

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**Alteraciones del Intersticio
Testicular y de la Pared Peritubular
en la Insuficiencia Hepática Crónica
y en la Criptorquidia Postpuberal.**

TESIS DOCTORAL

Rosa María Baldonado Costoya

Madrid, 2015

AGRADECIMIENTOS:

a la Profesora Dra. **Pilar González-Peramato**, por su amabilidad y su permanente asesoría en todos los aspectos científicos de este trabajo

al Prof. **Javier Regadera**, por sus enseñanzas científicas, su dedicación constante y su paciencia durante la elaboración de la presente Tesis Doctoral

al Prof. **Manuel Nistal**, por su magisterio al señalar el camino científico durante la realización de este estudio

a Dña. **Carmen Sánchez-Palomo**, por su oportuna ayuda en múltiples aspectos prácticos de histotecnología y a Dña. **Raquel Marcos**, por el procesamiento de las inmunotinciones

al Lic. **Juan Pedro Velasco-Martín**, por su inestimable ayuda en los aspectos informáticos de este trabajo

al Dr. **Luis Alberto Condezo**, por su excelente asesoría estadística

al Ing. **Antonio Baldonado Costoya** y a Lic. **Margarita Benavides Valls**, por su gran colaboración en el arte gráfico de este trabajo

al Dr. **Carlos de Gorospe Pérez-Jáuregui**, al Dr. **José Manuel Bádenas Sierra** y a la Dra. **Pilar Piñero Campos**, por su apoyo al proyecto y entusiasmo contagioso

al Dr. **Roald Gómez Pérez**, por haber iniciado todo el proceso de investigación en endocrinología andrológica, y por su amistad

a la Lic. **Lucila Pardo Ruiz**, por su asesoría técnica muy necesaria para la preparación de la tesis, y por su constante preocupación por el desarrollo del proyecto

DEDICATORIA:

a mi marido **Hector** y a mis hijas **Laura** y **Ana**, por todo su cariño y apoyo

a mi padre **Siro**, a mi madre **Laura** y a mi tía **Chelo**,
que son el ejemplo que siempre ha orientado mi vida

y a toda **mi familia**, que han colaborado de diversas formas durante
la realización de este proyecto

a **Carlos Schneider Weissman** y a **Luis Beltrán Cabrera** por ser mi inspiración
para seguir en contacto con la investigación, a pesar de los obstáculos,
y por ser mis amigos, más allá del tiempo y la distancia

INTRODUCCIÓN	1
ESTRUCTURA Y REGULACIÓN PARACRINA DEL TESTÍCULO	2
Células de Sertoli	4
Las células de Sertoli en la regulación paracrina testicular.....	5
Pared Peritubular.....	7
Intersticio Testicular	8
Células de Leydig	9
Fibroblastos CD34 +	11
Macrófagos.....	13
Células cebadas	15
Insuficiencia hepática crónica y patología testicular.....	17
Criptorquidia y síndrome de Disgenesia Testicular.....	21
Estrógenos y Disruptores endocrinos.....	23
Finalidades de la presente Tesis Doctoral	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	30
MATERIAL	31
MÉTODOS	31
Métodos de Estudio Histológico General	31
Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas	32
Método Inmunohistoquímico Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa.....	33
Métodos de Cuantificación del intersticio testicular y de la pared peritubular	35
<i>Software</i>	36
<i>Colour deconvolution</i>	37
Segmentación	37
Cuantificación	38
Métodos Estadísticos.....	38
Manejo de Datos	38
Técnicas Fotográficas.....	38

RESULTADOS	39
Características clínicas y estudio histológico del parénquima testicular	40
Diámetro tubular en los diferentes grupos de estudio	44
Estudio histológico con inmunotinciones.....	45
Evaluación de inmunotinción CD34+.....	76
Cuantificación de macrófagos CD68 +.....	77
Cuantificación de células cebadas triptasa +.....	78
DISCUSIÓN	80
CONCLUSIONES	95
RESUMEN	98
ABSTRACT	99
REFERENCIAS	101

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA Y REGULACIÓN PARACRINA DEL TESTÍCULO

El testículo humano está constituido por los tubos seminíferos y el intersticio testicular, el cual contiene abundantes vasos sanguíneos, vasos linfáticos y células de Leydig, así como macrófagos, células cebadas, tejido conjuntivo laxo y terminaciones nerviosas.¹⁷¹ En el testículo humano la espermatogénesis y la esteroidogénesis se desarrollan respectivamente en los tubos seminíferos y en el intersticio testicular intertubular. A pesar de que ambos compartimientos se encuentran anatómicamente separados, están estrechamente regulados entre sí. La función de los testículos, y de sus compartimientos está regulada por el hipotálamo y la hipófisis y estos efectos endocrinos están mediados y modulados a nivel testicular por mecanismos de control local: los factores paracrinos, que actúan entre células vecinas, principalmente por difusión, y autocrinos, factores que son liberados desde una célula y actúan en esa misma célula.²⁷⁰ Es evidente que los mecanismos endocrinos juegan un papel fundamental en la regulación de la función testicular, y factores producidos localmente son importantes para la modulación de la actividad hormonal.

Algunos factores testiculares podrían ser mediadores de la acción hormonal y de la comunicación intra e intercelular (**Figs 1 y 2**).

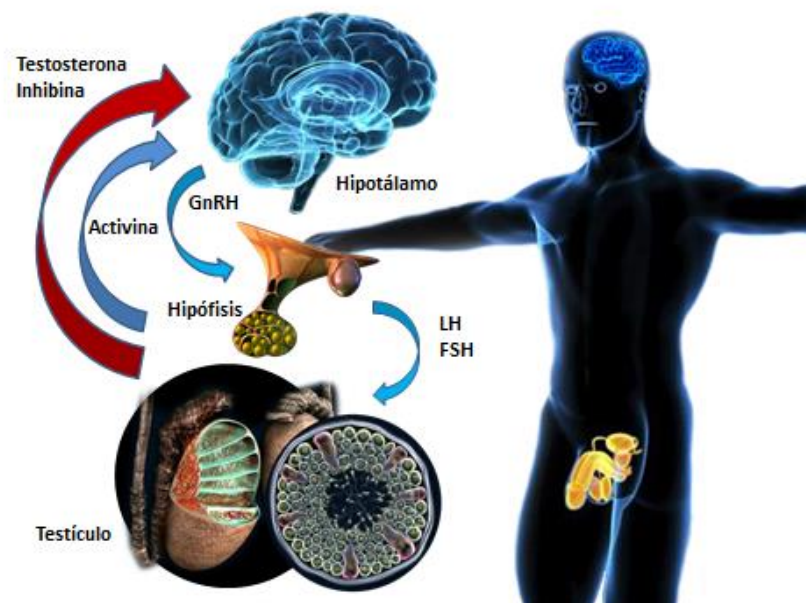


Fig. 1. Regulación endocrina: eje hipotálamo-hipófiso-testicular.

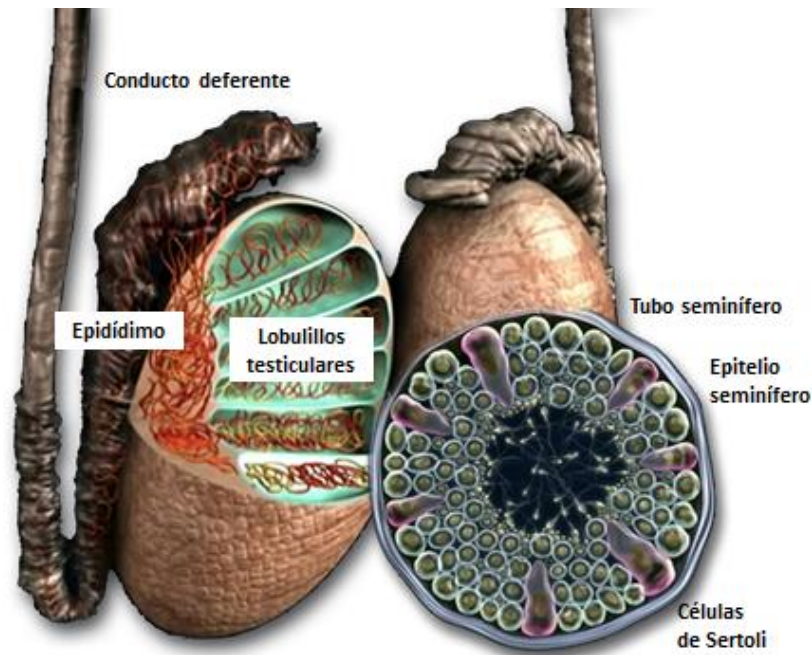


Fig. 2. Estructura testicular, y corte transversal de un tubo seminífero.

Se han estudiado una gran variedad de factores con potencial paracrino testicular: factores de crecimiento, factores de células madre, factores inmunológicos, opioides, oxitocina, vasopresina, sustancia modificadora de células peritubulares, renina, angiotensina, hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH), corticotropina (ACTH), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), calmodulina, ceruloplasmina, proteínas transportadoras, glicoproteínas, activador de plasminógeno, metaloproteasas, dinorfina, etc.²⁶⁹ Generalmente, el factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) ejercen una acción estimulante en el testículo, mientras que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) actúa como inhibidor. En la rata, el desarrollo de las células de Leydig se mantiene por una interrelación entre TGF- α y TGF- β , y la actividad de la hormona luteinizante (LH) es modulada por IGF-I. Este factor influye directamente en la espermatogénesis. En el hombre, el IGF-I muestra la mayor expresión en los espermatoцитos y estimula la síntesis de DNA en las células germinales en mitosis. La administración de IGF-I a pacientes, mostró un aumento del tamaño del testículo, así como un incremento en la secreción de gonadotropina y testosterona.¹³⁴

CÉLULAS DE SERTOLI

El tubo seminífero se encuentra dividido en dos compartimientos:

1. Compartimiento basal: entre la lámina basal y las uniones Sertoli-Sertoli. Contiene espermatogonias y los espermátocitos de primer orden recién formados.
2. Compartimiento adluminal: por encima de las uniones Sertoli-Sertoli. Se encuentran allí los espermátocitos de primero y segundo orden y espermátidas.

En el interior de los tubos seminíferos, la espermatogénesis está regulada por factores que secretan las células de Sertoli, las cuales también tienen mecanismos de regulación paracrinos con las células de Leydig, los macrófagos intersticiales y las células mides peritubulares. Las células de Sertoli son las células diana para la hormona folículo estimulante (FSH)²²⁹ y los andrógenos.²⁴⁰ Las células de Sertoli son células cilíndricas que se apoyan en la lámina basal y alcanzan la luz tubular y en el adulto muestran un núcleo de contorno triangular y con nucléolo evidente. Una sección tubular transversal contiene de 10 a 12 células.²¹⁹ El citoplasma emite una gran cantidad de prolongaciones laterales que rodean a las células germinales próximas, a través de las cuales contacta con otras células de Sertoli vecinas, estableciéndose un tipo de unión característica denominada especialización ectoplásmica, única y específica del testículo. Consiste en uniones Sertoli-Sertoli (uniones adherentes, uniones estrechas y nexos) y uniones entre las células de Sertoli y las células germinales (mediadas por N-cadherina).⁷ En el testículo se han identificado tres clases de proteínas de membrana: ocludina, claudinas y moléculas de uniones adherentes.^{41,143} Además, entre la membrana plasmática de las células de Sertoli y las cisternas de retículo endoplásmico se encuentran otras moléculas, incluidas moléculas de anclaje de los filamentos de actina, vinculina, zónula ocluyente 1, 2 (ZO-1, ZO-2), placoglobina, radixina y nectinas.²⁶⁷ Las uniones estrechas constituyen la base morfológica de la barrera hematotesticular, proporcionando el ambiente necesario para la espermatogénesis. Se ha comenzado a estudiar la influencia de dicho control en la adhesión celular, pero todavía es necesario avanzar más en la investigación para comprender la regulación transcripcional de la función de la adhesión celular en los testículos en particular en la barrera hematotesticular durante la espermatogénesis.¹⁴² Se ha postulado que la matriz extracelular regula la función

de barrera hematotesticular y de modo particular, regula también las uniones estrechas que se establecen entre las células de Sertoli y los espermatoцитos y las espermátides.^{41,120} La estructura de la barrera hematotesticular y de la membrana basal testicular están relacionadas directamente con las uniones intercelulares en el epitelio testicular.²³⁰

La función de adherencia celular que permite la unión de las células germinales a las células de Sertoli en el epitelio seminífero, viene dada por las unidades de adhesión de células de Sertoli con la matriz extracelular.^{3,230} Estas unidades constan de tres entidades separadas: 1) Receptores de adhesión transmembrana, que se unen con componentes de la matriz extracelular o con receptores externos de otras células; ellos también determinan la especificidad de las interacciones entre las células, y entre ellas y la matriz, lo que incluye las integrinas, cadherinas y nectinas.^{45,264} 2) Proteínas de la membrana extracelular, que son largas glicoproteínas que interactúan con múltiples receptores de superficie celular. 3) Proteínas periféricas intracelulares, que ponen en contacto los receptores de adhesión a la actina subyacente, y que corresponden a filamentos intermedios o microtúbulos del citoesqueleto.^{89,120,230}

