

Inhibina B y receptor de andrógenos en testículos criptorquídicos pre y post-puberales. (Inhibin B and androgen in pre/post-puberal cryptorchid testes)

Gómez-Pérez Roald¹✉, Montañez Cristhofer², González-Peramato Maria Pilar², Osuna Jesus Alfonso¹, Regadera Javier³, Baldonado Rosamary⁴, Nistal Manuel².

¹Hospital Universitario de Los Andes, Unidad de Endocrinología, Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela.

²Departamento de Anatomía Patológica, Hospital La Paz. Madrid, España.

³Departamento de Morfológicas. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

⁴Centro Clínico Maestranza, Madrid. España.

Recibido: 28 de Diciembre de 2018.

Aceptado: 20 de Octubre 2019.

Publicado online: 31 de Diciembre 2019.

[Artículo Original]

PII: S2477-9369(19)08001-O

Resumen (español)

Nuestro objetivo fue correlacionar la expresión de Inhibina B y el receptor de andrógenos (RA) en las células de Sertoli y en las células de Leydig en testículo criptorquídico pre y postpuberal. Se dividieron las muestras en 3 grupos, el grupo 1 correspondió a testículos criptorquídicos prepuberales, el grupo 2 testículos criptorquídicos postpuberales y el grupo 3 fueron testículos normales como grupo control. La cuantificación de estas moléculas se realizó mediante la digitalización de las imágenes microscópicas y su valoración microdensitométrica. Grupo 1 n=9 edad promedio 5.7 años, grupo 2 n=17 edad promedio 19.7 años y grupo 3 n=8 edad promedio 51.9 años. En los grupos 1 y 2 se observó baja inmunotinción de Inhibina B y del RA en el compartimiento adluminal de las células de Sertoli próximas al epitelio seminífero de las espermátidas inmaduras, en comparación a las que estaban junto a espermátidas maduras ($p < 0.001$); en las áreas de túbulos con hipoespermatogénesis focal se observó disminución significativa de la expresión de Inhibina B y del RA de las células de Sertoli ($p < 0.0001$). Ambos grupos criptorquídicos mostraron baja inmunotinción de Inhibina B y de RA tanto en células de Sertoli como en células de Leydig, comparados con el grupo control ($p < 0.0001$). En la criptorquidia existe disminución de la expresión de Inhibina B y del RA en las células de Sertoli y Leydig, asociado a hipoespermatogénesis, atrofia tubular y lesiones disgenéticas de los túbulos seminíferos frecuentemente observadas en estos pacientes.

Palabras clave (español)

Criptorquidia, inhibina B, receptor andrógenos

Abstract (english)

The aim of our study was to correlate the immunohistochemical expression of B Inhibin and androgens receptor (AR) in Leydig and Sertoli cells of cryptorchid testes. The samples were divided in three groups, the group 1 was cryptorchid prepuberal testes, the group 2 was cryptorchid postpuberal testes and group 3 was the control (normal testes). The measure of these molecules was performed by the digitization of the microscopic images and microdensitometrical evaluation with a Leica program. Group 1 n=9 mean age 5.7 years, group 2 n=17 mean age 19.7 years, group 3 n=8 mean age 51.9 years. In groups 1 and 2 was observed low inhibin B and AR immunostaining in the adluminal area of Sertoli cells next to the seminiferous epithelium of immature spermatids, in comparison with Sertoli cells next to mature spermatids ($p < 0.001$). Both cryptorchid groups reported low inhibin B and AR immunostaining, even in Sertoli and Leydig cells, in comparison with the control group ($p < 0.0001$). In cryptorchidism, exists a decrease in the expression of B Inhibin and AR of Sertoli and Leydig cells. This find is related to hipoespermatogénesis, frequently associated with atrophy and disgenetic seminiferous tubules in these patients

Keywords (english)

Cryptorchidism, B inhibin, androgen receptor.

Introducción

El descenso testicular es un evento complejo que puede ser influenciado genéticamente, interviniendo a su vez factores hormonales y anatómicos (1,2). Este proceso ocurre en dos fases, la transabdominal y transinguinal (2). En la primera, entre las semanas 12 a la 16, el testículo se desplaza hacia la región inguinal; acción regulada por la hormona anti-Mülleriana (HAM), el factor insulino similar tipo 3 (InsI3) y por la presión intra-abdominal. En la segunda fase, el testículo migra hacia el escroto entre las semanas 26 a la 32, acción regulada por los andrógenos, el nervio genitofemoral, y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) (3).

La falta del descenso testicular fisiológico es conocida como criptorquidia, la cual puede ser unilateral (80% de los casos, lo que descarta como causa insuficiencia del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (4) o bilateral. Además, la criptorquidia está asociada a varios síndromes genéticos por lo que varios autores la consideran una condición endocrino-genética (5-8), la cual junto a la hipospadia, el cáncer testicular y la infertilidad forman parte del denominado "síndrome del testículo disgenético" (9,10). La criptorquidia se puede asociar a semen de mala calidad, concentración baja de espermatozoides y fertilidad alterada (11). La frecuencia de criptorquidia que se ha encontrado en el hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) es de 1,7%, siendo mayor en recién nacidos pretérminos, con 10,8% (12).

Aun con tratamiento adecuado (orquidopexia y tratamiento hormonal (5,6)) existe daño celular que compromete la espermatogénesis (13,14). Entre menor sea el diámetro tubular medio, menor células de Sertoli se desarrollarán, lo que disminuye a su vez el índice de fertilidad medio (15,16), lo que en otras palabras significa que, a mayor gravedad de lesiones testiculares en la infancia, menor cantidad y calidad de la espermatogénesis en la vida adulta (17).

