **Bergh A.** Paracrine regulation of Leydig cells by the seminiferous tubules. *Int J Androl* 1983;6:57-65.
20. **Bergh A, Damber JE.** Immunohistochemical demonstration of androgen receptors on testicular blood vessels. *Int J Androl* 1992;15:425-34.
21. **Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE.** cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1635-1642.
22. **Blok LJ, Bartlett JMS, Bolt-de Vries J, Themmen APN, Brinkmann AO, Weinbauer GF, Nieschlag E, Grootegoed JA.** Effect of testosterone deprivation on expression of the androgen receptor in rat prostate, epididymis and testis. *Int J Androl* 1992;15:182-198.
23. **Blok LJ, Hoogerbrugge JW, Themmen**

- APN, Baarends WM, Post M, Grootegoed JA. Transient down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in Sertoli cells by follicle-stimulating hormone is followed by up-regulation of androgen receptor mRNA and protein. *Endocrinology* 1992;131:1343-1349.
24. Blok LJ, Mackenbach P, Trapman J, Themmen APN, Brinkman AO, Grootegoed JA. Follicle-stimulating hormone regulates androgen receptor mRNA in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1989;63:267-271.
25. Blok LJ, Themmen APN, Peters AHFM, Trapman J, Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA. Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types. *Mol Cell Endocrinol* 1992;88:153-164.
26. Bocon-Gibod L. The prevention of LHRH induced disease flares in patients with metastatic carcinoma of the prostate. In: Schröder FH ed., "EORTC Genitourinary Group Monograph 8: Treatment Prostatic Cancer Facts and Controversies. New York, Wiley-Liss, 1990:125-129.
27. Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997;278:1481-1483.
28. Bourne GA, Regiani S, Payne AH, Marshall JC. Testicular GnRH receptors characterisation and localization on interstitial tissue. *J Clin Endocrinol* 1980;51:407-409.
29. Brehm R, Rey R, Kliesch S, Steger K, Marcks A, Bergmann M. Mitotic activity of Sertoli cells in adult human testis: an immunohistochemical study to characterize Sertoli cells in testicular cords from patients showing testicular dysgenesis syndrome. *Anat Embryol* 2006;211:223-236.
30. Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PTK. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 1994;135:1227-1234.
31. Breuil V, Euler-Ziegler L. Gonadal dysgenesis and bone metabolism. *Joint Bone Spine* 2001;68:26-33.
32. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:105-109.
33. Brinkmann AO, Jenster G, Ris-Stapers C, van der Korput JA, Bruggenwirth HT, Boehmer AL, Trapman J. Androgen receptor mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:443-448.
34. Brown TR. Human androgen insensitivity syndrome. *J Androl* 1995;16:299-303.
35. Brown TR, Berkovitz GD, Gearhart JP. Androgen receptors in boys with isolated bilateral cryptorchidism. *Am J Dis Child* 1988;142:933-936.
36. Brown TR, Maes M, Rothwell SW, Migeon CJ. Human complete androgen insensitivity with normal dihydrotestosterone receptor binding capacity in cultured genital skin fibroblasts: evidence for a qualitative abnormality of the receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:61-69.
37. Brugh VM 3rd, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32:689-707.
38. Buzek SW, Sanborn BM. Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. *Biol Reprod* 1988;39:39-49.
39. Canale D, Caglieresi C, Moschini C, Liberati CD, Macchia E, Pinchera A, Martino E. Androgen receptor polymorphism (CAG repeats) and androgenicity. *Clin Endocrinol* 2005;63:356-61.
40. Carreau S, Drosowsky MA, Courot M. Androgen-binding proteins in sheep epididymis: age-related effects on androgen-binding protein, cytosolic androgen receptor and testosterone concentrations. Correlations with histological studies. *J Endocrinol* 1984;103:281-286.
41. Carreau S, Papadopoulos V, Drosowsky MA. Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology* 1988;122:1103-1109.
42. Casella R, Maduro MR, Misfud A, Lipshultz LI, Yong EL, Lamb DJ. Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients. *J Urol* 2003;169:224-227.

43. **Casey PJ, Gilman AG.** G Protein involvement in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 1988;263:2577-80.
44. **Castagnaro M, Yandell DW, Dockhorn-Dworhiczak B, Wolfe HJ, Poremba C.** Human androgen receptor gene mutations and p53 gene analysis in advanced prostate cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1993; 77:119-123.
45. **Catalona WJ.** Management of cancer of the prostate. *N Engl J Med* 1994;331:996-1004.
46. **Chang C, Kokontis J, Liao S.** Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptor. *Science* 1989;240:324-326.
47. **Chemes HE, Pasqualini T, Rivarola MA, Bergada A.** Is testosterone involved in the initiation of spermatogenesis in humans? A clinicopathological presentation and physiological considerations in four patients with Leydig cell tumors of the testis or secondary Leydig cell hyperplasia. *Int J Androl* 1982;5:239-245.
48. **Christensen AK.** Leydig cells. In: Hamilton DW, Greep RO (eds.). *Handbook of Physiology. Male Reproductive System.* Williams & Wilkins, Baltimore. 1975; vol. 5:57-94.
49. **Clermont Y.** The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112:35-51.
50. **Clermont Y, Perey B.** The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin-eosin stained sections. *Rev Canad Biol* 1957;16:451-462.
51. **Cobo P, Martinez-Garcia F, Regadera J.** Microvessels in the human cryptorchid testis. In: Martínez-García F, Regadera J (eds.). *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview.* Madrid, Churchill Communications Europe España, 1998:265-275.
52. **Codesal J, Regadera J, Nistal M, Regadera-Sejas J, Paniagua R.** Involution of human fetal Leydig cells. An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *J Anat* 1990;172:103-114.
53. **Coffin CM, Ewing S, Dehner LP.** Frequency of intratubular germ cell neoplasia with invasive testicular germ cell tumors. Histologic and immunohistochemical features. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:555-559.
54. **Collins GM, Kim DU, Logrono R, Rickert RR, Zablow A, Breen JL.** Pure seminoma arising in androgen insensitivity syndrome (testicular feminization syndrome): a case report and review of the literature. *Mod Pathol* 1993;6:89-93.
55. **Collins LL, Lee HJ, Chen YT, Chang M, Hsu HY, Yeh S, Chang C.** The androgen receptor in spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2003;103:299-301.
56. **Crawford ED, Eisenberger MA, McLeod DG, Spaulding JT, Benson R, Dorr FA, Blumenstein BA, Davis MA, Goodman PJ.** A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med* 1989;321:419-424.
57. **Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato ACB, Hittmair A, Radmayr C, Eberle J, Bartsch G, Klocker H.** Mutant androgen receptor detected in an advanced stage of prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* 1993;7:1541-1550.
58. **Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, Cronauer MV, Radmayr C, Zhang J, Bartsch G, Klocker H.** Synergistic activation of androgen receptor by androgen and luteinizing hormone-releasing hormone in prostatic carcinoma cells. *Prostate* 1997;32:106-114.
59. **Dakouane-Giudicelli M, Legrand B, Bergere M, Giudicelli Y, Cussenot O.** Association between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular histology in older men. *Fertil Steril* 2006;86:873-977.
60. **Damiani D, Mascioli MA, Almeida MJ, Jaubert F, Fellous M, Dichtchekian V, Tobo PR, Moreira-Filho CA, Setian N.** Persistence of Mullerian remnants in complete androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15:1553-1556.
61. **Damjanov I, Drobnjak P, Grizelj V.** Testicular Feminization with immature Leydig cells. An ultrastructural demonstration. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 110:594-596.
62. **Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K.** Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res* 1990;262:253-261.
63. **Davies AG.** Role of FSH in the control of testicular function. *Arch Androl* 1981;7:97-