Las células de Sertoli en la Regulación Paracrina Testicular

En la regulación funcional de la espermatogénesis es fundamental, de una parte la integridad de la barrera hematotesticular, formada por las uniones Sertoli-Sertoli, y de otra, la integración de factores paracrinicos establecidos entre las células de Sertoli, las células de Leydig, y los macrófagos y otras células miodes y componentes de la matriz extracelular del intersticio testicular, sin olvidar también la participación de mecanismos de regulación autocrina que ocurren en cada una de las células testiculares.⁴³

Las células de Sertoli están bajo el control paracrino de las células germinales, presentando variaciones en los requerimientos de sustancias metabólicas dependiendo de la fase del ciclo espermatoгéxico.⁷² Se ha demostrado, por inmunohistoquímica, la presencia de receptores para los andrógenos en el núcleo, y su expresión varía con los estadios de la espermatogénesis en el testículo humano.²⁴⁰ Además, presentan en el citoplasma abundantes filamentos de vimentina, F-actina y α -tubulina. La F-actina participa en la

formación de las uniones Sertoli-Sertoli y su distribución también varía con el ciclo del epitelio seminífero.^{159,235} Se ha demostrado una correlación positiva entre el número total de células de Sertoli y la producción diaria de espermatozoides.¹¹⁴ Las células de Sertoli disminuyen en número con la edad, y se estima que después de los 50 años sólo queda la mitad.¹⁸⁹

Las inhibinas y activinas son moléculas secretadas por las células de Sertoli y estas moléculas, asimismo, están reguladas por FSH y participan en la secreción de esta hormona. Ambos grupos de moléculas (inhibinas y activinas) pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). Las inhibinas consisten en un heterodímero con una misma subunidad alfa unida a una subunidad β A o β B, para formar inhibina A o inhibina B, respectivamente. En cambio, las activinas son homodímeros (β A β A o β B β B). Generalmente, las activinas se consideran factores estimulantes de la proliferación de espermatogonias, mientras que las inhibinas ejercen una función inhibitoria. La concentración sérica de inhibina se correlaciona con la actividad espermatogénica, con el tamaño testicular y con la producción de esperma y puede ser utilizado como un indicador endocrino de defectos espermatogénicos.^{26,148} Las activinas inhiben o estimulan la esteroidogénesis en las células de Leydig en distintas especies.²⁴ En el hombre, la inhibina, secretada por las células de Sertoli en los túbulos seminíferos, llega a los conductos eferentes, donde es reabsorbida en el torrente sanguíneo.¹⁶⁷ De otra parte, los niveles de bioactividad de la activina participan también en el control de la espermatogénesis y en el control de las diferentes etapas de desarrollo testicular^{14,55} y el inicio de la espermatogénesis.¹⁵ La inhibina B es probablemente el principal regulador de retroalimentación de la secreción de FSH en el hombre^{97,123} y participa en la regulación paracrina testicular.⁵⁸ Además, la inhibición de la secreción de FSH por los esteroides sexuales es más evidente cuando los niveles en suero de inhibina B están muy por debajo del rango normal.²⁶ Existen datos que han demostrado que las células germinales tienen el potencial de regular su propia maduración a través de la producción endógena de activina A y folistatina.¹⁵⁰ En biopsias testiculares de pacientes con subfertilidad se han encontrado células de Sertoli inmaduras y disgenéticas con cambios de la inmunexpresión de inhibina, lo cual es muy evidente en los casos con criptorquidia, o con tumores testiculares.¹⁷⁶

PARED PERITUBULAR

La túnica propia que rodea cada túbulo seminífero está compuesta por células y por matriz extracelular. Las células mioides peritubulares son fundamentales en el mantenimiento de la estructura y función de los tubos seminíferos, pero en la pared peritubular también se identifican otros elementos celulares del tejido conjuntivo, incluidos los fibroblastos, los macrófagos y las células cebadas.

Las células mioides peritubulares son miofibroblastos, que representan el principal componente celular de la pared de los tubos seminíferos.²¹⁸ En los miofibroblastos peritubulares, el análisis de expresión génica y los análisis inmunohistoquímicos de proteínas que son codificadas por estos genes revelan una expresión predominante de genes de la matriz extracelular y de genes que codifican los componentes de la membrana basal. Estos miofibroblastos tienen receptores para histamina y triptasa que son los productos más activos secretados por las células cebadas presentes en el intersticio testicular.⁴ En las células mioides peritubulares se ha identificado la proteína vinculina, que participa en mecanismo de adhesión celular, la cual también está presente en las células musculares lisas de los pequeños vasos sanguíneos del intersticio testicular.^{160,197} La vinculina regula los complejos cadherina/catenina y su unión al citoesqueleto de actina.²⁰⁰ A diferencia de la vinculina, α -catenina se restringe a las uniones adherentes de célula-célula, pero no las uniones focales adherentes entre célula y matriz extracelular.^{196,200}

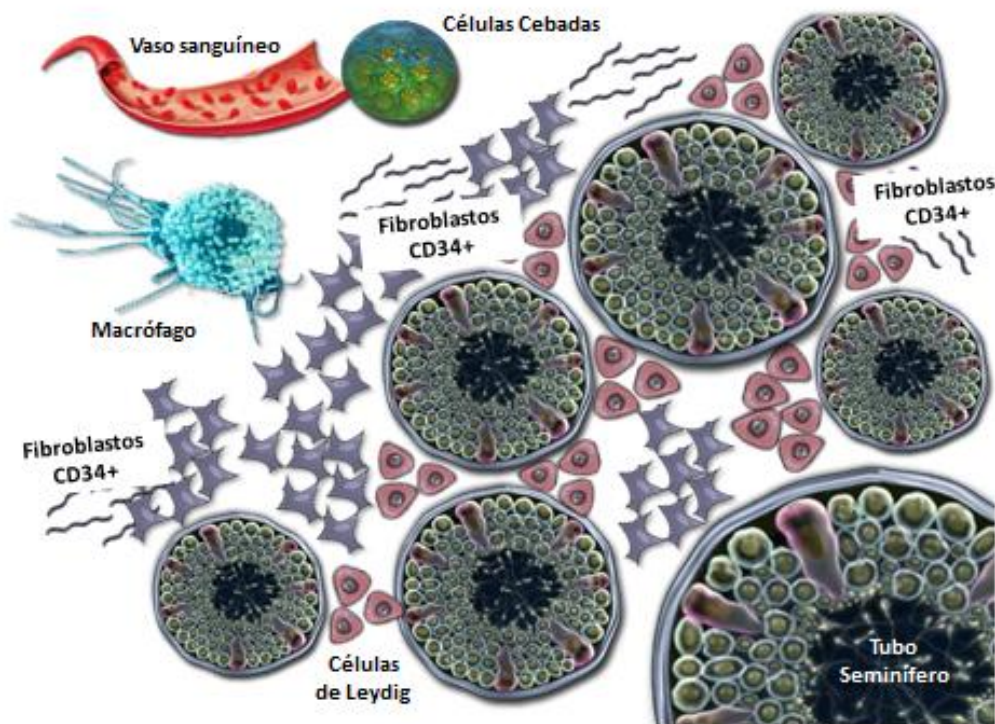
El colágeno tipo IV²⁰² y la laminina son los constituyentes más abundantes de la membrana basal testicular.^{3,56,244,245} El colágeno IV no solo es una proteína estructural, sino también es una proteína de señalización testicular, participando en la transducción de señales a través de los receptores transmembrana, como las integrinas.^{3,186,239} En la matriz extracelular también se ha identificado el colágeno tipo I.^{186,199}

INTERSTICIO TESTICULAR

El intersticio testicular, además de contener a las células de Leydig, está formado por tejido conectivo laxo en el que se identifican fibroblastos, macrófagos y células cebadas, así como fibras de colágeno y moléculas de la matriz extracelular. **(Fig.3).**

Los componentes celulares y extracelulares del intersticio testicular son cualitativamente similares en los diferentes mamíferos, a pesar de que su composición cuantitativa es específica para cada especie.^{56,66,220} En el testículo también se han descrito proteínas de la matriz extracelular, incluidas el colágeno, la laminina, la fibronectina, la vitronectina y el fibrinógeno. El colágeno tipo IV,^{3,61,208,231} laminina,^{3,61,128,208} heparán-sulfato-proteoglicanos,^{3,61,141} y entactina,^{61,139} están íntimamente asociados con la barrera hematotesticular.

Los vasos sanguíneos del tejido intersticial están formados por arterias de pequeño calibre, arteriolas, capilares y vénulas, las cuales drenan a las pequeñas venas intertubulares. Los capilares intertubulares e intersticiales no están fenestrados.²⁰⁷ Los vasos linfáticos del intersticio testicular son también muy abundantes y en los roedores forman grandes sinusoides, en contraste con el testículo humano, en el que estos vasos existen solo en los



principales septos de tejido conectivo que se extienden desde la túnica albugínea.²²⁰

Fig. 3. Componentes celulares y extracelulares del intersticio testicular, y tubos seminíferos.

Células de Leydig

El componente celular más importante del intersticio testicular está constituido por las células de Leydig. Fueron descritas por primera vez por Franz von Leydig en 1850.¹³⁷ Estas células se encuentran en pequeños grupos o también aisladas, generalmente alrededor de los capilares. Ocasionalmente, se pueden disponer adosadas a la pared peritubular.¹⁷¹ Las células de Leydig ocupan solo del 10 al 20% del tejido intersticial de los mamíferos, incluyendo a los humanos.^{56,66}

Las células de Leydig se pueden originar, tal como se ha sugerido en estudios experimentales en ratas, tanto a partir de células peritubulares, como de células musculares lisas y pericitos.⁵⁴ Se ha establecido una relación entre los pericitos y las células de músculo liso vascular y el origen de las células de Leydig, aunque ha sido difícil poder probarlo, ya que estos grupos celulares no expresan factores esteroideogénicos y enzimas características de las células de Leydig; pero el descubrimiento del modo de transición de esas células de las paredes vasculares hasta convertirse en células de Leydig, en particular el proceso de transdiferenciación, fue crucial para establecer a los pericitos y las células musculares lisas como los precursores de las células de Leydig.^{53,54}

Las células de Leydig sintetizan y secretan andrógenos, especialmente testosterona, esencial para la espermatogénesis.⁶⁶ La secreción de testosterona por las células de Leydig está bajo el control directo de la hormona luteinizante (LH).^{33,34,40,42,65,80,91,187,195,237,253} Las células de Leydig son las responsables de la virilización del varón, mediante la acción directa de la secreción de testosterona libre y conjugada, cuyos niveles se encuentran altos en el varón normal.^{56,66}

Las células de Leydig poseen un gran desarrollo de las organelas involucradas en la síntesis de hormonas esteroideas, como el retículo endoplásmico liso, mitocondrias pleomórficas de crestas tubulares y matriz clara, abundantes lisosomas y peroxisomas, organelas implicadas en la síntesis y regulación intracelular de la esteroideogénesis. Las células muestran importantes cambios morfológicos en relación con los seis estadios del ciclo del epitelio seminífero.¹⁹¹ La capacidad funcional de las células de Leydig se puede explorar con técnicas específicas de 3-beta-hidroxiesteroidehidrogenasa (3β -HSD),^{41,165} y más

recientemente con anticuerpos anti-testosterona conjugada.²⁰⁵ Pero además, las células de Leydig muestran inmunorreactividad específica para receptores de LH, 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), inhibina, calretinina,²³⁸ y ghrelina.¹⁷ También contienen un gran número de sustancias que sugieren una función neuroendocrina: oxitocina, propiomelanocortina, sustancia P, endorfina, moléculas de adhesión neurales (N-CAM) y proteína asociada a microtúbulos (MAP-2). En las células de Leydig próximas a los vasos, se observa actividad inmunohistoquímica de sinaptofisina y cromogranina A y B.