Tanto las células de Sertoli, las de Leydig y las células mioideas juegan un papel primordial en la espermatogénesis efectiva (18-20). La Inhibina/activina, regulan la producción y liberación de FSH de la hipófisis anterior, mediante un efecto de retroalimentación o *feedback* de asa larga (21,22). Los inmunoanálisis específicos han permitido demostrar que la inhibina B es la forma circulante producida en el

hombre en la vida fetal y adulta (23-25). En la pubertad, las células de Sertoli parecen ser la fuente celular más probable de la producción de inhibina B, luego de la pubertad su secreción se asocia a la concentración espermática (26).

La síntesis y secreción de la inhibina B por las células de Sertoli están regulados por el receptor de andrógenos (RA) (27), recibiendo señales paracrinas de las células de Leydig y por medio de diferentes cascadas de señalización, regulan la espermatogénesis y la espermiogénesis. En el testículo humano, la inmunoexpresión del RA se observa en las células de Sertoli, Leydig, células mioideas peritubulares y periarteriolares; en contraste, no existe inmunomarcaje para el RA en las células germinales (28,29). En pacientes con criptorquidia unilareral no se observan mutaciones del RA en la mayoría de los casos (28,10,31), lo que contrasta con el estudio de Regadera y cols (31) en donde 63% de los pacientes con testículos localizados en el escroto tenían niveles altos de RA, mientras que en 85% de los pacientes con criptorquidia tenían niveles bajos. Además, en los pacientes con testículos intraabdominales los niveles de RA fueron tan bajos como en el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (30,31).

En la presente investigación se analizó la distribución de inmunomarcaje de la inhibina B y el RA en testículos de adultos normales y en testículos criptorquídicos pre y postpuberales, con la finalidad de hallar relaciones entre su expresión y la presencia de criptorquidia.

Materiales y métodos

Las muestras se tomaron del archivo de la Unidad de Histología de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y del Hospital Universitario La Paz de Madrid, UAM. Se dividieron en 3 grupos, El grupo 1 (criptorquidia prepuberal) correspondió a muestras de testículos de niños con criptorquidia y orquidectomía unilateral, el grupo 2 (criptorquidia postpuberal) fueron muestras de testículos postpuberales con criptorquidia y orquidectomía, el grupo 3 (grupo control) correspondió a muestras de testículos adultos normales.

La mayoría de las piezas obtenidas por orquidectomía 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 el líquido de Bouin, fijador habitual de conservación de todas las biopsias testiculares obtenidas en niños y en pacientes adultos para diagnóstico y para evaluación desde el punto de vista de pronóstico de la fertilidad.

Método Inmunohistoquímico para la Detección de Inhibina B y del RA. Se utilizó el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), para evaluar la expresión de Inhibina B y del Receptor de Andrógenos (RA) en los diferentes grupos estudiados, mediante los anticuerpos monoclonales anti-Inhibina B (Dako, Glostrup, Denmark), diluido habitualmente a 1:500 y anti-RA (Dako, Glostrup, Denmark), diluido habitualmente a 1:500.

Para realizar el método inmunohistoquímico de detección de la expresión de Inhibina B, 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.

Las preparaciones se procesaron con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, con las modificaciones establecidas por nuestro Laboratorio. A continuación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente, luego se procedió al desmascaramiento del epítipo mediante tratamiento por calor. Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó un lavado rápido de dos minutos, en H₂O destilada. Se lavaron las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7.4. Seguidamente se realizó el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el anticuerpo primario anti-Inhibina B (Dako) y anti-RA (Dako); cada uno de ellos a la dilución de 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, 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 fue 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 (Probus, Badalona).

Medición Microdensitométrica de la expresión de Inhibina B y del RA. Se seleccionó una preparación histológica representativa de cada caso, en la que se comprobó una correcta realización del método inmunohistoquímico para la detección de Inhibina B y de RA. Se fotografiaron 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 tomó mediciones mediante el analizador de imágenes Leica con el programa informático Leica DCViewer. Para lo cual se tomaron las medidas microdensitométricas de alrededor de 20 puntos en cada área del citoplasma de las células de Sertoli inmunoteñido con anti-Inhibina B, y se calculó el valor medio por célula 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-Inhibina B, en relación con las áreas específicas de cada estadio madurativo de la espermatogénesis, o de cada lesión específica del epitelio seminífero. Con respecto al RA, la valoración microdensitométrica se realizó de modo similar, determinado la DOI de la expresión de anti-RA en 20 mediciones por cada núcleo de las células de Sertoli adyacentes a cada lesión específica del epitelio seminífero. Se usó 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 de Inhibina B, 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 han 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 la porción basal y adluminal del citoplasma de las células de Sertoli inmunomarcado, se tomaron 100 mediciones del valor "blanco", esto es, del fondo de la preparación sin tejido; de esto 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 se pudiera comparar entre sí la intensidad de expresión de Inhibina B. 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 este color.

Análisis estadístico. Los datos fueron recolectados a través de una ficha diseñada *ad hoc* para la investigación, se analizaron con el SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Se consideró como significancia estadística una $p < 0.05$. El análisis de correlación de Pearson fue utilizado para determinar la relación entre dos variables. Una $r \geq 0.5$ fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados

Grupo 1 (criptorquidia prepuberal): $n=9$, edad media 5.7 años. Grupo 2 (criptorquidia postpuberal): $n=17$, edad media 19.7 años. Grupo 3 (control): $n=8$, edad media 51.9 años. Se describirá primero el grupo número 3 por ser el grupo con hallazgos normales (grupo control).