- 108.
64. **de Kretser DM.** The fine structure of the testicular interstitial cells in men of normal androgenic status. *Z Zellforsch* 1967;80:594-609.
65. **de Kretser DM.** Sertoli cell-Leydig cell interaction in the regulation of testicular function. *J Andol Suppl* 1982;5:11-17.
66. **de Kretser DM, McFarlane JR.** Inhibin in the male. *J Androl* 1996;17:179-182.
67. **Dejager S, Bry-Gaillard H, Bruckert E, Eymard B, Salachas F, LeGuern E, Tardieu S, Chadarevian R, Giral P, Turpin G.** A comprehensive endocrine description of Kennedy's disease revealing androgen insensitivity linked to CAG repeat length. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3893-901.
68. **Dewhurst CJ.** The XY female child. *Arch Dis Child* 1970;45:595-599.
69. **Dohle GR, Smit M, Weber RF.** Androgens and male fertility. *World J Urol* 2003;21:341-345.
70. **Domanskyi A, Zhang Fp, Nurmio M, Palvimo JJ, Toppari J, Janne OA.** Expression and localization of androgen receptor-interacting protein 4 (ARIP4) in the testis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 (en prensa).
71. **Dombrowicz D, Sente B, Closset J, Hennen G.** Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. *Endocrinology* 1992;130:695-700.
72. **Dondi D, Limonta P, Moretti RM, Montagnani Marelli M, Garattini E, Motta M.** Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: Evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop. *Cancer Res* 1994;54:4091-4095.
73. **Drews U.** Local mechanisms in sex specific morphogenesis. *Cytogenet Cell Genet* 2000;91:72-80.
74. **Ehara H, Deguchi T, Koji T, Yang M, Ito S, Kawada Y, Nakane PK.** Autoclave antigen retrieval technique for immunohistochemical staining of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections of human prostate. *Acta Histochem Cytochem* 1996;29:311-318.
75. **Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA.** Laser capture microdissection. *Science* 1996;274:998-1001.
76. **Ergün S, Ungefroren H, Holstein AF, Davidoff MS.** Estrogen and progesterone receptors and estrogen receptor-related antigen(ER-D5) in human epididymis. *Mol Reprod Dev* 1997;47:448-455.
77. **Erickson-Lawrence M, Zabludoff SD, Wright WW.** Cyclic protein-2, a secretory product of rat Sertoli cells, is the proenzyme form of cathepsin L. *Mol Endocrinol* 1991;5:1780-1788.
78. **Faisal Ahmed S, Iqbal A, Hughes IA.** The testosterone:androstenedione ratio in male undermasculinization. *Clin Endocrinol* 2000;53:697-702.
79. **Faulds JS, Lennox B.** Leydig-cell hyperplasia in testicular feminization. *Lancet* 1971;i:344-345.
80. **Fawcett DW, Burgos MH.** Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Am J Anat* 1960;107:245-269.
81. **Ferenczy A, Richart RM.** The fine structure of the gonads in the complete form of testicular feminization syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1972;113:399-409.
82. **Fretz PC, Sandlow JI.** Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002;29:921-37.
83. **Fritz IB.** Site of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule. In: Litwack G (ed.). *Biochemical Actions of Hormones*. Litwack, New York, Academic Press 1978:249-281.
84. **Frohland A, Skakkebaek NE.** Dimorphism in sex chromatin pattern of Sertoli cells in adults with Klinefelter's syndrome. Correlation with two types of "Sertoli-cell-only" tubes. *J Clin Endocrinol Metabol* 1971;33:683-687.
85. **Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Finger MJ, Moul JW, Srivastava S.** Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res* 1994;54:2861-2864.
86. **Galena HJ, Pillai AK, Turner C.** Progesterone and androgen receptors in non-flagellate germ cells of the rat testis. *J Endocrinol* 1974;63:223-237.
87. **Ganjam VK, Amann RP.** Steroids in

- fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. *Endocrinology* 1976;99:1618-1630.
88. **George FW, Wilson JD.** Sex determination and differentiation. In: Knobil E, Neill JD, Greenwald GS, Markert CL (eds.). *The Physiology of Reproduction*, vol I, 2nd ed. New York, Raven Press, Ltd. 1994:3-28.
 89. **Gerard A, Bedlou R, Clerc A, Maachi F, Closset J, Hammond GL, Nabet F, Gerard H.** Growth response of adult germ cells to rat androgen-binding protein and human sex hormone-binding globulin. *Horm Res* 1996;45:218-221.
 90. **Galli-Tsinopoulou A, Hiort O, Schuster T, Messer G, Kuhnle U.** A novel point mutation in the hormone binding domain of the androgen receptor associated with partial and minimal androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003;16:149-154.
 91. **Giwerzman A, Bruun E, Fridodt-Moller, Skakkebaek NE.** Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol.* 1989;142:990-1002.
 92. **Gondos B, Berndston WE.** Postnatal and pubertal development. In: Russell LD, Griswold MD (eds.). *The Sertoli Cell*. Clearwater, Cache River Press, 1993:115-153.
 93. **Gondos B, Migliozzi JA.** Intratubular germ cell neoplasia. *Sem Diagn Pathol* 1987;4:292-303.
 94. **Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Neff CW.** Immunolocalization of receptors for androgen and estrogen in male caprine reproductive tissues: unique distribution of estrogen receptors in efferent ductule epithelium. *Biol Reprod* 1997;56:90-101.
 95. **Goyal HO, Hutto V, Maloney MA.** Effects of androgen deprivation in the goat epididymis. *Acta Anat* 1994;150:127-135.
 96. **Griffin, JE; Wilson, JD.** The syndromes of androgen resistance. *N Engl J Med* 1980;302:198-209.
 97. **Grigorescu A, Klepsch I, Esanu C, Rivera T, Popescu H.** Receptivity disorders in gonadal dysgeneses. i. Klinefelter's syndrome. *Endocrinologie* 1983;21:55-65.
 98. **Griswold MD.** Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD (eds.) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, Florida, 1993:493-508.
 99. **Griswold MD.** Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 1995;52:211-216.
 100. **Griswold MD, Bishop PD, Kim KH, Ping R, Siiteri JE, Morales C.** Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. *Ann NY Acad Sci* 1989;564:154-172.
 101. **Grootegoed JA, Peters MJ, Mulder E, Rommerts FFG, Van Der Molen HJ.** Absence of a nuclear androgen receptor in isolated germinal cells of rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 1977;9:159-167.
 102. **Gulizia S, D'Agata R, Sanborn BM, Steinberger E.** Evidence for the presence of androgen receptors in purified rat Leydig cells. *J Androl* 1983;4:248-252.
 103. **Hammond GL, Ahonen V, Vihko R.** The radioimmunoassay of testosterone, 5 α -dihydrotestosterone and their precursors in human testis. *Int J Androl (Suppl 2)* 1987; 10:391-399.
 104. **Hannema SE, Scott IS, Rajpert-De Meyts E, Sakakkebaek NE, Coleman N, Hughes IA.** Testicular Development in the complete androgen insensitivity syndrome. *J Patholog* 2006;208:518-527.
 105. **Hansson V, Ritzén EM, French FS, Nayfeh SN.** Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. In: Hamilton DW, Greep RO (eds.). *Handbook of Physiology*, Baltimore. Waverly Press 1975:173-201.
 106. **Hansson V, Weddington SC, McLean WS, Smith AA, Nayfeh SN, French FS, Ritzén EM.** Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgen. *J Reprod Fertil* 1975;44:363-375
 107. **Hardy MP, Gelber SJ, Zhou Z, Penning TM, Ricigliano JW, Ganjam VK, Nonneman D, Ewing LL.** Hormonal control of Leydig cell differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1991;637:152-163.
 108. **Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR, Ewing LL.** Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* 1990;127:488-490.
 109. **Harkonen K, Huhtaniemi I, Makinen J, Hubler D, Irjala K, Koskenvuo M, Oettel M, Raitakari O, Saad F, Pollanen P.** The polymorphic androgen receptor gene CAG

- repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men. *Int J Androl* 2003;26:187-194.
110. **Heaton JP.** Andropause: coming of age for an old concept? *Curr Opin Urol* 2001;11:597-601.
 111. **Heckert LL, Griswold MD.** Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 1991;5:670-677.
 112. **Hermo L, Barin K, Oko R.** Androgen binding protein secretion and endocytosis by principal cells in the adult rat epididymis and during postnatal development. *J Androl* 1998;19:527-541.
 113. **Hill CM, Anway MD, Zirkin BR, Brown TR.** Intratesticular androgens levels, androgen receptor localization, and androgen receptor expression in adult rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 2004;71:1348-1358.
 114. **Hiort O.** Neonatal endocrinology of abnormal male sexual differentiation: molecular aspects. *Horm Res* 2000;53:38-41.
 115. **Hiort O, Klauber G, Cendron M, Sinnecker GH, Keim L, Schwinger E, Wolfe HJ, Yandell DW.** Molecular characterization of the androgen receptor gene in boys with hypospadias. *Eur J Pediatr* 1994;153:317-321.
 116. **Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Hittmair A.** Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res* 1995;55:3068-3072.
 117. **Hoffer A.** The ultrastructure of the ductus deferens in man. *Biol Reprod* 1976; 14:425-443.
 118. **Holdcraft RW, Braun RE.** Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004;27:335-342.
 119. **Holmes NM, Miller WL, Baskin LS.** Lack of defects in androgen production in children with hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2811-2816.
 120. **Honoré LH.** Testicular biopsy for infertility: A review of sixty-eight cases with a simplified histologic classification of lesions. *Int J Fertil* 1979;24:49-52.
 121. **Horton R.** Dihydrotestosterone is a peripheral paracrine hormone. *J Androl* 1992;13:23-27.
 122. **Hosie S, Wessel L, Waag KL.** Could testicular descent in humans be promoted by direct androgen stimulation of the gubernaculum testis? *Eur J Pediatr Surg* 1999;9:37-41.
 123. **Hsu SM, Raine L, Fanger H.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
 124. **Huggins C, Hodges CV.** Studies on prostate cancer, effects of castration, of estrogens and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941;1:293-297.
 125. **Hughes IA, Evans BAJ.** Androgen insensitivity in forty-nine patients: Classification based on clinical and androgen receptor phenotypes. *Horm Res* 1987;28:25-29.
 126. **Hughes IA, Lim HN, Martin H, Mongan NP, Dovey L, Ahmed SF, Hawkins JR.** Developmental aspects of androgen action. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:33-41.
 127. **Huhtaniemi I.** Hormonal control mechanisms of Leydig cells. In: de Kretser DM (ed.). *The Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, Orlando, 1993:383-410.
 128. **Huhtaniemi I, Bolton N, Leinonen P, Kontturi M, Vihko R.** Testicular luteinizing hormone receptor content, and *in vitro* stimulation of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate and steroid production: a comparison between man and rat. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55: 882-889.
 129. **Huhtaniemi I, Bolton NJ, Martikainen H, Vihko R.** Comparison of serum steroid responses to a single injection of hCG in man and rat. *J Steroid Biochem* 1983;19: 1147-1151.
 130. **Huhtaniemi I, Toppari J.** Hormonal regulation of the testis. In: Martínez-García F, Regadera J (eds.). *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview*. Madrid, Churchill Communications Europe España, 1998:67-80.
 131. **Husmann DA, McPhaul MJ.** Localization of the androgen receptor in the developing rat gubernaculum. *Endocrinology* 1991; 128:383-387.
 132. **Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns ChF.** Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism.

- Endocr Rev* 1997;18:259-280.
133. **Iitsuka Y, Bock A, Nguyen DD, Samango-Sprouse CA, Simpson JL, Bischoff FZ.** Evidence of skewed X-chromosome inactivation in 47,XXY and 48,XXYY Klinefelter patients. *Am J Med Genet* 2001;98:25-31.
 134. **Imai A, Ohno T, Nakagawa M, Sawairi M, Tamaya T.** Incomplete testicular feminization syndrome: studies of 17 beta-oestradiol-binding activity and aromatase activity in cultured genital fibroblasts showing impaired dihydrotestosterone-binding. *Ann Clin Biochem* 1992;29:153-158.
 135. **Isaacs JT, Lundmo PI, Berges R, Martikainen P, Kyprianou N, English HF.** Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl* 1992;13:457-464.
 136. **Isurugi K, Hasegawa F, Shibahara N, Mori H, Shima H, Harada N, Hasegawa T, Honma S, Imasaki K, Nawata H.** Incomplete testicular feminization syndrome: studies on androgen receptor(AR) function, AR gene analysis, and aromatase activities at puberty and long-term observations of clinical and hormonal features from infancy to puberty. *Endocr J* 1996;43:557-640.
 137. **Iwamura M, Abrahamsson P-A, Benning M, Cockett AT, di Sant'Agnese PA.** Androgen receptor immunostaining and its distribution in formalin fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *J Histochem Cytochem* 1994;42:783-788.
 138. **Janssen PJA, Brinkman AO, Boersma WJ, van der Kwast ThH.** Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pretreatment. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1169-1175.
 139. **Jarow JP, Zirkin BR.** The androgen microenvironment of the human testis and hormonal control of spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1061:208-220.
 140. **Jockenhovel, Rutgers JK, Mason JS, Griffin JE, Swerdloff RS.** Leydig cell neoplasia in a patient with Reifenstein syndrome. *Exp Clin Endocrinol* 1993;101:365-370.
 141. **Johnson BH, Ewing LL.** Follicle-stimulating hormone and the regulation of testosterone secretion in rabbit testis. *Science* 1971;173:635-637.
 142. **Johnson L, Chaturvedi RK, Williams JD.** Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficacy of spermatogenesis in human. *Biol Reprod* 1992;47:1091-1098.
 143. **Joseph DR.** Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam Horm* 1994;49:197-280.
 144. **Juniewicz PE, McCarthy M, Lemp BM, Barbolt TA, Shaw C, Hollenbaugh DM, Winneker RC, Reel JR, Batzold FH.** The effect of the steroidal androgen receptor antagonist, Win 49,596, on the prostate and testis of Beagle dogs. *Endocrinology* 1990;126:2625-2634.
 145. **Kadar T, Redding TW, Ben-David M, Schally AV.** Receptors for prolactin, somatostatin and LHRH in experimental prostatic cancer after treatment with analogues of LHRH and somatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:890-894.
 146. **Kass EJ.** The adolescent varicocele: treatment and outcome. *Curr Urol Rep* 2002;3:100-106.
 147. **Kassim NM, McDonald SW, Reid O, Bennett NK, Gilmore DP, Payne AP.** The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J Anat* 1997;190:577-588.
 148. **Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS.** Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol* 1996;10:119-131.
 149. **Kemppainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM.** Androgen receptor phosphorylation turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. *J Biol Chem* 1992;267:968-974.
 150. **Kerr JB, Mayberry RA, Irby DC.** Morphometric studies on lipid inclusions in Sertoli cells during the spermatogenic cycle in the rat. *Cells Tissue Res* 1984;236:609-670.
 151. **Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H.** Immunocytochemical localization of androgen