La función de las células de Leydig depende del mantenimiento de un volumen relativamente constante de fluido en los espacios intersticiales.¹² Un volumen constante de líquido intersticial es esencial para la transferencia óptima de oxígeno y otros solutos desde los capilares a las células de Leydig, y para la difusión de factores paracrinos en el tejido intersticial testicular. Por otra parte, un volumen importante de fluido es necesario para realizar el intercambio de productos de desecho celular hacia los capilares y permite el paso de los productos secretorios de las células de Leydig al torrente sanguíneo, a través de las vénulas post-capilares.⁹⁰

Se sugiere que la calretinina puede desempeñar un papel en la producción de testosterona.²³⁸ En los testículos después de la pubertad, la calretinina se expresa en las células de Leydig, pero no en células germinales o en células de Sertoli de adultos normales ni en las células de la *rete testis*.³² Las células de Leydig expresan calretinina en todas las biopsias estudiadas de varones adultos y sirven como control interno de inmunorreactividad. En biopsias testiculares, realizadas para la recuperación de espermatozoides para técnicas de fertilización in vitro, en hombres azoospermicos, se identificó la expresión de calretinina en células de Sertoli anormales. Este patrón de expresión calretinina-selectivo en las células de Sertoli inmaduras sugiere una relación funcional entre la expresión de calretinina y el grado de diferenciación de las células de Sertoli.¹⁸ La calretinina es un interesante marcador de las células de Leydig normales y neoplásicas y puede ser de valor en el diagnóstico del tumor de células de Leydig pobremente diferenciado.¹¹

Fibroblastos CD34 +

El antígeno CD34 es una glicoproteína que se encuentra en las células hematopoyéticas inmaduras y en las células endoteliales. El antígeno CD34 ha sido descubierto como un marcador de células hematopoyéticas humanas. Es una molécula de 110 kDa, una glicoproteína de superficie transmembrana. El gen CD34 está localizado en el cromosoma 1 en la región 1q32. Se han detectado células neoplásicas CD34+ en varios tumores mesenquimales.²⁵²

En el intersticio testicular y en la pared peritubular del hombre adulto, se han identificado células de morfología dendrítica que corresponden a células estromales CD34+. Están presentes en la túnica albugínea y alrededor y entre los tubos seminíferos, formando una red que rodea a las células de Leydig. Aunque estas células han recibido múltiples denominaciones, Díaz-Flores *et al*, proponen unificar dicha terminología llamando a estas células CD34+SFCs (células estromales/ fibroblastos/ fibrocitos/ telocitos CD34+). En los cortes histológicos, las células CD34+SFCs (en adelante: células CD34+) se caracterizan por su pequeño soma celular y por presentar múltiples y finas extensiones citoplásmicas, que pueden ser bipolares o multipolares. Estas extensiones citoplásmicas se comunican con las de las células vecinas, y forman una red. Son células aplanadas y por ello no es fácil observarlas con el microscopio óptico.⁶⁰

Los fibroblastos o fibrocitos CD34+ son un subgrupo de fibroblastos localizados en el tejido conjuntivo de múltiples localizaciones anatómicas, tanto en el área perivascular como en el estroma, habiéndose descrito en mama, tiroides, glándulas submandibulares, colon, páncreas, meninges, amígdalas palatinas, y cuello uterino.^{19,20,21,51,163,192,252,273,274,275,276} Estas células CD34+ participan en el recambio de la matriz extracelular, produciendo colágeno tipo I, III y V, y fibronectina en el intersticio testicular, pero también contribuyen en la formación de la membrana basal y en la secreción de laminina y colágeno tipo IV. Por lo tanto, son células reguladoras del contenido de colágeno del tejido conjuntivo, y pueden responder a múltiples estímulos, como factores de crecimiento (por ejemplo: TGF- β 1, IGF, PDGF y otros) cambiando la producción de colágeno y de metaloproteinasas de la matriz. Además de expresar la glicoproteína CD34, las células CD34+ pueden expresar otros marcadores

inmunohistoquímicos, como vimentina, CD10, bcl2, CD117, CD99, desmina y citoqueratinas, dependiendo de su localización, actividad funcional y participación en procesos patológicos. Las células CD34+, además de considerarse células progenitoras de células mesenquimales, realizan otras múltiples funciones: inmunomodulación, soporte estructural de otras células, y propiedades fagocíticas.⁶⁰ Los estudios sobre células CD34+ en el estroma testicular humano son escasos y se ha relacionado las células estromales CD34+ y los miofibroblastos.^{21,87,130,265}

En torno a los tubos seminíferos, en la pared peritubular, se observan dos capas: los fibroblastos CD34+ en la capa externa, y los miofibroblastos en la capa interna.^{9,31,46,52,57,75,105,115,123,130,133,153,212,251,263} Los miofibroblastos y la red de células CD34+ se encuentran presentes en el estroma testicular durante el desarrollo fetal y neonatal.¹³⁰ Cuando se realiza una doble inmunotinción de testículos fetales, neonatales y adultos es posible identificar α -actina de músculo liso y CD34, lo cual ha permitido confirmar que los miofibroblastos y las células estromales CD34+ están presentes, respectivamente, en la capa interna y externa del tejido peritubular.¹³⁰ Usando una doble inmunotinción, se observó que las células peritubulares expresan tanto antígenos CD34 como antígenos de actina de músculo liso (SMA) de forma focalizada. Se sugiere que las células estromales CD34+ y los miofibroblastos pueden tener el mismo origen.¹³⁰ Recientemente se ha obtenido y purificado una nueva línea de células CD34 positivas, identificadas como JK1, derivadas del estroma testicular de ratón que facilitaron el cultivo a largo plazo de las células madre progenitoras espermatogónicas y células madre pluripotenciales,¹²⁴ lo cual abre nuevas expectativas de investigación del estroma intersticial testicular y de las células CD34+.

Por último, las células CD34+ de la capa externa de la pared peritubular se disponen en íntima vecindad de las células CD34+ del intersticio testicular, las cuales rodean a las células de Leydig; pero además, las prolongaciones citoplasmáticas finas de las células CD34+ están estrechamente conectadas a la membrana celular de los macrófagos del estroma. Todos estos datos permiten especular a favor del papel que pueden jugar las células CD34+ testiculares, al igual que se ha sugerido previamente para otros órganos, en la vigilancia inmunológica del intersticio testicular.^{130,274,275}

Macrófagos

Las células inmunocompetentes son relativamente escasas en el intersticio testicular, dado que el testículo normal es un órgano protegido frente a la respuesta inmunológica; no obstante, en el intersticio testicular se pueden identificar muy escasos linfocitos, siendo más abundantes los macrófagos, los cuales, además de su función fagocitaria en situaciones patológicas, en el testículo normal participan también en mecanismos de regulación paracrina testicular, disponiéndose en íntima vecindad de las células de Leydig.^{107,154} Se sabe que los andrógenos regulan la respuesta inmune testicular y participan en la inhibición de la expresión de citoquinas proinflamatorias, lo que facilita que el testículo tenga un ambiente inmunológicamente tolerante.⁷¹ En el testículo humano adulto normal se describe que hay un macrófago por cada 10-50 células de Leydig y representan cerca del 25% de todas las células del intersticio testicular. Se sabe que los macrófagos participan en la proliferación y diferenciación de las células de Leydig. Los macrófagos secretan sustancias estimulantes e inhibitoras de la esteroidogénesis. Las citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y prostaglandinas pueden inhibir la función de la célula de Leydig.^{93,222} Los macrófagos testiculares se pueden clasificar en dos categorías:

1) Macrófagos residentes, relacionados con la regulación funcional de las células de Leydig normales.

2) Macrófagos activados, presentes en pacientes con infertilidad u otras patologías testiculares, y que producen interleuquina 1 (IL-1) y 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y factor transformador de crecimiento α (TGF α), moléculas que juegan un papel muy importante en los procesos inflamatorios o tumorales, incluidos los que ocurren en el testículo.^{79,92}

Los macrófagos testiculares tienen disminuida la capacidad de excreción de algunas citoquinas como IL-1 β y TNF- α , comparados con los macrófagos de otros tejidos.⁹⁶ La expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α e Interferón γ (IFN- γ) por los macrófagos testiculares, sin embargo, demuestra la capacidad testicular para la respuesta inflamatoria.^{62,109} En pacientes infértiles con diferentes grados de alteración de la espermatogénesis, se ha visto un incremento del número de macrófagos.²⁶⁹ Estos macrófagos

tienen una mayor expresión de los genes de la IL-1 y el TNF- α , y además estas moléculas se han identificado inmunohistoquímicamente en el intersticio testicular, en la pared tubular, y en el lumen tubular. En el síndrome de sólo células de Sertoli y los síndromes de parada en la maduración de las células germinales, el número total de macrófagos se incrementó en más del doble, observándose en algunos casos la migración de los macrófagos intersticiales hacia el lumen tubular.⁷³

Células cebadas

En el intersticio testicular humano también se identifican células cebadas,¹⁸⁰ las cuales pudieran participar en diferentes procesos de la regulación paracrina testicular. Las células cebadas testiculares se localizan más frecuentemente alrededor de los vasos de los tabiques intersticiales y de la túnica vasculosa subalbugínea, pero también las células cebadas son muy abundantes en el parénquima intertubular, dispuestas alrededor de la microvasculatura y de las células de Leydig intersticiales y peritubulares. En el testículo humano normal, el número de células cebadas cambia con la edad, aumentan levemente en la primera infancia, disminuye durante la progresión del desarrollo infantil, y aumenta de nuevo en la pubertad, para disminuir en la senectud;¹⁷⁹ contrariamente, se ha descrito el aumento del número de células cebadas en hombres con problemas de infertilidad.^{8,223}

Las proteasas de las células cebadas quimasa y tripsina inducen la proliferación de fibroblastos *in vitro*, tanto en modelos animales como en células humanas.^{25,78,184,213} Las células cebadas pueden regular los mecanismos de fibrosis a través de la activación de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), que constituyen una familia de enzimas proteasas involucradas en el remodelado de la matriz extracelular durante el desarrollo normal y también en procesos de fibrosis tisular.^{234,266} Las principales MMPs son la MMP 2 y la MMP 9.^{4,125,210,242} Además, se sabe que las células cebadas se relacionan directamente con numerosos mecanismos de regulación del sistema inmunológico innato y adaptativo;^{81,236} por ejemplo, en el cerebro, las células cebadas pueden cambiar la permeabilidad vascular de la barrera hematoencefálica de linfocitos T activados, e incrementa el tráfico de células inflamatorias. Las células cebadas secretan tripsina (una proteasa de serina), la cual es un mitógeno para fibroblastos.^{5,78,149,184,213} La tripsina puede actuar en los receptores activados

por proteasas 2 (PAR2) y causar la proliferación de los fibroblastos, aumentando la síntesis de colágeno. La activación de PAR2 conduce a una mayor expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), una enzima clave en la biosíntesis de prostaglandina y en la proliferación celular.⁷⁴

El aumento del número de células cebadas activadas se correlaciona con la fibrosis en los testículos de hombres infértiles y, por ello, las células cebadas pueden participar en los mecanismos de fibrosis, engrosamiento e hialinización de la pared de los tubos seminíferos e incremento de la matriz extracelular. Por lo tanto, las células cebadas desempeñan un papel clave en la fibrosis peritubular y en la atrofia testicular.²⁶⁹ En la fibrosis peritubular, las células cebadas, junto con los macrófagos, son fuente de la secreción de TNF- α , molécula que es bien conocida como reguladora de procesos de fibrosis, tal como recientemente se ha demostrado en las células peritubulares del testículo humano.²¹⁸ Así mismo, en los pacientes con atrofia mixta testicular, ocurre aumento del número de células cebadas testiculares y cambios en su fenotipo, modificándose su capacidad de expresar la COX-2 y de sintetizar prostaglandinas.

En la actualidad, las células cebadas y las prostaglandinas se han convertido en moléculas protagonistas de mecanismos implicados en la disfunción espermatogénica.²⁷¹ En este sentido, se ha demostrado que los inhibidores de células cebadas, evitando su activación y degranulación, son beneficiosos en el tratamiento de la oligozoospermia idiopática y de la oligostenozoospermia.^{39,104} Además, las células peritubulares testiculares humanas expresan receptores para los productos de las células cebadas, histamina y triptasa,⁴ lo cual podría ser útil en el mantenimiento de un fenotipo inmunosupresivo.²⁶⁹ En el síndrome de sólo células de Sertoli y en el síndrome de parada de la maduración de las células germinales, el incremento del espesor de las paredes tubulares se correlacionó positivamente con el aumento del número de células cebadas, que además mostraron una citología diferente, con formas redondeadas o alargadas y signos de degranulación. Los productos de degranulación de las células cebadas, incluyendo la triptasa, que es un potente factor de crecimiento de fibroblastos, muy probablemente estén involucrados en el engrosamiento de la pared tubular, en la hialinización peritubular, en fibrosis intersticial y atrofia testicular de los pacientes infértiles.^{8,151}

Los mecanismos íntimos del inicio de esta fibrosis peritubular no se conocen bien, pero datos experimentales sugieren que, muy probablemente, determinadas alteraciones de la membrana basal tubular pueden participar en el desarrollo de infertilidad, puesto que en algunos pacientes se han detectado alteraciones morfofuncionales de la membrana basal y el depósito de inmunocomplejos.^{136,214,215} Además, la membrana basal tubular también muy frecuentemente se encuentra engrosada en hombres subfértiles con varicocele,²¹⁷ criptorquidia,⁶ o después de la vasectomía.¹¹⁰

En pacientes con azoospermia, se han detectado alteraciones de la membrana basal y de los mecanismos inmunológicos que actúan en el testículo humano.^{136,215} El estudio de biopsias testiculares de hombres con azoospermia, incluyendo pacientes con síndrome sólo Sertoli, ha demostrado que el conteo de células cebadas, linfocitos T y B y macrófagos CD68 es mayor en síndrome sólo Sertoli, que en los casos con espermatogénesis normal;¹⁰⁶ si bien el incremento de células T, B y macrófagos no ha demostrado diferencia significativa, el aumento de células cebadas en biopsias con síndrome de sólo Sertoli ha sido significativamente mayor que en el grupo control; por ello, es necesario realizar nuevos estudios acerca de la participación de las células cebadas en diferentes patologías testiculares causantes de infertilidad en el varón.