A la observación por microscopía de luz, en el grupo 3, los tubos seminíferos con espermatogénesis normal presentan una intensidad de inmunotinción de inhibina B igual en la mayoría de las células de Sertoli. No obstante, las células de Sertoli adyacentes a las áreas tubulares, en las que se observó diferenciación de espermátidas redondas y maduras, presentaron mayor tinción en las zonas en las que la diferenciación germinal se ha completado, esto es, en las que se han diferenciado hasta espermátidas elongadas. El inmunomarcaje con inhibina B delimitó adecuadamente el citoplasma apical de las células de Sertoli. La expresión de inhibina B es mayor en las áreas del citoplasma de las células de Sertoli próximas a la barrera hematotesticular, lo que sugiere

correlación con el grado de expresión de la inhibina B, sobre todo cuando ya se ha completado la segunda división meiótica. En algunas áreas de hipoespermatoogénesis se aprecian áreas vacías en los túbulos (vacuolas del epitelio seminífero), consecuencia de pérdida de pequeñas células germinales; alrededor de estas vacuolas hubo poco marcaje de inhibina B, incluso ausencia de este en la pared de las vacuolas intraepiteliales. Sin embargo, en aquellos túbulos en los que se observa una completa desorganización del epitelio, asociado con descamación de células germinales inmaduras y con múltiple formación de vacuolas, la intensidad de inmunoexpresión de inhibina B está significativamente disminuida; por ello, existe todo un gradiente de inmunotinción de inhibina B, desde áreas con robusto marcaje en el citoplasma de las células de Sertoli, hasta áreas que carecen de inmunotinción (ver figura 1).

El grupo 2 (criptorquidia postpuberal) presentó marcaje de inhibina B adecuado en aquellos túbulos que han experimentado el crecimiento puberal y que incluso tienen diferenciación parcial de células germinales. Contrariamente estudiando los mismos casos, en las áreas formadas por lobulillos con túbulos

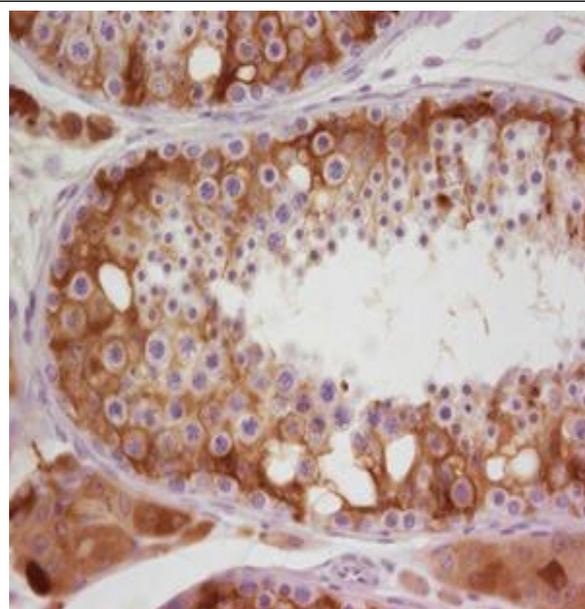


Figura 1. Expresión de inhibina B de testículos normales. Tubos seminíferos bien constituidos, se observa espermatogénesis completa en la mayor parte de la superficie tubular. La expresión de inhibina B es homogénea, con reforzamiento a nivel de las uniones Sertoli-Sertoli. El citoplasma de las células de Leydig muestra expresión de inhibina B.

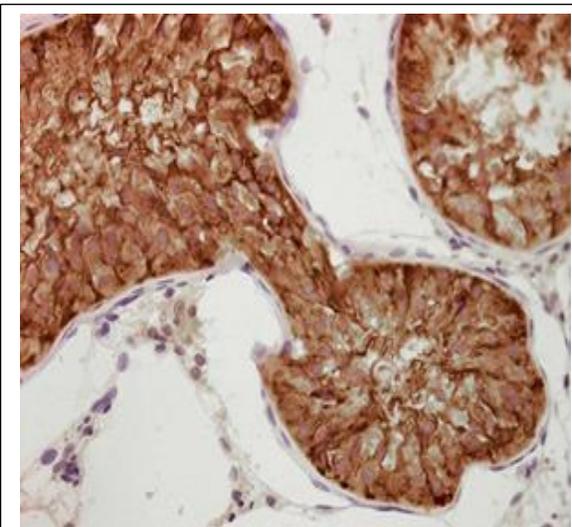


Figura 2. Expresión de inhibina B en testículo criptorquídico postpuberal. Tubo seminífero malformado, de contorno muy irregular constituido por un patrón de solo Sertoli de células disgenéticas. Algunas células de Sertoli presentan expresión filiforme de inhibina B, tipo granular.

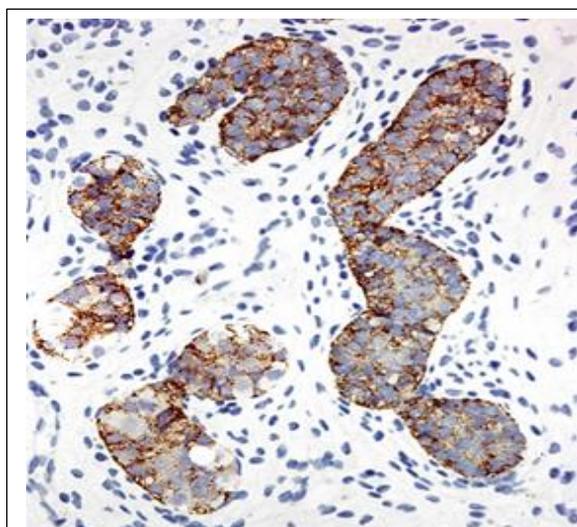


Figura 3. Expresión de inhibina B en el testículo criptorquídico infantil. Tubos seminíferos disgenéticos con hiperplasia de células de Sertoli, la mayoría de las cuales carecen de inhibina B o muy tenue. La mayoría de las células intersticiales son de tipo mesenquimal inmaduras inhibina B negativa.