- receptor with polyclonal antibody paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 1993;41:671-678.
152. **Klocker H, Neuschmid-Kaspar F, Culig Z, Cato AC, Hobisch A, Eberle J, Cronauer MV, Hittmair A, Radmayr C, Uberreiter S, et al.** Androgen receptor alterations in patients with disturbances in male sexual development and in prostatic carcinoma. *Urol Int* 1995;54:2-5.
 153. **Komatz Y, Kiriya T, Tomoyoshi T, Yoshida O.** Clinical observations in 100 cases of Klinefelter's syndrome. *Jpn J Fertil Steril* 1983;28:332-339.
 154. **Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, Longcope C, McKinlay JB, Kantoff PW.** Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *J Endocrinol* 1999;162:137-142.
 155. **Krueger PM, Hodgen GD, Sherins R.** New evidence for the role of the Sertoli cells and spermatogonia in feedback control of FSH secretion in male rats. *Endocrinology* 1974;95:955-962.
 156. **Kuiper GG, Faber PW, van Rooij HC, van der Korput JA, Ris-Stalpers C, Klaassen P, Trapman J, Brinkmann AO.** Structural organization of the human androgen receptor gene. *J Mol Endocrinol* 1989;2:R1-R4.
 157. **Kumar MV, Jones EA, Felts SJ, Blehrud MD, Grossmann ME, Blok LJ, Schmidt LJ, Tindall DJ.** Characterization of a TPA-response element in the 5'-flanking region of the androgen receptor gene. *J Androl* 1998;19:595-602.
 158. **Lahlou N, Fennoy I, Carel JC, Roger M.** Inhibin B and anti-Mullerian hormone, but not testosterone levels, are normal in infants with nonmosaic Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1864-1868.
 159. **Lamb DJ, Tsni YH, Steinberger A, Sauborn BM.** Sertoli cell nuclear transcriptional activity: Stimulation by follicle stimulating hormone and testosterone. *Endocrinology* 1981;108:1020-1026.
 160. **Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E.** Klinefelter's syndrome. *Lancet* 2004;364:273-283.
 161. **Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Dondero F, Culasso F, Ferro F, Cambiaso P, Caione P, Cappa M.** Unilateral cryptorchidism corrected in prepubertal age: evaluation of sperm parameters, hormones, and antisperm antibodies in adult age. *Fertil Steril* 1997; 67:943-948.
 162. **Lim HN, Hughes IA, Hawkins JR.** Clinical and molecular evidence for the role of androgens and WT1 in testis descent. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:43-50.
 163. **Lim HN, Nixon RM, Chen H, Hughes IA, Hawkins JR.** Evidence that longer androgen receptor polyglutamine repeats are a causal factor for genital abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3207-3210.
 164. **Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Maggi R, Motta M.** Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:207-212.
 165. **Lindzey J, Kumar MV, Grossmann M, Young CYF, Tindall DJ.** Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm* 1994;49:383-432.
 166. **Lipshultz LI.** Cryptorchidism in the subfertile male. *Fertil Steril* 1976;27:609-620.
 167. **Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Gilio B, Gandini L, Dondero F, Jannini EA, Lenzi A.** Androgens and fertility. *J Endocrinol Invest* 2005;28:51-5.
 168. **Loukil LH, Boudawara TS, Ayadi I, Bahloul A, Jlidi R, Ayadi H, Keske LA.** High androgen receptor immunoexpression in human "Sertoli cell only" testis. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2005;82:47-51.
 169. **Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J-A, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM.** The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis, and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 1988;2:1265-1275.
 170. **Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM.** Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988; 240: 327-330.
 171. **Luetjens CM, Gromoll J, Engelhardt M, Von Eckardstein S, Bergmann M, Nieschlag E, Simoni M.** Manifestation of

- Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Hum Reprod* 2002;17:2258-2266.
172. **Lugg JA, Penson DF, Sadeghi F, Petrie B, Freedman AL, Gonzalez-Cadavid NF, Hikim AS, Rajfer J.** Prevention of seminiferous tubular atrophy in a naturally cryptorchid rat model by early surgical intervention. *J Androl* 1996;17:726-732.
173. **MacLean HE, Choi WT, Rekaris G, Warne GL, Zajac JD.** Abnormal androgen receptor binding affinity in subjects with Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy). *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:508-516.
174. **Madden JD, Walsh PC, MacDonald PC, Wilson JD.** Clinical and endocrinologic characterization of a patient with the syndrome of incomplete testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41:751-760.
175. **Magi-Galluzzi C, Xu X, Hlatky L, Hahnfeldt P, Kaplan I, Hsiao P, Chang Ch, Loda M.** Heterogeneity of androgen receptor content in advanced prostate cancer. *Mod Pathol* 1997;10:839-845.
176. **Manin M, Veyssiere G, Cheyvalle D, Chevalier M, Lecher P, Jean C.** In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* 1992;131:2378-2386.
177. **Manning MA, Hoyme HE.** Diagnosis and management of the adolescent boy with Klinefelter syndrome. *Adolesc Med* 2002;13:367-374.
178. **Marshall DG, Valentine GH.** Testicular feminization syndrome (androgen insensitivity). *J Pediatr Surg* 1981;16:465-470.
179. **Martin-Cordova CG, Regadera J, Hernandez A, Cobo P, Nistal M.** Immunocytochemical methods in cell cultures for evaluation of cell cycle and differentiation in normal and neoplastic tissues. *J Histotechnol* 1996;19:109-114.
180. **Martinez A, Pailhoux E, Berger M, Jean C.** Androgen regulation of the mRNA encoding a major protein of the mouse vas deferens. *Mol Cell Endocrinol* 1990;72:201-211.
181. **Martínez-García F, Regadera J, Cobo P, Palacios J, Paniagua R, Nistal M.** The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 1995;27:195-206.
182. **Matsumoto AM.** Hormonal control of human spermatogenesis. In: Burger H, de Kretser C (eds.). *The Testis*. 2nd Edition, Raven Press, New York, 1989:181-196.
183. **Matsumoto AV, Karpas AE, Brenner WJ.** Chronic human chronic gonadotrophin administration in normal men: evidence that follicle stimulating hormone is necessary for the maintenance of qualitatively normal spermatogenesis in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:1184-1192.
184. **Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S.** Study of androgen receptor functions by genetic models. *J Biochem* 2005;138:105-10.
185. **McKinnell C, Sharpe RM.** Testosterone and spermatogenesis: evidence that androgens regulate cellular secretory mechanisms in stage VI-VIII seminiferous tubules from adult rats. *J Androl* 1995;16:499-509.
186. **McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD.** Genetic basis of endocrine disease. 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76: 17-23.
187. **Meeks GR, Whitworth NS, Renfroe MS.** Testicular vein and peripheral vein testosterone, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin concentrations in a patient with androgen insensitivity syndrome. *J Miss State Med Assoc* 1993;34:263-266.
188. **Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE.** Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16696-16700.
189. **Merz H, Malisius R, Mannweiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC.** ImmunoMax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. *Lab Invest* 1995;73:149-156.
190. **Mieusset R, Bujan L, Massat G, Mansat A, Pontonnier F.** Clinical and biological characteristics of infertile men with a history of cryptorchidism. *Hum Reprod* 1995;10:613-619.
191. **Mills NC.** Androgen effects on Sertoli cells. *Int J Androl* 1990;13:123-124.

192. **Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG.** Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1987;8:1-28.
193. **Mor C, Ben-Bassat M, Leiba S.** Leydig and Sertoli cells. Their fine structure in three cases of Klinefelter's syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:228-230.
194. **Morley JE, Perry HM 3rd.** Androgen treatment of male hypogonadism in older males. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:367-373.
195. **Morris JM, Mahesh VB.** Further observations on the syndrome "Testicular Feminization". *Am J Obstet Gynecol* 1963; 87:731-748.
196. **Morse HC, Heller CG.** Improvements in technique for the histochemical demonstration of 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human testis. *Histochemie* 1973;35:331-339.
197. **Mostofi FK.** Testicular tumors: Epidemiologic, etiologic and pathologic features. *Cancer* 1973;32:1186-1201.
198. **Mulder E, Peters MJ, De Vries J, Van Der Molen HJ.** Characterization of a nuclear receptor for testosterone in seminiferous tubules of mature rat testes. *Mol Cell Endocrinol* 1975;2:171-182.
199. **Mulder E, Peters MJ, Van Der Molen HJ.** Androgen receptors in testis tissue enriched in sertoli cells. In: French FS, Hansson V, Ritzén EM, Nayfeh SN (eds.), Hormonal Regulation of Spermatogenesis. New York and London, Plenum Press 1975:287-291.
200. **Muldoon TG.** Regulation of steroid hormone receptor activity. *Endocr Rev* 1980;1:339-364.
201. **Muller U, Schneider NR, Marks JF, Kupke KG, Wilson GN.** Maternal meiosis II nondisjunction in a case of 47,XXY testicular feminization. *Hum Genet* 1990;84:289-292.
202. **Munell F, Esteban C, Reventos J.** Androgen-binding protein transgenic mice as a model of study of male gonadal function. In: Martínez-García F, Regadera J (eds.). Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview. Madrid, Churchill Communications Europe España, 1998:125-134.
203. **Murphy L, O'Shaughnessy PJ.** Testicular steroidogenesis in the testicular feminized (Tfm) mouse: loss of 17 alpha-hydroxylase activity. *J Endocrinol* 1991;131:443-9.
204. **Murray TJ, Fowler PA, Abramovich DR, Haites N, Lea RG.** Human fetal testis: second trimester proliferative and steroidogenic capacities. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4812-4817.
205. **Murtha PE, Zhu W, Zhang J, Zhang S, Young ChYF.** Effects of Ca⁺⁺ mobilization on expression of androgen-regulated genes: Interference with androgen receptor-mediated transactivation by AP-1 proteins. *Prostate* 1997;33:264-270.
206. **Nistal M, Abaurrea MA, Paniagua R.** Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *J Anat* 1982;14: 351-363.
207. **Nistal M, García Rodeja E, Paniagua R.** Granular transformation of Sertoli cells in testicular disorders. *Hum Pathol* 1991;22: 131-137.
208. **Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Paniagua R.** Diagnostic value of differential quantification of spermatids in obstructive azoospermia. *J Androl* 2003;24:721-726.
209. **Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Regadera J, Serrano A, Tarin V, De Miguel MP.** Primary testicular lesions are associated with testicular germ cell tumors of adult men. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1260-1268.
210. **Nistal M, Jimenez F, Paniagua R.** Sertoli cell types in the Sertoli-cell-only-syndrome: relationships between Sertoli cell morphology and aetiology. *Histopathology* 1990;16:173-180.
211. **Nistal M, Paniagua R.** Testicular and Epididymal pathology. Thieme-Stratton, New York, 1984.
212. **Nistal M, Paniagua R.** Infertility in adult males with retractile testes. *Fertil Steril* 1984;41:395-403.
213. **Nistal M, Paniagua R.** Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG and Eble JN (eds.). Urologic Surgical Pathology. Chap 10. Mosby-Year Book Inc. St Louis, 1996:457-565.
214. **Nistal M, Paniagua R, Abaurrea MA, Pallardo LF.** 47 XXY Klinefelter's syndrome with low FSH and LH levels and absence of Leydig cells. *Andrología* 1980;12:426-433.
215. **Nistal M, Paniagua R, Abaurrea MA, Santamaria L.** Hyperplasia and the immature appearance of Sertoli cells in primary testicular disorders. *Hum Pathol*