INSUFICIENCIA HEPÁTICA CRÓNICA Y PATOLOGÍA TESTICULAR

El hígado juega un papel fundamental en el metabolismo, detoxificación y excreción de los esteroides sexuales. La insuficiencia hepática crónica (IHC) daña el eje hipotálamo-hipófiso-testicular, y por consiguiente todas las glándulas endocrinas relacionadas con el metabolismo de los esteroides sexuales. En la enfermedad hepática crónica, el principal factor patogénico de la subfertilidad está relacionado con la pérdida del parénquima hepático,²⁵⁹ y en general, la cantidad de tejido hepático residual funcionando se correlaciona con el grado de deficiencia androgénica en estos pacientes.^{85,95,112,121,127,132,201,254,255} El hipogonadismo es más evidente cuando avanza la enfermedad hepática crónica y se convierte en una enfermedad severa, como ocurre en el alcoholismo, en las hepatopatías fibróticas precirróticas, y en la hemocromatosis.²⁸⁰ La IHC está asociada con importantes manifestaciones de hipogonadismo, incluyendo infertilidad, hipoespermatogénesis, atrofia

testicular, ginecomastia, disminución del vello corporal y disfunción sexual.²⁶⁹ La biopsia testicular en pacientes con fibrosis hepática demuestra importante disminución del diámetro tubular, hipoespermatogénesis severa, fibrosis y sobre todo hialinización de la pared peritubular. Además, el intersticio está ampliado y en él se ven numerosas células de Leydig, agrupadas en grandes nódulos, lo que, aparentemente, da un aspecto de falsa hiperplasia, rodeando a estas células se observa edema y fibrosis del tejido conjuntivo intersticial. Sin embargo, esta fibrosis intersticial no se asocia a un incremento del número de células cebadas activas en las biopsias de pacientes cirróticos, respecto del control, cuando estas células cebadas se identifican con el método histoquímico de fucsia aldehído de Gomori o el método de azul alcian.¹⁸⁰

La producción de testosterona total y la testosterona libre biológicamente activa está disminuida en pacientes con IHC, lo que determina niveles circulantes más bajos; sin embargo, existe un aumento concomitante de los niveles circulantes de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) con la consiguiente disminución en la velocidad de eliminación renal de testosterona, lo que puede enmascarar la severidad de la deficiencia androgénica.¹⁴⁴ De hecho, aproximadamente el 20 % de los pacientes con IHC tienen un incremento inicial de la testosterona sérica, mientras que en la enfermedad avanzada, los niveles de testosterona disminuyen. El incremento inicial se debe a una elevación de la SHBG y su metabolismo disminuido en el hígado.²⁴³

En los pacientes con enfermedad hepática crónica, a pesar de los niveles bajos de testosterona, los niveles de gonadotropinas permanecen por debajo o dentro del rango eugonadal, con disminución de la secreción pulsátil de LH, lo que enfatiza la importancia de la disregulación hipotalámica en la patogénesis del hipogonadismo presente en pacientes con enfermedad hepática crónica.²⁵⁵ En efecto, en pacientes con hemocromatosis genética o postransfusional y fibrosis o cirrosis hepática, existe un hipogonadismo hipogonadotrópico, por depósito de hierro en la hipófisis, lo que determina alteraciones selectivas de las células gonadotropas. En los casos avanzados de hemocromatosis, los efectos metabólicos de la asociación de la cirrosis y de la diabetes aumentan el déficit androgénico de estos pacientes.^{59,126}

Estudios experimentales sugieren que un cortocircuito porto-cava, la sobreexpresión de aromatasa o la deficiencia de IGF-1 pueden participar en la disfunción gonadal secundaria a la cirrosis, a pesar de que estos mecanismos no han sido completamente confirmados en humanos.^{37,38} Por último, el incremento de la testosterona en pacientes con IHC puede representar un factor de riesgo para el desarrollo de un carcinoma hepatocelular, lo que explica la preponderancia masculina del hepatocarcinoma.²⁴¹ En pacientes con cirrosis, los niveles de estradiol total y libre, y la relación estradiol/testosterona se incrementa. El hiperestrogenismo se relaciona con características físicas femeninas.¹⁵⁷ En pacientes esperando un trasplante hepático se observó aumento de los niveles de estrógenos circulantes, que disminuyeron después de realizado el transplante.²²¹

Los pacientes con alcoholismo crónico frecuentemente presentan atrofia testicular y ginecomastia, alteraciones que inicialmente fueron consideradas como el resultado de la enfermedad hepática crónica secundaria al alcoholismo.^{16,23,83,140,158,203} Más tarde, se ha demostrado que la ingestión aguda de alcohol suprime los niveles plasmáticos de testosterona en sujetos voluntarios no alcohólicos y animales de experimentación; estos datos indican que la ingesta de alcohol directamente inhibe la esteroidogénesis en la célula de Leydig,^{13,88,257,278} y causa la pérdida de los signos de masculinización.⁷⁷ Se ha demostrado que el alcohol, y su metabolito acetaldehído, directamente suprime la función esteroidogénica testicular.⁴⁹ Además, diferentes estudios en células de Leydig murinas aisladas han demostrado que el etanol directamente inhibe la síntesis de testosterona.^{47,48,63,64,161} El mecanismo por el cual el alcohol o el acetaldehído actúan en la función esteroidogénica testicular es la inhibición de la actividad de la 17- α -hidroxiprogesterona aldolasa.^{44,116} Se ha sugerido también que el alcohol induce lesiones en el hipotálamo y la hipófisis, que también contribuye con los cambios atróficos en los testículos.⁷⁷ Otros estudios en ratas también han demostrado que la exposición al alcohol durante la vida fetal, a través del consumo de alcohol por las hembras embarazadas, produce inhibición de la biosíntesis androgénica en los testículos perinatales.¹²²

En el hombre, el efecto de la ingestión crónica de etanol en la estructura de la célula de Leydig está poco documentada y la mayoría de estudios han sido realizados en tejidos *postmortem*^{16,23,140,158,203} y son bastante contradictorios, ya que se ha informado que las

células de Leydig parecen histológicamente normales, a pesar del evidente daño de los tubos seminíferos y la atrofia y engrosamiento del tejido peritubular;⁷⁶ además, la cuantificación del número de células de Leydig en biopsias testiculares de pacientes alcohólicos son poco concluyentes, ya que han referido, tanto la existencia de hipoplasia, como de hiperplasia;⁷⁶ no obstante en un estudio metodológicamente bien estructurado, claramente se demuestra un incremento de las células de Leydig en algunos casos.¹²⁹ Estos hallazgos morfológicos están en consonancia con datos funcionales, ya que los pacientes con enfermedad alcohólica crónica presentan diferentes niveles de elevación de gonadotrofinas, sugestivos de un daño directo testicular debido al alcohol; pero concomitante con estos cambios también es necesario considerar los efectos predominantemente hipotalámicos que produce la IHC tan frecuente en el alcoholismo crónico; además, en los casos de IHC muy severos y en el coma hepático, estos pacientes tienden a presentar niveles extraordinariamente bajos de gonadotrofinas.²⁶⁹ Estos pacientes refieren síntomas como disminución de la libido, impotencia, y presentan tamaño reducido de la próstata y de las vesículas seminales.

El parénquima testicular en la mayoría de los pacientes alcohólicos crónicos, con o sin cirrosis, demuestra lesiones testiculares muy evidentes, caracterizadas por tubos seminíferos con diámetro reducido, engrosamiento de la lámina propia, y disminución o ausencia de células germinales. Las células de Leydig se encuentran reducidas en número y contienen múltiples gránulos de lipofucsina. Estos hallazgos histológicos se correlacionan, en parte, con alteraciones del seminograma, en el que frecuentemente se ven importantes cambios en el número y motilidad de los espermatozoides, así como un incremento en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales.^{76,86,256}

Por último, la asociación de atrofia testicular con ginecomastia y cirrosis hepática es ampliamente conocida, recibiendo la denominación de síndrome de Silvestrini-Corda.^{50,228}

CRIPTORQUIDIA Y SÍNDROME DE DISGENESIA TESTICULAR

La criptorquidia y los hipospadias son defectos congénitos genitales comunes que afectan respectivamente al 2-9% y al 0,2-1% de los varones recién nacidos. Estas alteraciones del desarrollo del aparato genital masculino también están vinculadas entre sí, compartiendo factores de riesgo^{2,268} y una fertilidad reducida.^{10,135,170} Además los pacientes con ambas

patologías tienen un mayor riesgo de desarrollar un cáncer de testículo, o una oligospermia.^{69,119,174,178,198,248,260,261}

La criptorquidia forma parte del denominado Síndrome de Disgenesia Testicular (SDT),^{22,226,233} el cual también comporta la presencia de hipospadias, alteración de la espermatogénesis y cáncer testicular.^{68,108,169,225,262} Estudios epidemiológicos han demostrado una mayor incidencia del SDT en los países nórdicos, en los que es más frecuente la pobre calidad seminal y el descenso del recuento espermático,¹¹⁸ así como un aumento de la frecuencia de la criptorquidia y los hipospadias.^{194,233,246} La incidencia de estas malformaciones parece haber aumentado en las últimas décadas en los países occidentales.^{70,147,246} Las diferencias geográficas mencionadas para ambas malformaciones se relacionan con la incidencia del cáncer testicular y de la baja calidad del semen.^{1,27,28,258}

El SDT en los casos más leves se manifiesta por un defecto en la espermatogénesis, y en los casos más graves, por el desarrollo de cáncer testicular. En los testículos de los pacientes con SDT se han encontrado una variedad de lesiones histológicas, entre las que se incluyen la presencia de tubos con sólo células de Sertoli, un patrón de atrofia mixta tubular, tanto en el mismo lobulillo testicular como en lobulillos adyacentes, tubos hipoplásicos, los denominados nódulos de células de Sertoli o adenomas de Pick, microlitiasis, tubos malformados, cambios granulares en las células de Sertoli, hiperplasia nodular de las células de Leydig y carcinoma *in situ* testicular (CIS).^{1,27,28,258}

Los mecanismos fisiológicos y endocrinos que regulan el descenso testicular no se conocen por completo. Varios factores están involucrados en la inducción del descenso testicular, entre los que se encuentran, además de andrógenos, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).¹⁶⁶

Las lesiones histopatológicas observadas en pacientes con alteraciones del descenso testicular son muy variables y difieren sustancialmente si la biopsia testicular se realiza, como así está recomendado, al final del primer año de edad, se difiere a final de la infancia o se realiza en adolescentes postpuberales; además, la intensidad de las lesiones depende también de la localización testicular inguinal baja, incluidos casos de testículo en ascensor,

inguinal alta, o intraabdominal, en donde las lesiones túbulo-intersticiales del testículo son muy intensas. En niños puede verse todo un espectro de alteraciones tubulares, desde tubos prácticamente normales, a otros con importante disminución del diámetro tubular y disminución del número de células germinales, hasta casos muy graves, con ausencia de espermatogonias, constituyéndose el característico patrón de sólo células de Sertoli.¹⁷³

Después de la pubertad, en la biopsia o en la orquiectomía de pacientes criptorquídicos frecuentemente se observa un patrón de atrofia mixta testicular, que se correlaciona con el pronóstico de fertilidad.^{174,175,190} En estos testículos se ven células de Sertoli inmaduras y disgenéticas, las cuales presentan cuerpos de inhibina que permiten identificarlas.¹⁷⁶ Además, la intensidad de la inmunotinción para receptor androgénico en las células de Sertoli disminuye en función de la severidad de las lesiones tubulares, de modo que la ausencia de expresión del receptor de andrógenos en células de Sertoli se correlaciona con la ausencia de espermatogénesis en los tubos seminíferos.^{172,206} En estos casos de criptorquidia postpuberal también se han observado alteraciones en la lámina propia de los tubos seminíferos.²¹⁶ Así mismo, existen alteraciones de las células de Leydig, con incremento de las vacuolas lipídicas intracitoplásmicas y disminución de la inmunoespresión de testosterona²⁰⁵ y también se evidencia un mayor número de células de Leydig extraparenquimatosas que en testículos normales.²⁰⁴ Estas células de Leydig ectópicas parecen tener una actividad funcional menor, dado que la intensidad de inmunotinción de testosterona disminuye con respecto a la observada en las células de Leydig intratesticulares.²⁰⁵ En definitiva, en la criptorquidia la detención de la espermatogénesis y, sobre todo, la presencia de un síndrome de sólo células de Sertoli son lesiones muy importantes, aunque no específicas, ya que este patrón morfológico de solo células de Sertoli ha sido descrito en otras muchas causas de infertilidad en el varón.¹⁸⁸