inmaduros de aspecto disgenético, sólo se observa inmunomarcaje de inhibina B focalmente disminuido y a veces la tinción es muy tenue. En algunos casos se observa tubos seminíferos de moderado tamaño, constituido por un patrón de sólo Sertoli. La expresión de inhibina B en las células de Sertoli es muy irregular, siendo ligeramente mayor en las uniones Sertoli-Sertoli y en el citoplasma perinuclear, (ver figura 2). Por otra parte, las células de Leydig experimentan una muy variable expresión de inhibina B, la cual disminuye muy sensiblemente en los nódulos microadenomatosos de células de Leydig frecuentemente observados en los testículos criptorquídicos postpuberales con fibrosis severa. Estas alteraciones de la expresión de inhibina B también se evidencian, aunque con valores muy variables, en el testículo criptorquídico infantil (Grupo 1). En todos los casos de criptorquidia (Grupos 1 y 2), hemos encontrado niveles de inmunomarcaje más bajos comparados con individuos normales, siendo menor el marcate en los pacientes postpuberales. En cortes histológicos de testículos con criptorquidia prepuberal observamos un intersticio amplio y túbulos seminíferos de reducido tamaño, con células de Sertoli disgenéticas y muy baja tinción de inhibina B; en algunos cortes, se observan células germinales rodeadas de células de Sertoli con moderada

expresión de inhibina B. Además, en la mayoría de los casos las células de Sertoli son disgenéticas, como muestra la figura 3.

Con respecto al RA, en los grupos 1 y 2 tiene un comportamiento en parte semejante al de la inhibina B. El RA se expresa, aunque con una intensidad notoriamente menor, en los túbulos que han experimentado transformación puberal, sin embargo, en los túbulos infantiles con importantes cambios disgenéticos, solo se muestran trazas de RA en algunos núcleos de células de Sertoli, mientras que la mayoría de estos núcleos de células de Sertoli disgenéticas carecen de inmunomarcaje para el RA, (ver figura 4). Estos cambios de la expresión del RA son muy profundos y posiblemente de origen congénito, ya que comienzan a observarse en los testículos criptorquídicos infantiles a partir de los 4 años. También hemos detectado una intensa expresión del RA en todos los núcleos de las células epiteliales y musculares de la vía espermática intra y extra testicular de hombres normales, asimismo, es muy intensa en la vía espermática de los casos con criptorquidia pre y postpuberal, lo que contrasta con la débil tinción de RA en las células de Sertoli de estos mismos casos.

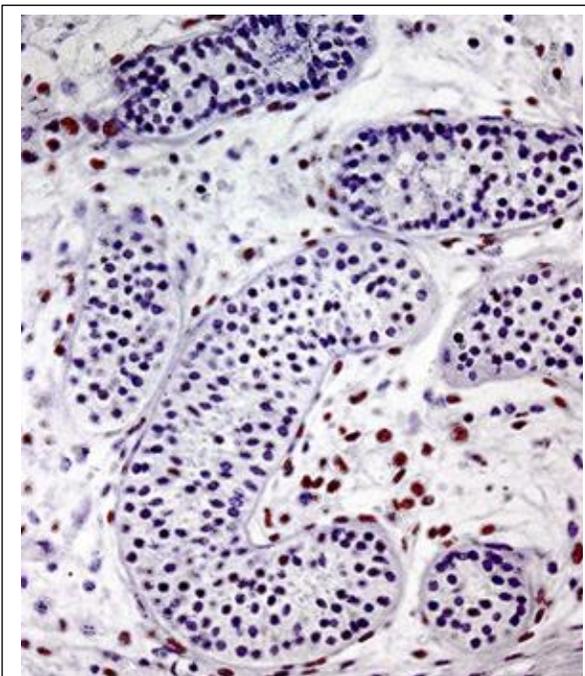


Figura 4. *Expresión del receptor de andrógenos en el testículo criptorquídico infantil. Túbulos seminíferos disgenéticos, contiene células de Sertoli inmaduras de núcleo redondo, las cuales carecen de RA. En el intersticio se observa expresión de RA en los núcleos de las células peritubulares y de las células de Leydig.*

Las cuantificaciones microdensitométricas de la expresión de inhibina B y del RA corroboran y precisan mejor estos cambios que experimentan los testículos criptorquídicos. De hecho, la figura 5a refleja la intensidad de inmunomarcaje de la inhibina B en las células de Sertoli en relación con las alteraciones de hipoespermatogénesis y atrofia relacionadas con la criptorquidia. Se observa una marcada diferencia entre las muestras con criptorquidia y los tejidos de individuos normales, la cual es estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). Cuando se comparan los valores densitométricos de la expresión de inhibina B y la del RA en todos los testículos estudiados, se evidencia una correlación positiva y significativa ($p < 0,001$) (ver figuras 5b,c y d). Por último, con respecto a las células de Leydig, la cuantificación de la inhibina B demuestra diferencias significativas en los tres grupos estudiados ($p < 0,001$).

Discusión

En este trabajo se ha centrado en la valoración inmunohistoquímica de la Inhibina B y el RA en el testículo del hombre adulto normal, así como en los cambios que pudiera experimentar en relación con la progresiva atrofia en las lesiones primarias presentes en el testículo criptorquídico de niños y adultos jóvenes.