- 1982;13:3-12.
216. **Nistal M, Paniagua R, Diez-Pardo JA.** Histologic classification of undescended testes. *Hum Pathol* 1980;11:666-674.
217. **Nistal M, Paniagua R, López-Pajarez I.** Ultrastructure of Leydig cells in Klinefelter's syndrome with 48 XXYY karyotype. *Vir chows Arch B Cell Pathol* 1978;28:39-46.
218. **Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaría L, Amat P.** A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell Tissue Res* 1986;246:229-236.
219. **Nistal M, Regadera J, Winitzky P, Tejerina E, Cheme H.** Granular changes in Sertoli cells in children and pubertal patients. *Fertil Steril* 2005;83:1489-1499.
220. **Nistal M, Santamaria L, Paniagua R.** Quantitative and ultrastructural study of Leydig cells in Klinefelter's syndrome. *J Pathol* 1985;146:323-331.
221. **Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis J, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM.** Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 1993;132:1396-1401.
222. **Odell WD, Swerdloff RS.** Etiologies of sexual maturation: a model based on sexual maturing rat. *Rec Prog Horm Res* 1976;32:245-288.
223. **Ojeifo JO, Byers SW, Papadopoulos V, Dym M.** Sertoli cell-secreted protein(s) stimulates DNA synthesis in purified rat Leydig cells *in vitro*. *J Reprod Fert* 1990;90:93-108.
224. **Orth JM.** Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 1982;203:485-492.
225. **Orth JM.** The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 1984;115:1248-1255.
226. **Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA.** Evidence from Sertoli-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988;122:787-794.
227. **Palacios J, Regadera J, Paniagua R, Gamallo C, Nistal M.** Immunohistochemistry of the human ductus epididymis. *Anat Rec* 1993; 235: 560-566.
228. **Paniagua R, Nistal M, Bravo MP.** Leydig cell types in primary testicular disorders. *Hum Pathol* 1984;15:181-190.
229. **Paniagua R, Regadera J, Nistal M, Abaurrea MA.** Histological, histochemical and ultrastructural variations along the length of the human vas deferens before and after puberty. *Acta Anat* 1981; 111:190-203.
230. **Paniagua R, Rodriguez MC, Nistal M, Fraile B, Amat P.** Changes in the lipid inclusions of Sertoli cells in the cytoplasmic area ratio during the cycle of the human seminiferous epithelium. *J Reprod Fertil* 1987;80:335-341.
231. **Paniagua R, Rodriguez MC, Nistal M, Fraile B, Regadera J, Amat P.** Changes in surface area and number of Leydig cells in relations to the 6 stages of the cycle of the human seminiferous epithelium. *Anat Embryol* 1988;178:423-427.
232. **Papadopoulos V.** Identification and purification of a human Sertoli cell secreted protein (hSCSP-80) stimulating Leydig cell steroid biosynthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1332-1339.
233. **Papadopoulos V.** Intratesticular regulation of Leydig cell function. In: Martínez-García F, Regadera J (eds.). Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview. Madrid, Churchill Communications Europe España, 1998:97-109.
234. **Papadopoulos V, Carreau S, Szerman-Joly E, Drosowsky MA, Dehennin L, Scholler R.** Rat testis 17 β -estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. *J Steroid Biochem* 1986; 24:1211-1216.
235. **Parvinen M.** Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocrinol Rev* 1982;3:404-417.
236. **Parvinen M.** Cyclic function of Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD (eds.). The Sertoli Cell. Clearwater, Cache River Press, 1993:331-347.
237. **Parvinen M, Ruokonen A.** Endogenous steroids in the rat seminiferous tubules. Comparison of the stages of the epithelial cycle isolated by transillumination-assisted microdissection. *J Androl* 1982;3:211-220.
238. **Parvinen M, Vihko KK, Toppari J.** Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int Rev Cytol* 1986;104:

- 115-151.
239. **Pelliniemi LJ, Fröjdman K, Paranko J.** Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD (eds.). *The Sertoli Cell*. Clearwater, Cache River Press, 1993:87-113.
240. **Pertschuk LP, Schaeffer H, Feldman JG, Macchia RJ, Kim YD, Eisenberg K, Braithwaite LV, Axiotis CA, Prins G, Green GL** Immunostaining for prostate cancer androgen receptor in paraffin identifies a subset of men with a poor prognosis. *Lab Invest* 1995;73:302-305.
241. **Prins G.** Prolactin influence on cytosol and nuclear androgen receptors in the ventral, dorsal and lateral lobes of the rat prostate. *Endocrinology* 1987;120:1457-1464.
242. **Prins GS, Birch L.** Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology* 1993;132:168-178.
243. **Prins GS, Birch L, Greene GL.** Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 1991;129:3187-3199.
244. **Prins GS, Woodham C, Lepinske M, Birch L.** Effects of neonatal estrogen exposure on prostatic secretory genes and their correlation with androgen receptor expression in the separate prostate lobes of the adult rat. *Endocrinology* 1993;132:2387-2398.
245. **Prym C, Lauke H.** Carcinoma-in situ of the human testis: Tumour cells are distributed focally in the seminiferous tubules. *Andrologia* 1994;26:231-234.
246. **Qayum A, Gullick W, Clayton RC, Sikora K, Waxman J.** The effects of gonadotrophin releasing hormone analogues in prostate cancer are mediated through specific tumour receptors. *Br J Cancer* 1990;62:96-99.
247. **Qayum A, Gullick W, Mellon K.** The partial purification and characterization of GnRH-like activity from prostatic biopsy specimens and prostatic cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37:899-902.
248. **Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS.** Androgen receptor defects: Historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Rev* 1995;16:271-321.
249. **Rabinovici J, Jaffe RB.** Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev* 1990;11:532-557.
250. **Raivio T, Tapanainen JS, Kunelius P, Janne OA.** Serum androgen bioactivity during 5alpha-dihydrotestosterone treatment in elderly men. *J Androl* 2002;23:919-921.
251. **Redmon JB, Carey P, Pryor JL.** Varicocele--the most common cause of male factor infertility? *Hum Reprod Update* 2002;8:53-58.
252. **Regadera J, Cobo P, Martínez-García F, Nistal M, Paniagua R.** Testosterone immunoexpression in human Leydig cells of the tunica albuginea testis and spermatic cord. A quantitative study in normal foetuses, young adults, elderly men and patients with cryptorchidism. *Andrologia* 1993;25:115-122.
253. **Regadera J, Codesal J, Paniagua R, Gonzalez-Peramato P, Nistal M.** Immunohistochemical and quantitative study of the interstitial and intratubular Leydig cells in normal men, cryptorchidism, and Klinefelter's syndrome. *J Pathol* 1991;164:299-306.
254. **Regadera J, España G, Rojas MA, Recio JA, Nistal M, Suarez-Quian CA.** Morphometric and immunocytochemical study of the fetal, infant, and adult human vas deferens. *J Androl* 1997;18:623-636.
255. **Regadera J, Martinez-Garcia F, Gonzalez-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suarez-Quian C.** Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;186:413-421.
256. **Regadera J, Martinez-Garcia F, Paniagua R, Nistal M.** Androgen insensitivity syndrome: an immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:225-234.
257. **Regadera J, Palacios J, Martin-Cordova C, Nistal M, Cobo P, Paniagua R.** Enzymohistochemical and immunohistochemical study of the human efferent ducts. *Int J Androl* 1993;16:315-323.
258. **Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Faber PW, Schweikert HU, van Rooij HC, Zegers ND, Hodgins MB, Degenhart HJ, Trapman J, Brinkmann AO.** Aberrant splicing of androgen receptor mRNA