Estrógenos y Disruptores endocrinos

Es evidente que los mecanismos endocrinos juegan un papel fundamental en la regulación de la función testicular, y factores producidos localmente en la hipófisis o en el testículo son importantes para la regulación de la actividad hormonal. Algunos factores testiculares podrían ser mediadores de la acción hormonal y de la comunicación intra e

intercelular. En el testículo humano existen mecanismos de control local de la función de diferentes grupos celulares de los tubos seminíferos y del intersticio testicular, surgiendo así los conceptos de regulación paracrina, no solo entre las células germinales, las células de Sertoli, las células mioides peritubulares, sino también en relación con las células del intersticio testicular, incluidas las células de Leydig, los macrófagos y las células cebadas. Así mismo, se ha descrito una regulación autocrina dentro de cada tipo celular.²⁷⁰ Se ha establecido que estas regulaciones paracrinas y autocrinas son andrógeno-dependientes y tanto la espermatogénesis como la secreción de testosterona está regulada por la activación del receptor de andrógenos (para revisión ver Regadera *et al*, 1991; Regadera *et al*, 2001)^{205,206}

En la actualidad, la participación de los estrógenos en mecanismos íntimos de regulación endocrina testicular está adquiriendo especial importancia. En efecto, en el varón los estrógenos pueden ser sintetizados localmente en múltiples tejidos a partir de la testosterona, por la acción de la aromatasa,^{117,224} tal como se ha demostrado en el cerebro, donde los estrógenos actúan a través de sus receptores nucleares clásicos, o a través de acciones rápidas en la membrana.^{30,152,250} Se sabe que el estradiol suprime la LH y FSH, las cuales se secretan como respuesta a una administración exógena de GnRH, de modo que en hombres deficientes de GnRH, la inhibición de aromatasas incrementa la LH y FSH, lo que indica un papel de retroalimentación negativa para los estrógenos. Estos efectos se bloquean por agonistas de GnRH, indicando que los cambios en la secreción hipotalámica de GnRH son los responsables de estas acciones. En varones, los mecanismos dependientes de estrógenos intervienen también en la retroalimentación negativa mediada por testosterona en la expresión y secreción de la GnRH.¹⁶² Pero además, los niveles estrogénicos se incrementan por la conversión periférica de testosterona en estrógenos en el tejido adiposo y muscular.⁸⁴

En el testículo las hormonas estrogénicas están reguladas por receptores de estrógenos (ERs) α y β , que son expresados selectivamente en los diferentes tipos celulares testiculares. Por tanto, la fisiología testicular está, en parte, bajo el control de un balance entre los andrógenos y los estrógenos, lo cual también depende de la actividad de la aromatasa, permitiendo la formación de estrógenos a partir de andrógenos.^{34,99,183} En la rata madura, las

células de Leydig se consideran como la mayor fuente de estrógenos, mientras que en el animal inmaduro, la mayor síntesis ocurre en las células de Sertoli.^{35,102,131,181,193,211}

Los estrógenos tienen un papel esencial en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, controlando, en forma indirecta, el balance entre la LH y la testosterona, a través de un mecanismo de retroalimentación.¹⁸³ Los receptores estrogénicos ER α y ER β se han identificado en el testículo, los conductos eferentes y en el epidídimo.^{98,99,100,101,102,103,227} El receptor de estrógenos ER α y ER β se expresa en las células de Leydig, así como en el epitelio seminífero. Los estrógenos actúan sobre algunos mecanismos de la espermatogénesis, incluidos la proliferación, la diferenciación de las células germinales y la maduración final de las espermatidas, participando en los mecanismos de espermatogénesis y de apoptosis del epitelio seminífero normal.³⁶ Pero además, las células cebadas humanas expresan receptores estrogénicos α (ER α)^{111,279} y la exposición a los estrógenos determina una retroalimentación positiva de la expresión de triptasa y un incremento en la degranulación de las células cebadas,^{25,26,138,155,156,182} lo cual también interviene en la remodelación de la matriz extracelular de la pared peritubular y del intersticio del testículo normal y patológico.

El incremento de los estrógenos en diferentes patologías endocrinas del varón o la acción de los denominados disruptores endocrinos, producen un efecto deletéreo sobre el conteo espermático y un aumento de las alteraciones en el tracto reproductivo masculino, incluidas la criptorquidia, la presencia de hipospadia y el desarrollo de cáncer testicular.^{232,247} En el varón, estos disruptores endocrinos modifican los niveles de estrógenos, de andrógenos o de hormonas tiroideas y podría determinar alteraciones de la función reproductiva y malformaciones del tracto genitourinario, con disminución de la fertilidad.¹⁸⁵ De hecho, algunos productos químicos ambientales, por ejemplo, pesticidas policlorados, contaminantes orgánicos, plaguicidas y ftalatos se han relacionado con alteraciones del descenso testicular y con el cáncer de testículo.^{29,226,262} Además, la exposición prenatal a los ftalatos se correlacionó negativamente con los niveles de testosterona y la distancia anogenital, distancia que viene determinada por la acción de los andrógenos en la maduración embrionaria y fetal del varón. Por lo tanto, alteraciones del desarrollo del tracto reproductivo masculino, incluida la criptorquidia, puede ser estar relacionados con los efectos adversos de disruptores hormonales ambientales.¹⁴⁵

En el SDT se ha sugerido que las lesiones se producen durante el desarrollo prenatal, como consecuencia de factores genéticos, ambientales o disruptores endocrinos que causarían una alteración en el cociente estrógenos/andrógenos.^{22,82,146,177,226,272} Es posible que la disfunción de las células de Leydig con posterior disminución de los niveles de testosterona juegue también un papel en la patogénesis del SDT.¹¹³ En definitiva, estos factores exógenos tendrían un mayor peso en la asociación causal, aunque no excluye otros factores endógenos o de base genética. Incluso se postula la posibilidad de que ciertos polimorfismos genéticos específicos podrían potenciar el papel de los factores ambientales.^{164,247} Entre los factores de riesgo que comparten se encuentra la exposición a actividad estrogénica no equilibrada en momentos claves del desarrollo embrionario;⁷⁰ esto es, a una exposición fetal a productos químicos anti-androgénicos, puesto que los estrógenos endógenos o ambientales también han sido involucrados como causa de un descenso testicular alterado.^{67,249,277} En estudios experimentales, se observaron niveles de testosterona disminuidos y de estradiol elevados, en forma significativa, en testículos criptorquídicos, comparados con los controles.^{25,138}

En el SDT, la exposición a estrógenos y a antiandrógenos durante la vida fetal se acompaña de una maduración incompleta de las células de Sertoli, pero no se ha establecido fehacientemente si estos cambios están relacionados con alteraciones de la producción de testosterona por las células de Leydig fetales. En individuos adultos con tratamiento para cambio de género, expuestos a terapia estrogénica y antiandrogénica, se ha comparado los cambios de la maduración de células de Sertoli, con respecto a los encontrados en pacientes adultos criptorquídicos con SDT, demostrándose claramente una desdiferenciación de las células de Sertoli causada por la exposición a estrógenos.¹⁶⁸ Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios para confirmar los mecanismos íntimos implicados en el desarrollo de SDT.²⁷²

FINALIDADES DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

En la presente Tesis Doctoral se pretende estudiar la participación de la alteración de la regulación paracrina entre las células cebadas, los macrófagos y el estado de hipoespermatogénesis presente en patologías testiculares que cursan con subfertilidad,

incluyéndose en este estudio como prototipo de patología testicular adquirida la observada en pacientes con IHC y, de otra parte, como ejemplo de patología testicular congénita, la criptorquidia. De este modo se pretende valorar la relación de las células cebadas y los macrófagos con la organización estructural del tejido conjuntivo, y concretamente con la distribución de los fibroblastos CD34+, así como la participación de estas células en los mecanismos de fibrosis, evaluando morfométricamente la distribución de fibroblastos CD34+ en el intersticio y en la pared peritubular en el testículo del hombre normal, en pacientes con IHC y en casos con criptorquidia.

En las biopsias testiculares realizadas en pacientes con diferentes causas de infertilidad, incluidos los casos con IHC o con criptorquidia, muy frecuentemente se observa un engrosamiento de la pared peritubular, la cual se fibrosa y sufre una continua remodelación que termina en una evidente fibrosis peritubular.^{169,216} Sin embargo, las causas y las consecuencias de estos importantes cambios no son bien conocidas. Dado que las células cebadas, a través de sus productos triptasa e histamina, están implicadas en mecanismos de fibrosis, se ha sugerido que las células cebadas testiculares participan en el desarrollo de la fibrosis de la pared tubular y del intersticio en diferentes tipos de patología testicular.^{4,180,209} En biopsias testiculares de pacientes con azoospermia obstructiva y no obstructiva, así como en controles fértiles,²⁰⁹ se han identificado dos poblaciones de células cebadas, unas localizadas en la pared peritubular y otras en el intersticio testicular. En los pacientes con síndrome de sólo células de Sertoli o con parada en la maduración de la línea germinal se observó un incremento de las células cebadas, tanto en las localizadas en la pared peritubular como en el intersticio; sin embargo, en los pacientes con azoospermia obstructiva también se demostró un incremento, aunque no fue significativo comparado con los controles. Todos estos datos sugieren la participación de las células cebadas en los mecanismos de la alteración de la espermatogénesis relacionados con la subfertilidad.²⁰⁹

Por todo ello, las investigaciones que se desarrollarán en la presente Tesis Doctoral centradas en los mecanismo de fibrosis del intersticio y de la pared tubular, en relación con las alteraciones de los tubos seminíferos, de las células de Leydig, así como de los cambios cuantitativos de las células cebadas y de los macrófagos del intersticio testicular en pacientes con IHC o con criptorquidia, dos entidades en los que existe una evidente desregulación de

los andrógenos y de los estrógenos, constituyen dos modelos naturales de investigación de mecanismos implicados en las alteraciones de la regulación paracrina en la patología testicular humana.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

¿Existen cambios en el tejido conjuntivo del intersticio testicular y de la pared peritubular en relación con la insuficiencia hepática crónica y en la criptorquidia postpuberal, con respecto al testículo humano normal?

OBJETIVOS

Primero. Determinar la expresión inmunohistoquímica de CD34, CD68 y triptasa en el intersticio testicular y en la pared peritubular en el hombre adulto normal.

Segundo. Determinar la expresión inmunohistoquímica de CD34, CD68 y triptasa en el intersticio testicular y en la pared peritubular en testículos de pacientes con insuficiencia hepática crónica.

Tercero. Determinar la expresión inmunohistoquímica de CD34, CD68 y triptasa en el intersticio testicular y en la pared peritubular en diferentes tipos de disgenesia testicular, presentes en testículos criptorquídicos de pacientes postpuberales.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Se ha evaluado la expresión inmunohistoquímica y la cuantificación morfométrica de los macrófagos, células cebadas y la distribución de la expresión de CD34, nuevo marcador del tejido conjuntivo, en el intersticio y en la pared peritubular. Para ello, se han utilizado tejidos histológicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de los archivos del Hospital Universitario La Paz de Madrid (UAM). En total, en la presente Tesis se evalúan 37 casos que se distribuyeron en los siguientes grupos:

Grupo Control. 10 testículos de varón adulto normal.

Grupo 1. 17 testículos obtenidos en autopsias de pacientes diagnosticados con IHC.

Grupo 2. 10 piezas de orquiectomía de testículos disgenéticos obtenidos de pacientes con criptorquidia postpuberal uni o bilateral.

MÉTODOS

Métodos de Estudio Histológico General

La mayoría de las piezas de orquiectomía se fijaron por inmersión en formol neutro tamponado al 4%, durante 72 horas, pero algunas piezas quirúrgicas se fijaron en líquido de Bouin, fijador habitual de conservación de las biopsias testiculares para la evaluación diagnóstica y pronóstica de la fertilidad.