En el testículo del adulto normal y en relación con los estadios madurativos de la espermatogénesis, las células de Sertoli presentan un inmunomarcaje de RA variable, lo cual está relacionado con los estadios de maduración espermáticos. Datos similares han sido presentados por Suarez-Quian y col. (28) quienes observaron que la intensidad de la tinción fue menor en las etapas V y VI del ciclo del epitelio seminífero que en la etapa III, pero la intensidad de tinción fue mayor que en las etapas I y II. Las determinaciones microdensitométricas corroboraron un inmunomarcaje de mayor intensidad en el testículo humano normal al compararlo con los otros grupos con criptorquidia. Estos hallazgos se observan claramente en los cortes histológicos, donde hay una correlación importante entre la inmuno tinción de los núcleos de las células de Sertoli de túbulos seminíferos con espermatogénesis conservada. Estos resultados en humanos son congruentes con los resultados obtenidos en de modelos experimentales, en los que se ha demostrado que una supresión de andrógenos endógenos provoca un bloqueo temprano en la meiosis, y, contrariamente, la administración concomitante de testosterona, o de uno de sus metabolitos activos, permite la finalización de la meiosis y formación de las espermátidas (32,33).

Los andrógenos podrían actuar bien directamente sobre las células germinales (33) o bien afectar al desarrollo de las células germinales indirectamente al actuar sobre las células testiculares somáticas, como las células de Sertoli y las células mioides de la zona peritubular (34-36). Una acción directa en las células germinales a través de la vía clásica por acción sobre el RA parece poco probable, ya que la mayoría de las pruebas sugieren, en las crías de roedores, después del parto, las células germinales no expresan el RA (37). Como otros estudios, no observamos inmuno marcate de RA en células germinales en ninguno de sus estadios de maduración. Si los andrógenos actúan indirectamente a través de las células somáticas, las células de Sertoli son las candidatas principales a cumplir esta función, dado a

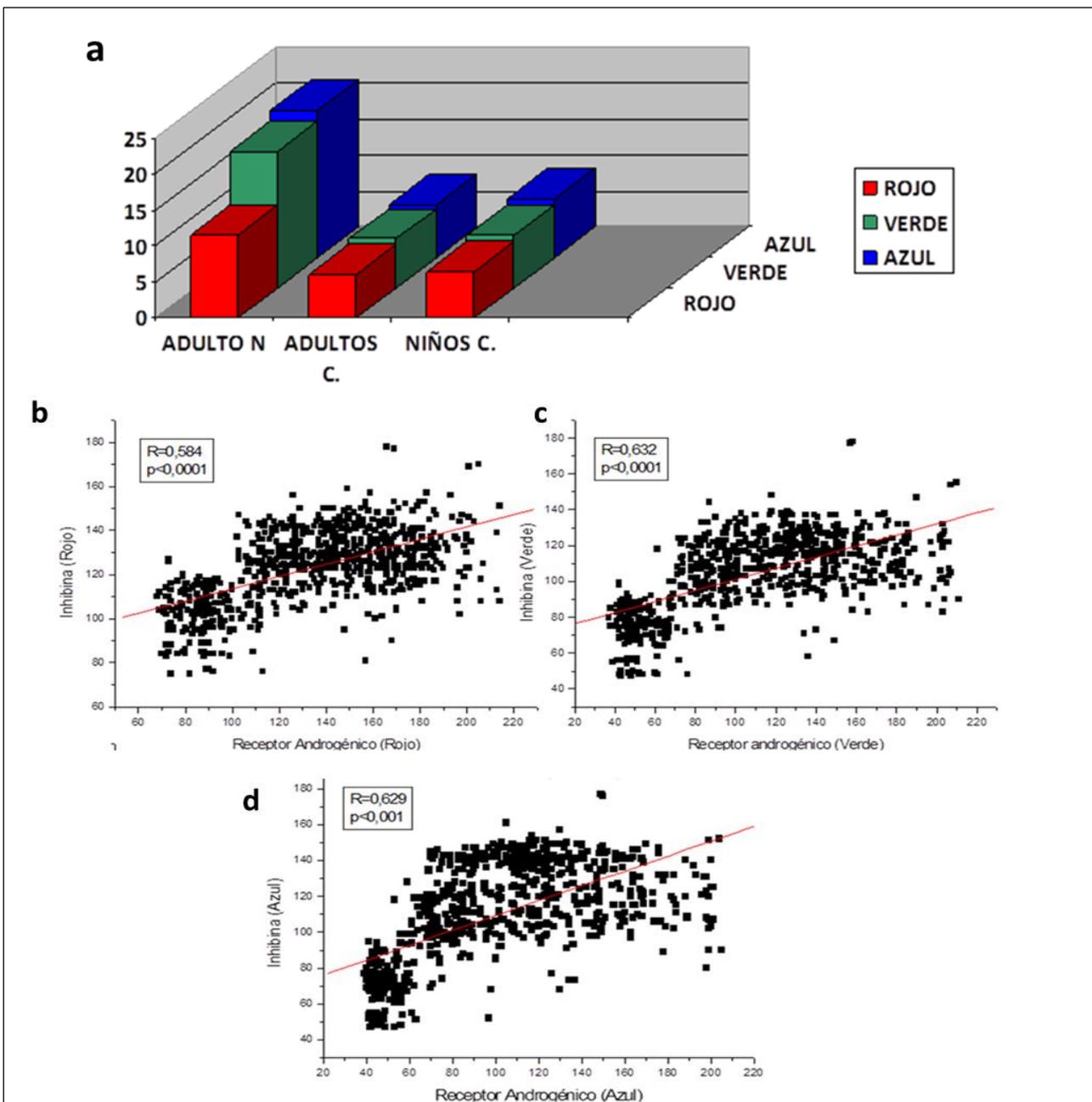


Figura 5. **5a.** Comparación microdensitométrica de inhibina B en células de Sertoli de adultos normales y adultos y niños con criptorquidia, expresados en registros RGB (rojo, verde y azul). Los valores numéricos contenidos en el gráfico son el resultado del valor inverso de la DOI (densidad óptica integrada) por 10-3. * $P < 0.0001$. **5b, c y d.** Relación entre inhibina B y el RA en células de Sertoli, en todos los individuos estudiados. En cada gráfico se muestra la recta de regresión obtenida, según la coloración.