- results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7866-7870.
259. **Ritzén EM, Boitani C, Parvinen M, French FS, Feldman M.** Stage dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. *Molec Cell Endocrinol* 1982; 25:25-33.
260. **Ritzén EM, Hansson V, French FS.** The Sertoli cell. In: Burger H, de Kretser D (eds.). *The Testis*, 2th ed. New York, Raven Press 1989:269-302.
261. **Robaire B, Viger RS.** Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 1995;52:226-236.
262. **Rommerts FFG, de Jong FH, Brinkmann AO, Van der Molen HJ.** Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 1982; 65:281-288.
263. **Rommerts FFG, Kruger-Sewnarain Bch, Van Woerkom-Blik A, Grootegoed JA, Van Der Molen HJ.** Secretion of proteins by Sertoli cell enriched cultures: Effects of FSH dibutyryl cyclic AMP and testosterone and correlation with secretion of oestradiol and ABP. *Mol Cell Endocrinol* 1978; 10:39-55.
264. **Roselli CE, West NB, Brenner RM.** Androgen receptor and 5 α -reductase activity in the ductuli efferentes and epididymis of adult rhesus macaques. *Biol Reprod* 1991;44:739-745.
265. **Roy C, Roger M, Boccon-Gibod L, Fellous M, Bonno R, Pasqualini J, Harpey JP.** Clinical, cytogenetical, histological, immunological and hormonal studies in a case of true hermaphroditism. *Clin Endocrinol* 1980;12:423-434.
266. **Roy AK, Tyagi RK, Song CS, Lavrovsky Y, Ahn SC, Oh TS, Chatterjee B.** Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann N Y Acad Sci* 2001;949:44-57.
267. **Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast ThH.** Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 1991;39:927-936.
268. **Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED.** Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, 1990.
269. **Rutgers JL, Scully RE.** The androgen insensitivity syndrome (testicular feminization): a clinocopathologic study of 43 cases. *Int J Gynecol Pathol* 1991;10: 126-144.
270. **Ryan PL, Friendship RM, Raeside JJ.** Impaired estrogen production by Leydig cells of the naturally retained testis in unilaterally cryptorchid boars and stallions. *J Androl* 1986;7:100-104.
271. **Saba P, Gambassi G, Novi AM, Luisi M.** Electron microscopy of the Leydig cells in hormone assays in Klinefelter's syndrome. *Endokrinologie* 1969;55:129-144.
272. **Sadi MV, Walsh PC, Barrack ER.** Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer: Comparison of receptor content and response to hormonal therapy. *Cancer* 1991;67:3057-3064.
273. **Saez JM, Perrard-Sapori MH, Chatelain PG, Tabone E, Rivarola MA.** Paracrine regulation of testicular function. *J Steroid Biochem* 1987;27:317-329.
274. **Saez JM, Tabone E, Perrard-Sapori MH, Rivarola Ma.** Paracrine role of Sertoli cells. *Med Biol* 1985;63:255-256.
275. **Sai T, Seino S, Chang C, Trifiro M, Pinsky L, Mhatre A, Kaufman M, Lambert B, Trapman J, Brinkmann AO, Rosenfield RL, Liao S.** An exonic point mutation of the androgen receptor gene in a family with complete androgen insensitivity. *Am J Hum genet* 1990;46: 1095-1100.
276. **Sajjad Y, Quenby SM, Nickson P, Lewis-Jones DI, Vince G.** Expression of androgen receptors in upper human fetal reproductive tract. *Hum Reprod* 2004;19:1659-1665.
277. **Salle B, Hedinger C.** Gonadal histology in children with male pseudohermaphroditism and mixed gonadal dysgenesis. *Acta Endocrinol* 1970;64:211-227.
278. **Samnakay N, Cohen RJ, Orford J, King PA, Davies RJ.** Androgen and oestrogen receptor status of the human appendix testis. *Pediatr Surg Int* 2003;19:520-524.
279. **Sanborn BM, Elkington JSH, Steinberger A, Steinberger E.** Androgen binding in the testis: *In vitro* production of androgen binding protein ABP by Sertoli cell cultures and measurement of nuclear bound androgen by a nuclear exchange

- assay. In: French FS, Hansson V, Ritz_n M, Nayfeh SN (eds.). Hormonal Regulation of Spermatogenesis. New York and London, Plenum Press, 1975:293-309.
280. **Sanborn BM, Steinberger A, Meistrich ML, Steinberger E.** Androgen binding sites in testis cell fractions as measured by a nuclear exchange assay. *J Steroid Biochem* 1975;6:1459-1465.
281. **Sanborn BM, Steinberger A, Tcholakian RK, Steinberger E.** Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cells. *Steroids* 1977;29:493-502.
282. **Sar M, Hall SH, Wilson EM, French FS.** Androgen regulation of Sertoli Cells. In: Russell LD, Griswold MD (eds.). The Sertoli Cell. Clearwater, Cache River Press, 1993:509-515.
283. **Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM.** Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 1990;127:3180-3186.
284. **Sar M, Stumpf WE, McLean WS, Smith AA, Hansson V, Nayfeh SN, French FS.** Localization of androgen target cells in the rat testis: Autoradiographic studies. In: French FS, Hansson V, Ritzén EM, Nayfeh SN (eds.), Hormonal Regulation of Spermatogenesis. New York and London, Plenum Press 1975:311-319.
285. **Sato T, Chiba A, Hayashi S, Okamura H, Ohta Y, Takasugi N, Iguchi T.** Induction of estrogen receptor and cell division in genital tracts of male mice by neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Reprod Toxicol* 1994;8:145-153.
286. **Saunders PTK, Millar MR, Majdic G, Bremner WT, McLaren TT, Grigor KM, Sharpe RM.** Testicular androgen receptor protein: distribution and control of expression. In: Desjardins C (ed.). Cellular and Molecular Regulation of Testicular Cells. Serono Symposia USA, Springer, New York; 1996:213-229.
287. **Schally AV, Srkalovic G, Szende B, Redding TW, Janaky T, Juhasz A, Korkut E, Cai RZ, Szeplshasi K, Radulovic S, Bokser L, Groot K, Sefozo P, Comaru-Schally AM.** Antitumor effects of analogs of LH-RH and somatostatin: Experimental and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37:1061-1067.
288. **Schmidt WN, Danzo BJ.** Androgen and progesterone binding components in cytosol prepared from cultures enriched in Sertoli cells from immature rat testes. *Biol Reprod* 1980;23:495-506.
289. **Schmitt S, Knorr D, Schwarz HP, Kuhle U.** Gonadotropin regulation during puberty in complete androgen insensitivity syndrome with testicles in situ. *Horm Res* 1994;42:253-256.
290. **Schoor RA, Elhanbly SM, Niederberger C.** The pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *Curr Urol Rep* 2001;2:432-436.
291. **Schulze C.** Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1984; 88:1-104.
292. **Segaloff DL, Ascoli M.** The lutropin/choriogonadotropin receptor... 4 years later. *Endocr Rev* 1993;14:324-347.
293. **Selva DM, Tirado OM, Toran N, Suarez-Quian CA, Reventos J, Munell F.** Estrogen receptor beta expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biol Reprod* 2004; 71:1461-1468.
294. **Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK.** The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003;126:13-25.
295. **Shan L-X, Hardy MP.** Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology* 1992;131: 1107-1114.
296. **Shapiro E, Huang H, Masch RJ, McFadden DE, Wu XR, Ostrer H.** Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptors alpha and beta in human fetal testis and epididymis. *J Urol* 2005;174:1695-1698.
297. **Sharpe RM.** Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds.). The Physiology of Reproduction. 3rd ed., New York, Raven Press, 1994:1363-1434.
298. **Sharpe RM, Doogan DG, Cooper I.** Intratesticular factors and testosterone secretion. *Endocrinology* 1986;119:2089-2096.
299. **Sharpe RM, Maddocks S.** Evaluation of the relative importance of endocrine and paracrine factors in control of the levels of inhibin in testicular interstitial fluid. *Int J Androl* 1989;12:295-306.
300. **Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, Kerr JB, Saunders PTK, McKinnell C.**

- Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *J Androl* 1992; 13:172-184.
301. **Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS.** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769-784.
 302. **Silva Ramos M, Oliveira JM, Cabeda JM, Reis A, Soares J, Pimenta A.** The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to cryptorchidism. *Int Braz J Urol* 2006;32:330-334.
 303. **Sinisi AA, Pasquali D, Notaro A, Bellastella A.** Sexual differentiation. *J Endocrinol Invest* 2003;26:23-28.
 304. **Sizonenko PC, Cuendet A, Daumier L.** FSH. I. Evidence for its mediating role on testosterone secretion in cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;37:68-73.
 305. **Skakkebaek NE.** Carcinoma in situ of the testis. *Lancet* 1972;2:516-518.
 306. **Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J.** Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 1987;10:19-28.
 307. **Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Muller J.** Carcinoma in situ of the undescended testis. *Urol Clin North Am* 1982;9:377-385.
 308. **Skinner MK, Fritz IB.** Androgen stimulation of Sertoli cell function is enhanced by peritubular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1985;40:115-122.
 309. **Skinner MK, Griswold MD.** Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biol Reprod* 1982;27:211-221.
 310. **Smith BD, Leeson CR, Bunge RG.** Microscopic appearance of the testis in Klinefelter's syndrome before and after suppression of gonadotrophin production with testosterone. *Invest Urol* 1967;5:58-72.
 311. **Smith AA, McLean WS, Nayfeh SN, French FS.** Androgen receptor in rat testis. In: French FS, Hansson V, Ritzén EM, Nayfeh SN (eds.), *Hormonal Regulation of Spermatogenesis*. New York and London, Plenum Press 1975:257-280.
 312. **Sneddon SF, Walther N, Saunders PT.** Expression of androgen and estrogen receptors in sertoli cells: studies using the mouse SK 11 cell line. *Endocrinology* 2005;146:5304-5312.
 313. **Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE.** Estrogen receptors {alpha} and {beta} (ER{alpha} and ER{beta}) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER{beta} and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005;20:3481-3487.
 314. **Sonea IM, Iqbal J, Prins GS, Jacobson CD.** Ontogeny of androgen receptor-like immunoreactivity in the reproductive tract of male *Monodelphis domestica*. *Biol Reprod* 1997;56:852-860.
 315. **Spencer JR, Torrado T, Sanchez RS, Vaughan ED Jr, Imperato-McGinley J.** Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. *Endocrinology* 1991; 129:741-8
 316. **Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A.** PGD in 47,XXY. Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update* 2003;9:319-330.
 317. **Steinberger E, Smith KD, Perloff WH.** Spermogenesis in Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 1965;25:1325-1330.
 318. **Stenchever MA, Ng ABP, Jones GK.** Testicular feminization syndrome: Chromosomal, histologic and genetic studies in a large kindred. *Obstet Gynecol* 1969;33:649-657.
 319. **Suarez-Quian CA, Martinez-Garcia F, Nistal M, Regadera J.** Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:350-358.
 320. **Suarez-Quian CA, Oke BO, Musto N.** Localization of the androgen receptor in the rodent testis. In: Martínez-García F, Regadera J (eds.). *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview*. Madrid, Churchill Communications Europe España, 1998:113-124.
 321. **Suarez-Quian CA, Oke BO, Vornberger W.** Localisation du recepteur des androgens dans le testicule. *Andrologie* 1997;7:293-304.
 322. **Suarez-Quian CA, Oke BO, Vornberger W, Prins G, Xiao S, Musto N.** Androgen receptor distribution in the testis. In: Desjardins C (ed.). *Cellular and Molecular Regulation of Testicular Cells*. Sero

- Symposia USA, Springer, New York; 1996:189-212.
323. **Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, Lumbroso S, Nicolas J.** Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178:99-105.
324. **Sultan C, Paris F, Terouanne B, Balaguer P, Georget V, Poujol N, Jeandel C, Lumbroso S, Nicolas JC.** Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Hum Reprod Update* 2001;7:314-322.
325. **Suzuki H, Akakura K, Komiya A, Aida S, Akimoto S, Shimazaki J.** Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: Relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate* 1996;29:153-158.
326. **Suzuki Y, Sasagawa I, Ashida J, Nakada T, Muroya K, Ogata T.** Screening for mutations of the androgen receptor gene in patients with isolated cryptorchidism. *Fertil Steril* 2001;76:834-836.
327. **Suzuki Y, Sasagawa I, Tateno T, Ashida J, Nakada T, Muroya K, Ogata T.** Mutation screening and CAG repeat length analysis of the androgen receptor gene in Klinefelter's syndrome patients with and without spermatogenesis. *Hum Reprod* 2001;16:1653-1656.
328. **Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J.** Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46:759-765.
329. **Syms AJ, Norris JS, Panko WB, Smith RG.** Mechanism of androgen receptor augmentation. *J Biol Chem* 1985;260:455-461.
330. **Tähkä KM, Zhuang Y-H, Tähkä S, Tuohimaa P.** Photoperiod-induced changes in androgen receptor expression in testes and accessory glands of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Biol Reprod* 1997; 56:898-908.
331. **Takeda H, Chang C.** Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of androgen receptor expression during the development of the mouse prostate gland. *J Endocrinol* 1991; 129:83-89.
332. **Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C.** Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol* 1990;126:17-25.
333. **Tan KA, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PT, Denolet E, Verhoeven G.** The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 2005;146:2674-2683.
334. **Tan J-A, Joseph DR, Quarmby VE, Lubahn DB, Sar M, French FS, Wilson EM.** The rat androgen receptor: Primary structure, autoregulation of its messenger ribonucleic acid, and immunocytochemical localization of the receptor protein. *Mol Endocrinol* 1988;2:1276-1285.
335. **Tan KA, Turner KJ, Saunders PT, Verhoeven G, de Gendt K, Atanassova N, Sharpe RM.** Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in Sertoli Cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. *Biol Reprod* 2005;72:1151-1160.
336. **Tanyel FC, Yuzbasioglu A, Kocafe C, Orhan D, Ozguc M.** Androgen receptor immunostaining and androgen receptor messenger ribonucleic acid expression are increased in cremaster muscles associated with undescended testis. *Urology* 2006;67:855-858.
337. **Tapanainen JS, Aittomäki K, Jiang M, Vaskivuo T, Huhtaniemi I.** Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature Genet* 1997;15:205-206.
338. **Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP.** Mutation of the androgen receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 1995;332:1393-1398.
339. **Taragnat C, Berger M, Jean C.** Preliminary characterization, androgen-dependence and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferens. *J Reprod Fertil* 1988;83:835-842.
340. **Tcholakian RK, Steinberger A.** In vitro metabolism of testosterone by cultured Sertoli cells and the effect of FSH. *Steroids* 1979;33:495-526.
341. **Tcholakian RK, Steinberger A, Newaz**