Tabla 1. Fijadores del tejido testicular

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 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 de secciones seleccionadas al azar (siempre en número superior a 6 cortes por testículo) en las piezas extirpadas en pacientes adultos. 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 periódico y reactivo de Schiff), tricrómico de Masson, 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 de la Expresión Proteica

Los anticuerpos y su dilución usados para la identificación de los macrófagos, células cebadas y para la valoración de distribución de células CD34 positivas se incluyen en la Tabla 2.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Casa	Dilución
Anti-CD68	Dako	1:200
Anti-Triptasa	Dako	1:200
Anti-CD34	Dako	1:200

Método Inmunohistoquímico Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)

Para realizar el método inmunohistoquímico de SBP de detección de la expresión de 3 anticuerpos 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) o con xilano (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 Hsu, con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,^{205,240} 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 desenmascaramiento del epítipo mediante tratamiento por calor; para ello,

las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con microondas 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. Luego, 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 a la dilución óptima (Tabla 2), en una solución de PBS+BSA al 1%. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4º 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 de Cuantificación del intersticio testicular y de la pared peritubular

El proceso de selección de campos microscópicos, con el fin de efectuar después las cuantificaciones histométricas, se describe a continuación brevemente: se seleccionaron 40 campos de cada caso, distribuidos al azar, con un objetivo 40X. En cada campo, se contaron el número de macrófagos CD68+ y el número de células cebadas Triptasa+ localizadas en el parénquima testicular. (**Fig. 4**).

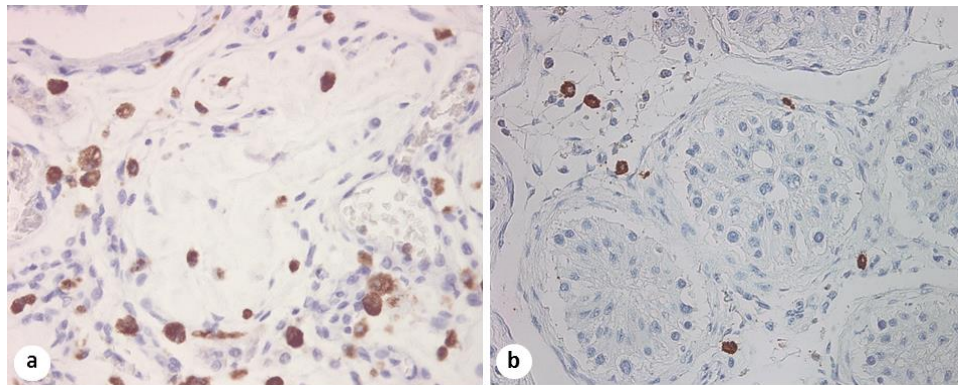


Fig 4. a) Abundantes macrófagos CD 68+ en un testículo de un paciente con IHC que muestra esclerosis tubular. **b)** Células cebadas triptasa+ distribuidas aisladamente en el intersticio y en la pared peritubular de un testículo de un caso de IHC, con un patrón de sólo células de Sertoli.

También se realizó una cuantificación de la distribución de las células CD34 positivas, tanto en el intersticio testicular como en la pared peritubular, usando el programa de análisis de imagen *Image J* que se describe a continuación.

Todas las muestras histológicas, previa selección al azar de los campos microscópicos, fueron fotografiadas con un fotomicroscopio Leica Eclipse 55i equipado con una cámara digital Leica DC200 y adquiridas con el software Image-Pro Plus y procesadas en formato TIFF. Todas las fotografías fueron realizadas con el objetivo de 40X. En cada muestra se fotografió el intersticio testicular y los tubos seminíferos, habiéndose obtenido las imágenes de 25 campos histológicos por caso, lo que da un total de 925 campos.

De cada fotografía histológica original se obtuvieron cuatro copias, las cuales fueron tratadas mediante el programa Adobe Photoshop, con el fin de segmentar las siguientes

estructuras: intersticio total, expresión de CD34 en el intersticio (Fig. 5), pared peritubular total y expresión de CD34 en la pared peritubular (Fig. 6). En definitiva, se procesaron para análisis morfométrico un total de 4.625 imágenes.

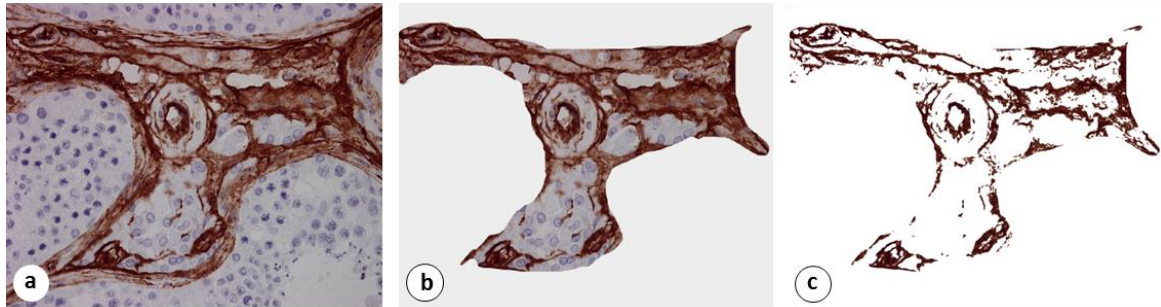


Fig. 5. *a)* Intersticio y tubos seminíferos, se observan células CD34+. *b)* Eliminación de tubos seminíferos, observando todo el intersticio que contiene las células CD34+. *c)* Eliminación de las células de Leydig, vasos sanguíneos y matriz extracelular del intersticio, observándose únicamente las células CD34+.

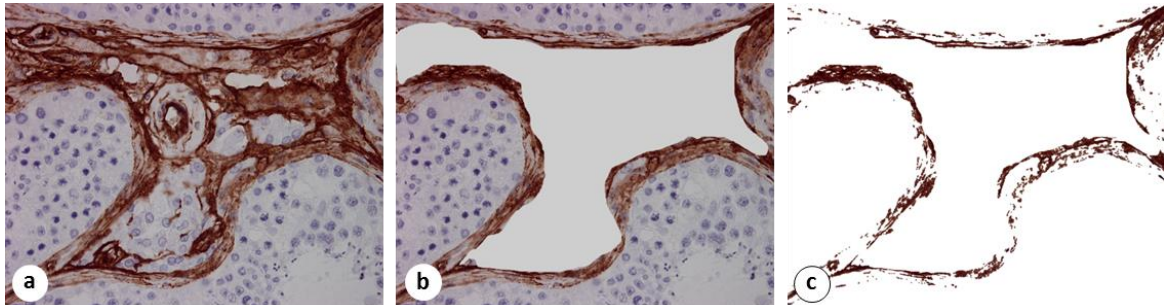


Fig. 6. *a)* Intersticio y tubos seminíferos, se observan células CD34+. *b)* Eliminación completa del intersticio. *c)* Eliminación completa del intersticio y de los tubos seminíferos, conservándose solamente las células CD34+ de la pared peritubular.

Software

Estas imágenes se procesaron con el software *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). *Image J* es ampliamente utilizado en numerosos estudios histométricos. Brevemente, describimos el software, el procesamiento y el análisis de las imágenes que incluyó el denominado *Colour deconvolution*, la segmentación y por último, la cuantificación.

Image J es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institute of Health. La primera versión del programa fue desarrollada por Wayne Rastban en 1997. Las características actuales del programa consisten en numerosas *plugins* y macros (macroinstrucciones) para el procesamiento de imágenes y operaciones de análisis, incluyendo segmentación y extracción de la imagen, reducción del ruido, transformaciones de la imagen y análisis de partículas. Estas características han sido expandidas por una amplia base de usuarios activos. Actualmente existen cientos de *plugins* y macros disponibles para su descarga. Otras ventajas del programa incluyen la capacidad de soportar numerosos tipos de formatos independientes de la plataforma. Como resultado de su independencia del tipo de plataforma, *Image J* es capaz de funcionar en múltiples sistemas operativos, incluyendo MS Windows, Apple OS y Linux.

Colour deconvolution

El *plugin colour* desarrollado por Gabriel Landini (Landini G: *Colour deconvolutionpluginv1.5*. [<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>]) fue usado para separar imágenes originales en tres imágenes que contienen los componentes del método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Perodxidasa (SBP) usando el vector H-DAB. El *plugin* crea una imagen adicional correspondiente al revelado con DAB de color marrón. Debido a que las regiones de interés son aquellas que expresan una tinción de color marrón, solo la imagen de 8-bit DAB fue conservada.

Segmentación

La herramienta *threshol* (umbral) fue utilizada para separar los píxeles más oscuros que el valor de *threshol*. Mediante esta selección podemos seleccionar aquellas regiones que presentan inmunotinción de aquellas con inmunotinción negativa y proceder a su cuantificación.

Cuantificación

En cada imagen, después de aplicar el *plugin colour deconvolution* y seleccionar el valor umbral, se procedió a cuantificar el área correspondiente a la superficie total del intersticio testicular y del área tubular, y la superficie correspondiente a aquellas áreas que expresaron inmunotinción. El resultado se expresó como un ratio entre el área inmunomarcada y el área total del intersticio o de los tubos seminíferos.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Manejo de Datos

Para informatizar los datos, se creó una base de datos (BD) con el programa Excel y se procesaron con la estructura adecuada para poder analizarlos posteriormente. Todos los datos cuantitativos se expresaron como el promedio \pm SEM (error estándar de la media). La significancia estadística se analizó mediante ANOVA de una vía, complementada por la prueba Tukey de comparación. La asociación entre las variables estudiadas se realizó mediante análisis de correlación paramétrica de Pearson. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

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 CS5. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Power Point 2010.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL PARÉNQUIMA TESTICULAR

En este trabajo hemos estudiado el parénquima testicular en 3 grupos, un grupo control y dos grupos de estudio:

1.- **Grupo control**, formado por 10 testículos de 5 pacientes adultos jóvenes con edades comprendidas entre 16 y 60 años, obtenidos durante la autopsia. Ninguno de estos pacientes presentaba enfermedad hepática, renal o endocrina, ni otras enfermedades o tratamientos con repercusión testicular.

2.- **Grupo 1**, formado por 17 testículos provenientes de autopsias de varones con insuficiencia hepática crónica, con edades comprendidas entre los 34 y 69 años (media: 51 años). Los diagnósticos clínicos y las lesiones hepáticas de los pacientes se reflejan en la **Tabla 3**. Entre los factores etiológicos más frecuentes se encuentra la hepatitis vírica, en 6 de los casos (35%), de los cuales 4 con hepatitis C y 2 con hepatitis B. El antecedente de alcoholismo crónico se pudo identificar en 2 casos. Las lesiones hepáticas compatibles con diagnóstico de cirrosis se observaron en 7 de los casos (41,1%), mientras que la necrosis hepática en 3 casos (17,6%) y fibrosis hepática en 4 casos (23,5%). En 2 casos se describen varices esofágicas y síndrome de hipertensión portal.

Las alteraciones del patrón de la espermatogénesis en los testículos de los pacientes con hepatopatía crónica cubren un gran espectro, desde espermatogénesis completa hasta hialinización tubular. En 6 casos podemos ver espermatogénesis completa, en grados variables entre el 80 y 95% en cuatro casos, y en los dos restantes, se observa en un 100%. El patrón de hipoespermatogénesis está presente en 4 casos, constituyendo el 100% en dos. En 6 de los casos hay parada de la maduración de espermatogonias, siendo el único patrón observado en tres. En 8 casos se observa hialinización testicular, y en uno de ellos comprende el 100%. Se observa un patrón mixto en 9 de los 17 casos, siendo la combinación más frecuente la espermatogénesis completa y la hialinización testicular. Se recogen los datos de cada uno de los casos en la **Tabla 4**.

Tabla 3. Características clínicas y lesión hepática de los pacientes del grupo 1 con IHC.

Nº caso	Edad (años)	Historia Clínica/Lesión hepática
1	34	Cirrosis macro-micronodular, por Hepatitis B crónica. Síndrome de hipertensión portal.
2	35	Esteatonecrosis hepática por infección por Citomegalovirus. SIDA.
3	47	Hepatitis crónica por virus C. Síndrome de hipertensión portal.
4	50	Hepatitis crónica evolucionada por Hepatitis C.
5	48	Cirrosis post-hepatitis C, ligeramente evolucionada y con ligera actividad. Alcoholismo crónico.
6	48	Hepatitis crónica C. Sd. hipertensión portal.
7	55	Cirrosis por Hepatitis crónica C. Varices gastroesofágicas.
8	65	Fibrosis centrolobulillar.
9	34	Necrosis hepática.
10	69	Fibroesteatonecrosis hepática.
11	61	Fibroesteatosis hepática en estado pre-fibrótico.
12	80	Cirrosis evolucionada probablemente post-alcohólica. Ictericia visceral.
13	56	Cirrosis por Hepatitis B crónica.
14	49	Cirrosis hepática.
15	47	Fibrosis portal no cirrótica. Trombosis portal. Varices esofágicas. Estado post esplenectomía.
16	50	Marcada fibrosis biliar con intensa colestasis secundaria a obstrucción.
17	39	Cirrosis macro-micronodular.

Tabla 4. Lesiones del parénquima testicular de los pacientes del grupo 1 con IHC.