su íntima relación funcional con el desarrollo de las células germinales; las células de Sertoli adultas inequívocamente expresan el RA. Curiosamente, sin embargo, la expresión del RA en las células de Sertoli comienza de forma muy tardía (3-5 días después del parto en las crías de ratas y ratones. En el hombre

después de los 4 años de edad y con un aumento progresivo hasta los 8 años) (38). Esta podría ser la razón por qué no responden a la alta concentración de andrógenos intratesticular existente en la vida fetal y en los primeros años de vida después del parto (39), además de explicar en parte baja expresión de RA a

esa edad. Sin embargo, una vez que la espermatogénesis se ha iniciado, se observan cambios cíclicos en la expresión del RA, tanto en roedores como en humanos, lo que sugiere que la maduración de las células germinales y su respuesta a la acción de los andrógenos está regulada por la concentración del RA en las células de Sertoli (28,37).

El estudio de inhibina B en los hombres normales y en los pacientes andrológicos ha sido un área de activa investigación durante la última década, tras la descripción por varios grupos de investigadores de una relación inversa entre la FSH y la inhibina B (40-42). Esta hormona glicoprotéica se sintetiza fundamentalmente en las células de Sertoli testiculares, con una discreta producción en las células de Leydig. La inhibina B está estrechamente ligada a la función reproductiva y la síntesis de espermatozoides. Hay pruebas sólidas de que la inhibina B puede ser más precisa que la FSH en la predicción de la presencia de espermatozoides en los pacientes con azoospermia no obstructiva (43), y el uso de inhibina B con FSH puede ser el mejor test predictivo para encontrar espermatozoides testiculares, mediante su extracción por aspiración en las pequeñas muestras de tejido testicular obtenido por biopsia, con fines terapéuticos en métodos de reproducción asistida. Los niveles de inhibina B reflejan la función de las células de Sertoli (22,26,43-45).

En el presente estudio, y en relación con los estadios madurativos de la espermatogénesis del varón normal, se ha visto una evidente expresión de inhibina B en el interior del citoplasma de las células de Sertoli en todos los estadios madurativos, si bien existe una ligera variabilidad de intensidad de inmunotinción cuando hemos realizado la cuantificación de la intensidad del marcaje. Ello no debe sorprendernos, ya que existe una íntima regulación paracrina entre los estadios madurativos y funcionales de las células de Sertoli y cada uno de los estadios madurativos de la espermatogénesis de las áreas adyacentes.

El inmunomarcaje con el anticuerpo anti-inhibina B permite visualizar muy bien los perfiles del citoplasma de las células de Sertoli con una intensa coloración marrón, propia del revelado con diaminobencidina del sustrato de la reacción inmunoenzimática de la peroxidasa; de este modo, se aprecia que la superficie de las carillas laterales de las células de Sertoli se adaptan íntimamente a las células espermatogénicas. En los estadios en los que se alcanza una diferenciación de espermátidas elongadas maduras, la inmunoexpresión de inhibina B es mayor que en aquellas asociaciones en las que sólo se ve

diferenciación hasta el estadio de espermátida redonda inmadura. Estos datos sugieren que la maduración completa de la espermatogénesis, incluida la espermiogénesis, viene determinada por una robusta expresión de inhibina B. Y contrariamente, las áreas de los tubos seminíferos sin completar la meiosis se asocian a células de Sertoli con menor inmunomarcaje de inhibina B. Estos datos morfológicos, en parte, se relacionan con los datos bioquímicos de detección de inhibina B en suero, puesto que se ha descrito una relación directa entre las concentraciones de inhibina B en suero y la concentración espermática (46). concluyendo que la inhibina B es un marcador de la función testicular y específicamente de la función de las células de Sertoli; también la determinación de los niveles séricos de inhibina B tiene valor cuando se correlaciona con el grado de espermatogénesis en hombres con azoospermia (40,42).

En el presente estudio se encontró una correlación entre la disminución de la expresión de la inhibina B en las células de Sertoli, situadas adyacente a las áreas de los tubos seminíferos que tenían una hipoespermatogénesis severa, con el grado de atrofia del epitelio germinal. Además, estas células de Sertoli, si bien se inmunomarcaban con el anticuerpo anti-RA, la intensidad de la tinción era muy débil; incluso en las áreas de ausencia completa de línea germinal, las células de Sertoli tenían mínima expresión (solo trazas de marcaje) del RA y de inhibina B. Todos estos datos nos permiten sugerir que en los pacientes jóvenes con oligozoospermia e hipoespermatogénesis severa existe una alteración profunda de la regulación paracrina de las células de Sertoli.

La criptorquidia es la causa congénita más frecuente de alteración primaria del testículo infantil (17). En la vida adulta, estos hombres con historia de mal descenso testicular uni o bilateral tienen pobre calidad del semen con un recuento bajo de espermatozoides y fertilidad alterada, asociada en ocasiones a cáncer de testículo (17,31,47,48). Con el fin de definir y unificar estos procesos clínicos y patológicos testiculares, desde hace dos décadas se ha propuesto la definición de un completo cuadro denominado Síndrome del testículo disgenético. Esta disgenesia testicular no tiene una causa única y conocida, antes bien, se ha especulado que puede ser debida, entre otras, a factores ambientales y hormonales que actuarían en la vida fetal (9,10,13). Los pacientes con disgenesia testicular cada vez son más susceptibles de entrar en programas de reproducción asistida, aunque los resultados obtenidos dependen muy directamente del grado de lesión

testicular (13). Con todo, está completamente establecido que el tratamiento del testículo anormalmente descendido –presentado como malformación única o bien asociado y formando parte del síndrome de disgenesia testicular- debe ser, en primer lugar, una orquidopexia quirúrgica y en segundo lugar la aplicación de tratamientos hormonales adecuados. La corrección de la criptorquidia no garantiza la recuperación total de la fertilidad, ya que existen daños celulares importantes que no siempre dependen del tiempo de evolución de la criptorquidia.