- SN. Identification of a new Sertoli cell metabolite of testosterone: 5a-androstane-3a, 16a, 17b-triol, by HPLC and GC-MS. *J Steroid Biochem* 1987; 6:619-625.
342. **Tekpetey FR, Amann RP.** Regional and seasonal differences in concentrations of androgen and estrogen receptors in ram epididymal tissue. *Biol Reprod* 1988; 38:1051-1060.
343. **Tekpetey FR, Veeramachaneni DNR, Amann RP.** Localization of androgen receptors in ram epididymal principal cells. *J Reprod Fertil* 1989; 87:311-319.
344. **Teter J; Boczkowski K.** Testicular feminization with and without clitoral enlargement. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 94:813-819.
345. **Thomas NS, Hassold TJ.** Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update* 2003;9:309-317.
346. **Tincello DG, Saunders PT, Hargreave TB.** Preliminary investigations on androgen receptor gene mutations in infertile men. *Mol Hum Reprod* 1997;3:941-943.
347. **Tindall DJ, Miller DA, Means AR.** Characterization of androgen receptors in Sertoli cell-enriched testis. *Endocrinology* 1977;101:13-23.
348. **Tirado OM, Selva DM, Toran N, Suarez-Quian CA, Jansen M, McDonnell DP, Reventos J, Munell F.** Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J Androl* 2004;25:84-94.
349. **Truss M, Beato M.** Steroid hormone receptors: interaction with desoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993;14:459-479.
350. **Tsai Morris CH, Aquilano DR, Dufau ML.** Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 1985;116:38-46.
351. **Tsuruta J, Griswold MD.** Sertoli cell and germ cell cystatin C: stage-dependent expression of two distinct messenger ribonucleic acid transcripts in rat testis. *Biol Reprod* 1993;49:1045-1054.
352. **Tsutsui K.** Pituitary and gonadal hormone-dependent and -independent induction of follicle-stimulating hormone receptors in the developing testis. *Endocrinology* 1991; 128:477-487.
353. **Turner TT, Yamamoto M.** Different mechanisms are responsible for ³H-androgen movement across the rat seminiferous and epididymal epithelia *in vivo*. *Biol Reprod* 1991;45:358-364.
354. **van Alphen MM, Van De Kant HJ, De Rooij DG.** Follicle-stimulating hormone stimulates spermatogenesis in adult monkey. *Endocrinology* 1988;123: 1449-1455.
355. **van der Kwast TH, Schalken J, Ruizeveld de Winter JA, van Vroonhoven CC, Mulder E, Boersma W, Trapman J.** Androgen receptors in endocrine therapy-resistant human prostate cancer. *Int J Cancer* 1991;48:189-193.
356. **van Haren L, Flinterman JF, Rommerts FF.** Inhibition of the luteinizing hormone-dependent induction of cholesterol side chain cleavage enzyme in immature rat Leydig cells by Sertoli cell products. *Eur J Endocrinol* 1995;132:627-634.
357. **van Pottelbergh I, Lumbroso S, Goemaere S, Sultan C, Kaufman JM.** Lack of influence of the androgen receptor gene CAG-repeat polymorphism on sex steroid status and bone metabolism in elderly men. *Clin Endocrinol* 2001;55:659-666.
358. **van Roijen JH, van Assen S, van der Kwast TH, de Rooij DG, Boersma WJ, Vreeburg JT, Weber RF.** Androgen receptor immunoexpression in the testes of subfertile men. *J Androl* 1995; 16:510-516.
359. **Verhoeven G.** A Sertoli cell-specific knock.out of the androgen receptor. *Andrologia*. 2005;37:207-208.
360. **Verhoeven G, Cailleau J.** A Leydig cell stimulatory factor produced by human testicular tubules. *Mol Cell Endocrinol* 1987;49:137-147.
361. **Verhoeven G, Cailleau J.** Follicle-stimulating hormone and androgens increase the concentration of the androgen receptor in Sertoli cells. *Endocrinology* 1988;122:1541-1550.
362. **Vernaev V, Staessen C, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P, Tournaye H.** Can biological or clinical parameters predict testicular sperm recovery in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients? *Hum Reprod* 2004;19:1135-1139.
363. **Vihko KK, Suominen JSO, Parvinen M.** Cellular regulation of plasminogen activator secretion during spermatogenesis. *Biol Reprod* 1984;31:383-389.

364. **Visoosak J, Aylstock M, Graham JM Jr.** Klinefelter syndrome and its variants: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr* 2001;40:639-651.
365. **von Eckardstein S, Syska A, Gromoll J, Kamischke A, Simoni M, Nieschlag E.** Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2585-2590.
366. **Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA.** Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 1994;134:2307-2316.
367. **Walker WH.** Nongenomic actions of androgen in Sertoli cells. *Curr Top Dev Biol* 2003;56:25-53.
368. **Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, Wu CC, di Sant'agnese PA, de Mesy-Bentley KL, Tzeng CR, Chang C.** Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursey and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 2006 (en prensa).
369. **Wartenberg H.** Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J Electron Microsc Tech* 1991;19:133-157.
370. **Wiener JS, Marcelli M, Gonzales ET Jr, Roth DR, Lamb DJ.** Androgen receptor gene alterations are not associated with isolated cryptorchidism. *J Urol* 1998;160:863-865.
371. **Wiener JS, Teague JL, Roth DR, Gonzales ET Jr., Lamb DJ.** Molecular biology and function of the androgen receptor in genital development. *J Urol* 1997;157:1377-1386.
372. **Wikstrom AM, Raivio T, Hadziselimovic F, Wikstrom S, Tuuri T, Dunkel L.** Klinefelter syndrome in adolescence: onset of puberty is associated with accelerated germ cell depletion. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2263-2270.
373. **Wilson JD, George FW, Renfree MB.** The endocrine role in mammalian sexual differentiation. *Recent Prog Horm Res* 1995;50:349-364.
374. **Wilson, JD; Harrod, MJ; Goldstein, Hemsell DL, McDonald PC.** Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type I: Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestations in a family with the Reifenstein syndrome. *N Engl J Med* 1974;290:1097-1103.
375. **Wilson EM, Smith AA.** Localization of androgen receptors in rat testis: Biochemical studies. In: French FS, Hansson V, Ritzén EM, Nayfeh SN (eds.), *Hormonal Regulation of Spermatogenesis*. New York and London, Plenum Press 1975: 281-286.
376. **Winters SJ.** Seminiferous tubule androgen receptors in experimental cryptorchidism. *J Endocrinol* 1986;109:427-33.
377. **Wolf DA, Herzinger T, Hermeking H, Blaschke D, Hörz W.** Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol* 1993;7:924-936.
378. **Word RA, George FW, Wilson JD, Carr BR.** Testosterone synthesis and adenylate cyclase activity in the early human fetal testis appear to be independent of human chorionic gonadotropin control. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;69:204-208.
379. **Wright WW.** Germ cell-Sertoli cell interactions: analysis of the biosynthesis and secretion of cyclic protein-2. *Dev Biol* 1988;130:45-56.
380. **Wright WW, Frankel AI.** An androgen receptor in the nuclei of late spermatids in testes of male rats. *Endocrinology* 1980;107:314-317.
381. **Wright WW, Zabludoff SD, Erickson LM, Karzai AW.** Germ cell-Sertoli cell interactions. Studies of cyclic protein-2 in the seminiferous tubule. *Ann NY Acad Sci* 1989;564:173-185.
382. **Zhang T, Guo C-X, Hu Z-Y, Liu Y-X.** Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. *Mol Hum Reprod* 1997;3:945-952.
383. **Zhang YL, Zhou ZX, Zhang YD, Parker MG.** Expression of androgen receptors and prostatic steroid-binding protein during development of the rat ventral prostate. *J Endocrinol* 1988;117:361-366.
384. **Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H.** Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec* 1996;245:509-518.
385. **Zhou Z, Lane MV, Kempainen JA, French FS, Wilson EM.** Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions

- influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 1995;9:208-218.
386. **Zoppi S, Marcelli M, Deslypere J-P, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ.** Amino acid substitutions in the DNA-binding domain of the human androgen receptor are a frequent cause of receptor-binding positive androgen resistance *Mol Endocrinol* 1992;6:409-415.