Nº caso	Edad (años)	Diagnóstico Anatomopatológico
1	34	Intensa hipoespermatogénesis difusa (100%).
2	35	Atrofia tubular difusa. Parada de la maduración en espermatogonias (95%). Hialinización tubular (5%).
3	47	Hipoespermatogénesis (50%) Hialinización tubular (50%)
4	50	Espermatogénesis completa (80%). Hialinización tubular (20%)
5	48	Espermatogénesis completa (95%). Hialinización tubular (5%)
6	48	Hipoespermatogénesis severa (50%). Parada de la maduración en espermatogonias (50%).
7	55	Atrofia tubular difusa. Parada de la maduración en espermatogonias (90%). Hialinización tubular (10%).
8	65	Espermatogénesis completa (100%).
9	34	Atrofia tubular ligera. Espermatogénesis completa (95%). Hialinización tubular (5%).
10	69	Atrofia tubular difusa. Hipoespermatogénesis (90%). Hialinización tubular(10%).
11	61	Parada de la maduración en espermatogonias (100%).
12	80	Espermatogénesis completa (85%). Hialinización tubular (15%)
13	56	Espermatogénesis completa (100%).
14	49	Parada de la maduración en espermatogonias (100%).
15	47	Hialinización tubular (100%).
16	50	Parada de la maduración en espermatogonias (100%).
17	39	Hipoespermatogénesis severa (100%).

3.- **Grupo 2**, formado por 10 testículos obtenidos de piezas quirúrgicas de varones con criptorquidia postpuberal, con edades comprendidas entre los 26 y 58 años (media: 29 años). En la tabla 5 se resumen las alteraciones anatomopatológicas de los testículos criptorquídicos postpuberales. En la mayoría, 8 casos, se observa un patrón de sólo células de Sertoli. Dos casos presentan hipoespermatogénesis, y en un caso, esclerosis tubular. Se pueden ver nódulos de células de Leydig en 4 casos. Las características histológicas del parénquima testicular de criptorquidia postpuberal de cada caso se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Diagnóstico anatomopatológico del parénquima testicular de los pacientes del grupo 2 con criptorquidia postpuberal.

Nº caso	Edad (años)	Diagnóstico Anatomopatológico
1	26	Sólo Sertoli disgenéticas (100%). Nódulos de células de Leydig.
2	29	Sólo Sertoli disgenéticas (100%). Zonas hipoplásicas. Nódulos de células de Leydig.
3	27	Sólo Sertoli disgenéticas (100%).
4	26	Sólo Sertoli disgenéticas (100%). Nódulos de células de Leydig.
5	18	Sólo Sertoli disgenéticas (100%). Zonas hipoplásicas.
6	58	Esclerosis tubular disgenética. Nódulos de células de Leydig.
7	32	Atrofia mixta. Sólo Sertoli disgenéticas (80%). Tubos con hipoespermatogénesis (15%). Tubos esclerosados (5%).
8	27	Atrofia mixta. Sólo Sertoli (25%). Hipoespermatogénesis (75%).
9	22	Atrofia mixta. Células Sertoli disgenéticas (80%), Hipoespermatogénesis (20%).
10	26	Sólo Sertoli disgenéticas (100%). Fibrosis intersticial. Hiperplasia de células de Leydig.

Diámetro tubular en los diferentes grupos de estudio.

Como método de evaluación del trofismo tubular se realizó medición del diámetro tubular en los dos grupos de estudio y el grupo control. El promedio del diámetro tubular mostró diferencias significativas entre los tres grupos, siendo menor en el grupo de IHC ($p < 0,01$) y en el grupo de criptorquidia ($p < 0,001$) con respecto al grupo control. (Tabla 6 y Fig. 7)

Tabla 6. Diámetro tubular. Se muestran los promedios de cada grupo.

Grupo	Diámetro tubular promedio (μm) \pm DE
Control	201,8 \pm 10,3
Insuficiencia Hepática Crónica	144,5 \pm 13,3**
Criptorquidia	118,1 \pm 5,6***

** : $p < 0,01$. *** : $p < 0,001$.

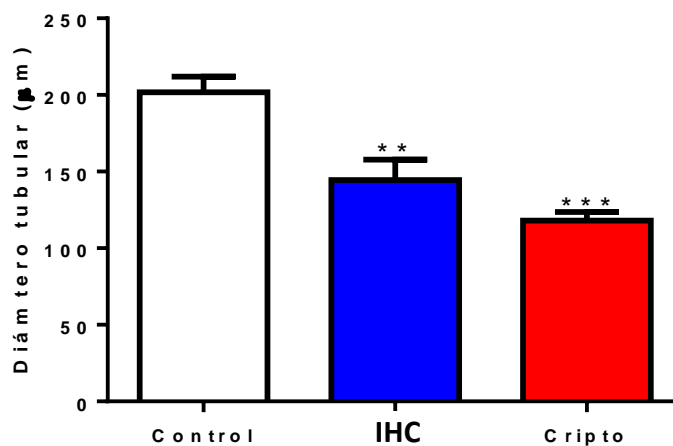


Figura 7. Promedio del diámetro tubular en los diferentes grupos de estudio.

** : $p < 0,01$. *** : $p < 0,001$.

Estudio histológico con inmunotinciones.

En el presente estudio hemos observado la distribución de las células CD34+, macrófagos y células cebadas, en el intersticio testicular y en la pared de los tubos seminíferos en testículos humanos normales, **(Fig. 8)** en testículos con alteraciones adquiridas, como lo es IHC, **(Fig. 9-15)** y alteraciones congénitas, en este caso, criptorquidia postpuberal. **(Fig. 16-22)**

Fig. 8. Intersticio y pared peritubular del testículo normal.

- a) Pared peritubular e intersticio de un testículo normal. Obsérvese la rica red inmunomarcada con el anticuerpo anti-CD34.
- b) Se observa irregular distribución de las células CD34+ en la pared peritubular, con engrosamiento inicial. La espermatogénesis es normal y las células CD34+ del intersticio rodean a una arteriola.
- c) Detalle de la imagen anterior en el que se observan esbozos de inmunomarcaje CD34+ entre las células de Leydig. Nótese duplicación de estas células en la pared peritubular engrosada.
- d) El testículo es normal, pero el espacio intertubular está ampliado, debido al incremento de la matriz extracelular que distiende las prolongaciones celulares CD34+.
- e) Detalle de la figura anterior en el que se demuestra engrosamiento irregular de la pared peritubular que contiene varias células CD34+. La espermatogénesis es normal.
- f) Tubo seminífero con espermatogénesis conservada e intersticio normal. Los macrófagos CD68+ son escasos.
- g) En la proximidad de la pared peritubular se identifican dos macrófagos CD68+. La espermatogénesis es normal.
- h) En el citoplasma de los macrófagos se observa un intenso inmunomarcaje de CD68.
- i) En el tejido conjuntivo del intersticio intertubular se localizan dos células cebadas triptasa+.
- j) La espermatogénesis es normal, aunque existe descamación intratubular. La pared peritubular es fina y contiene una célula cebada triptasa+.
- k) En la vecindad de las células de Leydig intersticiales existe una célula cebada triptasa+ con posibles signos de degranulación.

Intersticio y Pared Peritubular del Testículo Normal

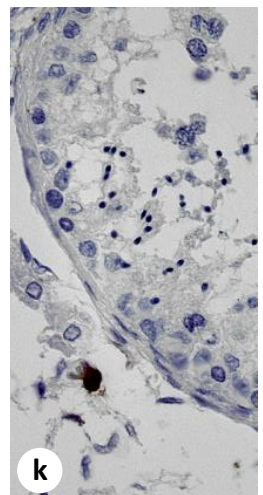
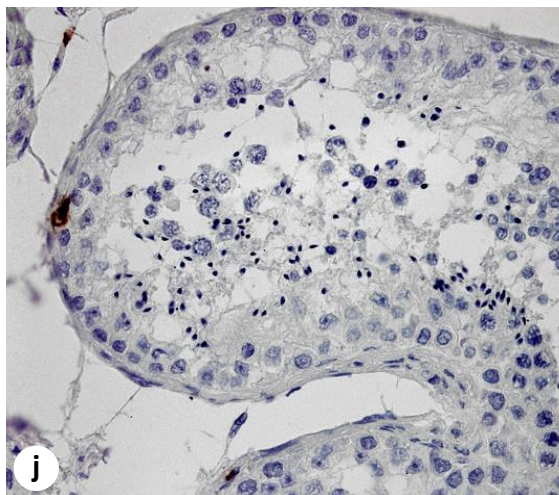
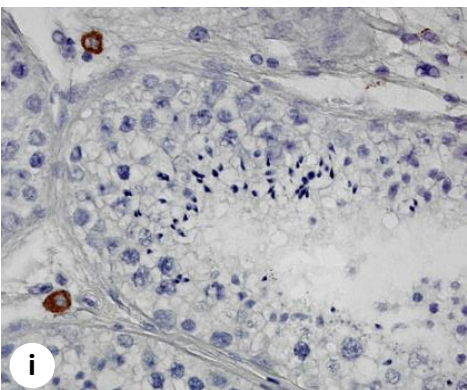
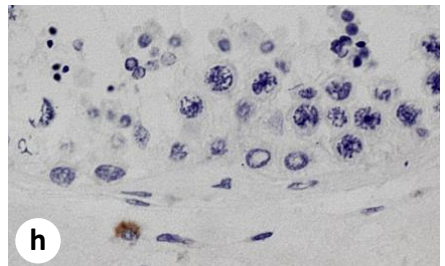
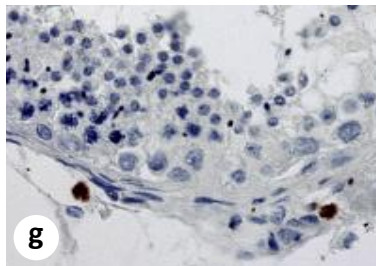
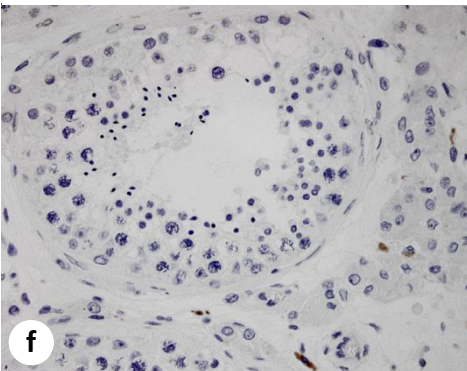
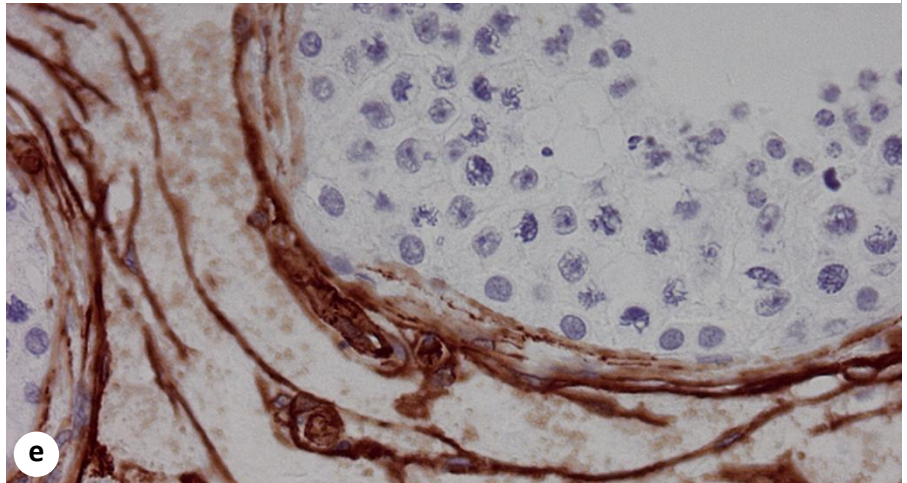
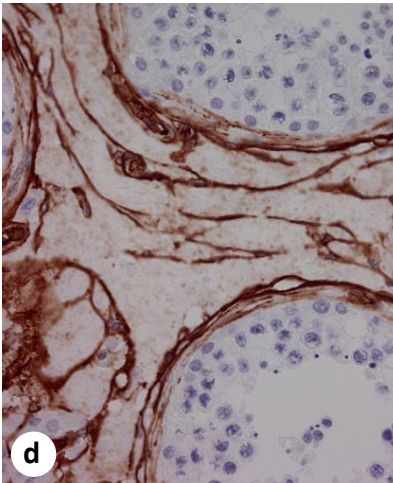
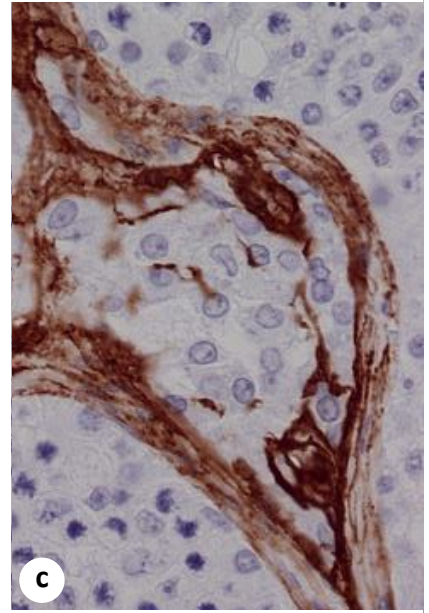
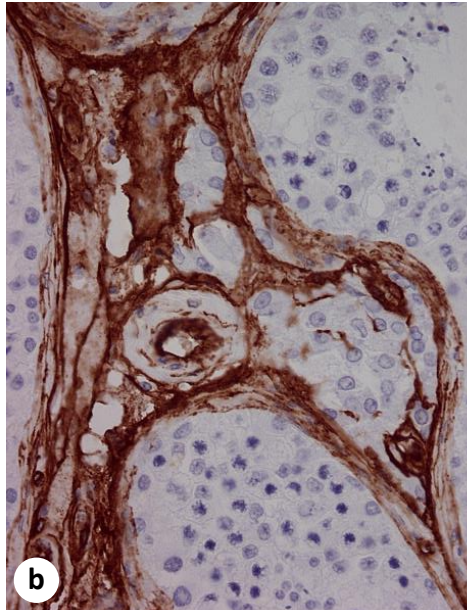
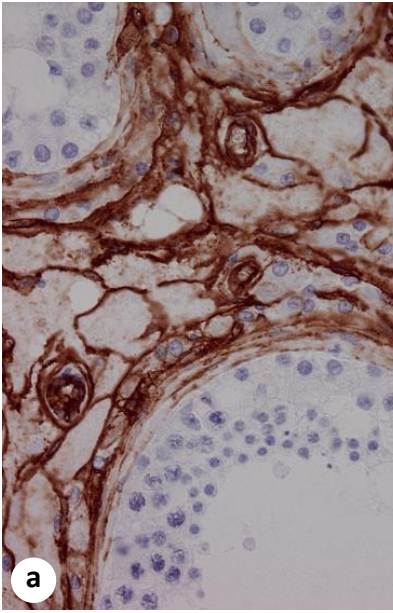