En la presente investigación se encontraron cambios de inmunomarcaje que experimenta la inhibina B en los testículos criptorquídicos extirpados en adolescentes, los cuales presumiblemente están en consonancia con las lesiones tubulares ya descritas en estudios previos de testículos criptorquídicos. En efecto, en el hombre, el estudio de los testículos mal descendidos muestra que la mayoría de túbulos seminíferos que han experimentado crecimiento postpuberal presentan una variable expresión de inhibina B, pero además presentan un moderado y a veces intenso marcaje del RA (30). Contrariamente, los túbulos con células de Sertoli inmaduras o disgenéticas solo se marcaban tenuemente con el anticuerpo anti-inhibina B y además, en estos casos la expresión del RA estaba significativamente disminuida. Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que existe una correlación directa entre la disminución de la expresión de RA y de la inhibina B en las células de Sertoli, lo cual se relaciona con la gravedad de las

lesiones disgenéticas del testículo criptorquídico (30).

Estos cambios inmunohistoquímicos del RA y de la inhibina B en las células de Sertoli disgenéticas no son hallazgos aislados; antes bien, está demostrado que en la patología congénita testicular, incluida la criptorquidia, las células de Sertoli también 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, positivos inmunohistoquímicamente para la alfa-1 antitripsina y el CD68. Estos cambios cuando son muy manifiestos, provocan un aspecto histológico granular del citoplasma de las células de Sertoli- denominado células de Sertoli granulares-. Los cambios granulares se producen por una acumulación anormal de gran cantidad de lisosomas secundarios; además, estas células presentan alteraciones del citoesqueleto con disminución de filamentos de vimentina y no muestran inmunoreactividad con anticuerpos anti-inhibina B, lo que sugiere que estas células de Sertoli granulares presentan importantes alteraciones funcionales. Por ello, es posible especular que estas lesiones presentes en algunos testículos criptorquídicos 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 (49).

En conclusión la criptorquidia, la disminución de la expresión de Inhibina B y del RA de las células de Sertoli y de Leydig en comparación con el testículo normal, se relaciona con atrofia tubular y lesiones disgenéticas de los tubos seminíferos frecuentemente observadas en estos pacientes con hipoespermatogénesis, derivando en oligozoospermia y azoospermia, lo que se traduce clínicamente infertilidad de grado variable.

Referencias

1. Longquan R, Mohamed S, Mariko O, Chunmei Li, Gen W, Kazuyoshi T. Effects of experimental cryptorchidism on sperm motility and testicular endocrinology in adult male rats. *J. Reprod Dev* 2006, 52: 219- 28. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
2. Hutson JM, Southwell BR, Li R, Lie G, Ismail K, Harisis G, Chen N. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism. *Endocr Rev.* 2013;34:725-52. [\[PubMed\]](#)
3. Hughes IA, Acerini CL. Factors controlling testis descent. *Eur J Endocrinol* 2008;159 Suppl 1: S75-82. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
4. Simoni M, Tüttelmann F, Michel C, Böckenfeld Y, Nieschlag E, Gromoll J. Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with maldescended testes and male infertility. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:193-200. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
5. Kolon T, Herndon A, Baker L, Baskin L, Baxter C, Cheng E, Diaz M, Lee P, Seashore C, Tasian G and Barthold J. Evaluation and Treatment of Cryptorchidism: AUA Guideline *J Urol* 2014; Vol. 192, 337-345 [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
6. Gómez-Pérez R. Criptorquidia importancia del diagnóstico y tratamiento precoz. Revisión. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2004; 2: 14-7. [\[Google Scholar\]](#)
7. Abacı A, Çatlı G, Anık A, Böber E. Epidemiology, Classification and Management of Undescended Testes: Does Medication Have Value in its Treatment? *J Clin Res Pediatr Endocrinol*

- 2013;5(2):65-72. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
8. Ferlin A, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C. Hormonal and genetic control of testicular descent. *Reprod Biomed Online* 2007;15:659-665. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 9. Asklund C, Jørgensen N, Jensen T and Skakkebaek N. Biology and epidemiology of testicular dysgenesis syndrome. *BJU Int* 2004; 93, sup 3:6 – 11. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 10. Dalgaard M, Weinhold N, Edsgaard D, Silver J, Pers T, Nielsen J, Jørgensen N, Juul A, Gerds T, Giwercman A, Giwercman Y, Cohn-Cedermark G, Virtanen H, Toppari J, Daugaard G, Jensen T, Brunak S, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek N, Leffers H, Gupta R. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J Med Genet* 2012;49:58-65. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 11. Gómez-Pérez R, Osuna JA, Arata-Bellabarba G. Surgical vs. untreated cryptorchidism: effects on fertility. *Arch Androl* 2004;50:19-22. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 12. Chirinos J, Gómez R, Osuna J, Arata-Bellabarba G. Frecuencia de criptorquidia y factores asociados en recién nacidos. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2009; 7 (3): 10-15. [\[Google Scholar\]](#)
 13. Hutchison GR, Scott HM, Walker M, McKinnell C, Ferrara D, Mahood IK, Sharpe RM. Sertoli cell development and function in an animal model of testicular dysgenesis syndrome. *Biol Reprod* 2008; 78:352-360. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 14. Guitton N, Touzalin AM, Sharpe RM, Cheng CY, Pinon-Lataillade G, Méritte H, Chenal C, Jégou B. Regulatory influence of germ cells on Sertoli cell function in the pre-pubertal rat after acute irradiation of the testis. *Intern J Androl* 2000;23:332-339. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 15. Nistal M, Paniagua R, Diez-Pardo JA. Histologic classification of undescended testes. *Hum Pathol* 1980;11:666-674. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 16. Nistal M, González-Peramato P, and Serrano A. *Helpful Data for Evaluating an Undescended Testis in Childhood in Clues in the Diagnosis of Non-tumoral Testicular Pathology*. Springer International Publishing AG 2017: 83-92. [\[Google Scholar\]](#)
 17. Nistal M, Paniagua R. Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG and Cheng L (eds.). *Urologic Surgical Pathology*. Chap 12. Mosby Elsevier Inc. St Louis, 2008:615-755.
 18. Cheng CY, Mruk DD. A local auto-crine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6:380-395. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 19. Kopera IA, Bilinska B, Cheng CY, Mruk DD. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:1593-1605. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 20. Pointis G, Gilleron J, Carette D, Segretain D. Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:1607-1620. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 21. Asatiani K, Gromoll J, Eckardstein SV, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M. Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. *Andrologia* 2002;34:172-176. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 22. O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Abel MH. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction* 2010;139:177-184. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 23. Archambeault DR, Yao HH. Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:10526-10531. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 24. Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fábregues F, De Osaba MJ, Ascaso C, Vanrell JA. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000;15:1734-1738. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 25. Bhasin S, Krummen LA, Swerdloff RS, Morelos BS, Kim WH, diZerega GS, Ling N, Esch F, Shimasaki S, Toppari J. Stage dependent expression of inhibin alpha and beta-B subunits during the cycle of the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1989;124:987-991. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 26. Myers GM, Lambert-Messerlian GM, Sigman M. Inhibin B reference data for fertile and infertile men in Northeast America. *Fertil Steril* 2009;92:1920-1923. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 27. Zhou X. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *J Androl* 2010. 31(3):235-43. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 28. Suarez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J. Androgen Receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:350-358. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 29. Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C. Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17718-17723. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 30. Regadera J, Martínez-García F, González-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. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 31. Regadera J, Martínez-García F, Paniagua R, Nistal M. Androgen insensitivity syndrome: An immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:225-234. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 32. Wang G, Weng CC, Shao SH, Zhou W, De Gendt K, Braun RE, Verhoeven G, Meistrich ML. Androgen receptor in Sertoli cells is not required for testosterone-induced suppression of spermatogenesis, but contributes to Sertoli cell organization in Utp14bjsd mice. *J Androl* 2009;30:338-348. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 33. Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A, Menegazzo M, De Toni L, Carraro M, Veronese C, Foresta C. Androgen receptor is expressed in both X- and Y-carrier human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;91:193-200. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 34. Albrecht M, Rämisch R, Köhn FM, Schwarzer JU, Mayerhofer A. Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1956-1960. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 35. Cowan G, Childs AJ, Anderson RA, Saunders PT. Establishment of long-term monolayer cultures of somatic cells from human fetal testes and expansion of peritubular myoid cells in the presence of androgen. *Reproduction* 2010;139:749-757. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 36. Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB. Androgen action

- via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J* 2009;23:4218-4230. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
37. Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:1537-1556. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
38. Chemes HE, Rey RA, Nistal M, Regadera J, Musse M, González-Peramato P, Serrano A. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4408-4412. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
39. 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. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
40. Goulis DG, Polychronou P, Mikos T, Grimbizis G, Gerou S, Pavlidou V, Papanikolaou A, Tarlatzis BC, Bontis IN, Papadimas I. Serum inhibin-B and follicle stimulating hormone as predictors of the presence of sperm in testicular fine needle aspirate in men with azoospermia. *Hormones (Athens)* 2008;7:140-147. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
41. Tsigkou A, Luisi S, Reis FM, Petraglia F. Inhibins as diagnostic markers in human reproduction. *Adv Clin Chem* 2008;45:1-29. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
42. Tunc L, Kirac M, Gurocak S, Yucel A, Kupeli B, Alkibay T, Bozkirli I. Can serum inhibin B and FSH levels, testicular histology and volume predict the outcome of testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia? *Int Urol Nephrol* 2006;38:629-635. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
43. Nagata Y, Fujita K, Banzai J, Kojima Y, Kasima K, Suzuki M, Tanaka K. Seminal plasma inhibin-B level is a useful predictor of the success of conventional testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia. *J Obstet Gynaecol Res* 2005;31:384-388. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
44. Adamopoulos DA, Koukhou EG. Value of FSH and inhibin-B measurements in the diagnosis of azoospermia a clinician's overview. *Int J Androl.* 2010;33:e109-113. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
45. Andersson AM, Skakkebaek NE. Serum inhibin B levels during male childhood and puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2001;180: 103-107. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
46. Tsigkou A, Luisi S, Reis FM, Petraglia F. Inhibins as diagnostic markers in human reproduction. *Adv Clin Chem* 2008;45:1-29. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
47. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Couti-faris C, Carson SA, Cisneros P, Stein-kampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL; National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-1393. [\[PubMed\]](#)
48. Józsa T, Dienes B, Telek A, Hargitai Z, Pór A, Kiss C. Differential expression of androgen and estrogen receptor of appendix testis in patients with descended and undescended testes. *Int J Urol* 2008;15:171-174. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
49. 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. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Como citar este artículo: Gómez-Pérez R, Montañez C, González-Peramato MP, Osuna JA, Regadera J, Baldonado R, Nistal M. Inhibina B y receptor de andrógenos en testículos criptorquídicos pre y post-puberales. *Avan Biomed* 2019; 8: 1-11.



Avances en Biomedicina se distribuye bajo la Licencia Creative Commons Atribución -No Comercial -Compartir Igual 3.0 Venezuela, por lo que el envío y la publicación de artículos a la revista son completamente gratuitos.