Fig. 9. Valoración de la expresión de CD34 en la pared peritubular en pacientes con insuficiencia hepática crónica.

- a) Los tubos seminíferos conservan la espermatogénesis. El intersticio es normal y la pared peritubular está focalmente engrosada. Destaca la expresión de aspecto fibrilar de células CD34+ en la pared peritubular y en el intersticio testicular.
- b) Las células CD34 rodean a las arterias y arteriolas intersticiales.
- c) Detalle de la pared peritubular en el que se observa una continuidad de la lámina externa CD34+ con las células inmunomarcadas del intersticio. Destacan cúmulos lineales y focales de material CD34+ en la porción interna del engrosamiento de la pared tubular.
- d) Desestructuración completa de una pared peritubular engrosada en donde se aprecian prolongaciones celulares irregulares CD34+, entremezcladas con depósito de matriz extracelular.
- e) El tubo seminífero es muy irregular, debido a un engrosamiento de su pared peritubular, y son evidentes las prolongaciones celulares CD34+ tortuosas, las cuales también rodean a dos divertículos tubulares. En el intersticio existe una condensación de las células CD34.
- f) Los tubos seminíferos son pequeños y tienen importantes alteraciones de la espermatogénesis. La pared peritubular está engrosada y externamente está delimitada por una lámina circunferencial con intensa expresión de CD34; sin embargo hacia el interior de la pared las células CD34+ son más espaciadas. En el intersticio existen células CD34+ que se condensan alrededor de una arteriola.
- g) La gruesa pared peritubular contiene abundante matriz extracelular y escasas células CD34+, si se compara con el intenso marcaje del intersticio testicular. El tubo presenta hipoespermatogénesis intensa con espermatogonias hipertróficas.
- h) Tubo muy atrófico, con importante fibrosis peritubular, constituida fundamentalmente por células CD34+.

Insuficiencia Hepática Crónica: Células CD34 + en Pared Peritubular

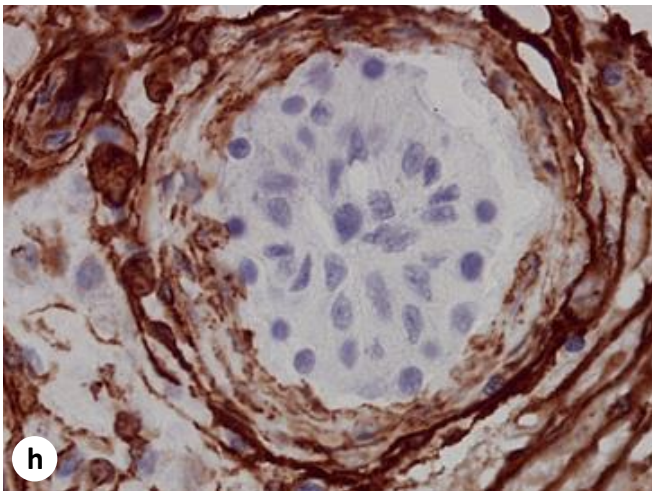
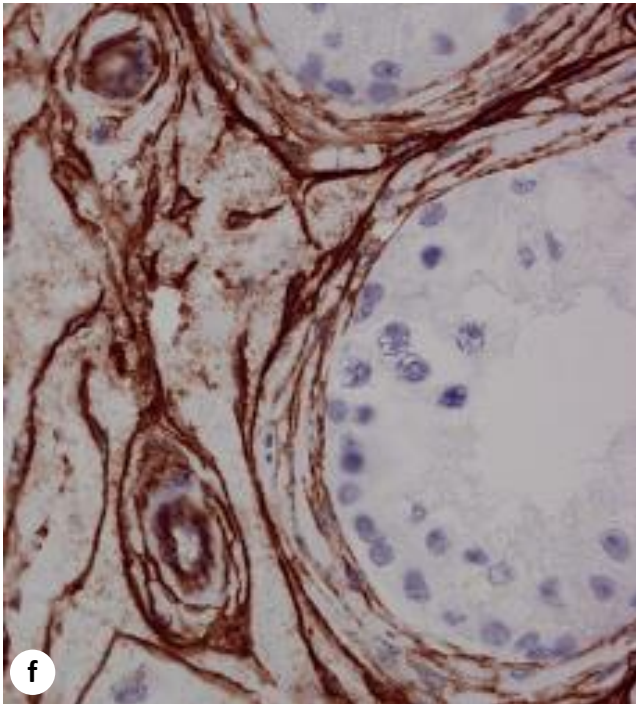
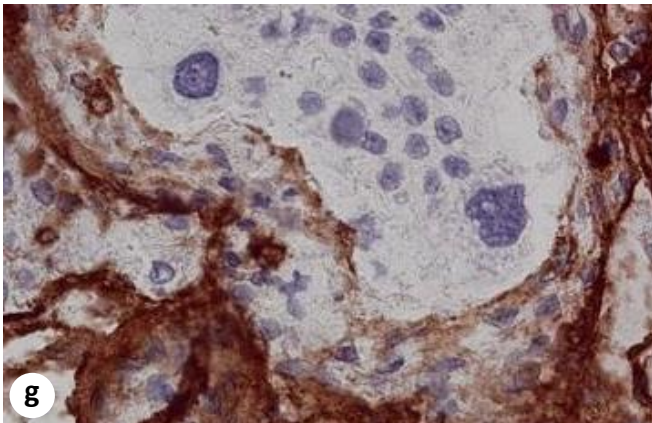
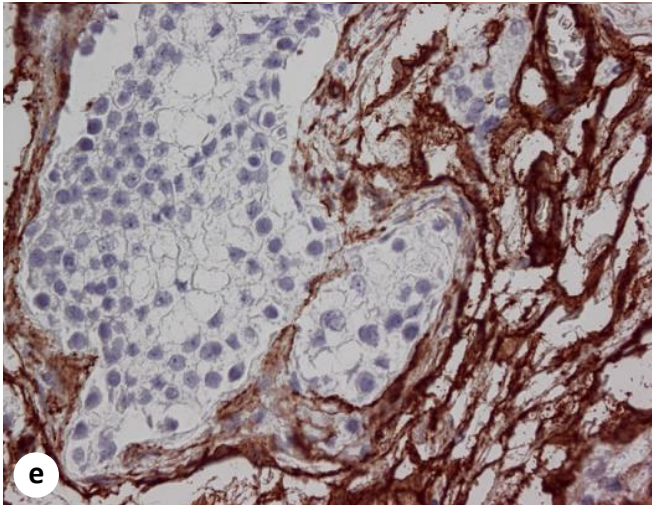
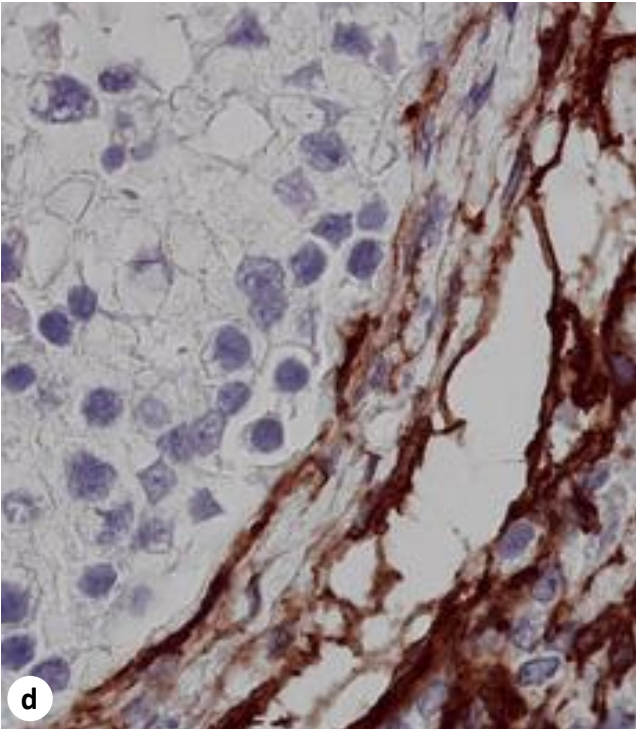
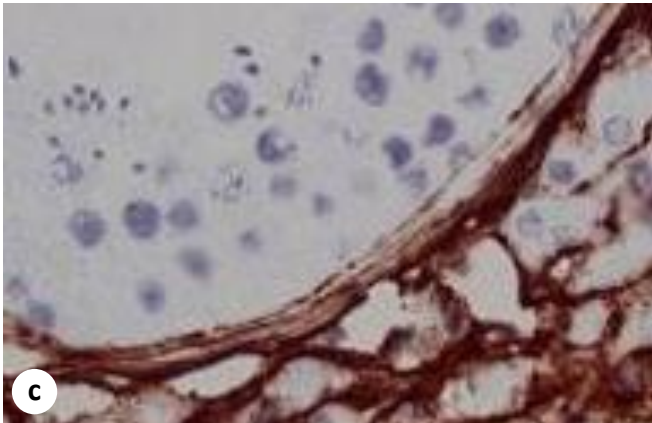
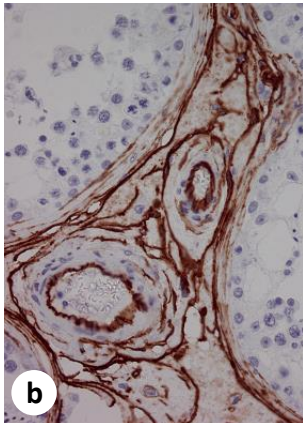
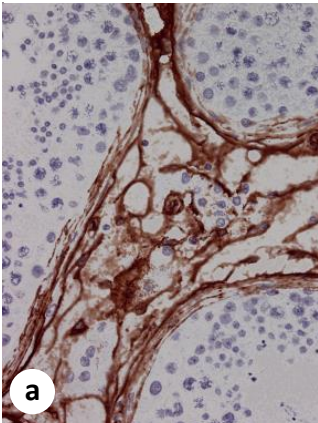


Fig. 10. Valoración de la expresión de CD34 en el intersticio testicular en pacientes con insuficiencia hepática crónica

- a) La atrofia tubular intensa se acompaña de importante aumento del espacio intersticial, en donde se identifican células CD34+ que rodean nódulos de células de Leydig.
- b) El inmunomarcaje de CD34 es muy intenso en el intersticio y se dispone formando gruesas prolongaciones CD34+.
- c) La intensa fibrosis intersticial se acompaña de extenso inmunomarcaje de células CD34+ que engloban y colapsan a los nódulos de células de Leydig.
- d) La abundancia de células CD34+ en el intersticio se continúa directamente con la pared peritubular engrosada.
- e) Tubos seminíferos completamente esclerosados, rodeados por una extensa fibrosis intersticial, con abundantes células CD34+.
- f) Las numerosas células CD34+ del intersticio rodean y se introducen en el interior de los tubos seminíferos esclerosados.
- g) Los tubos seminíferos esclerosados quedan atrapados por la intensa fibrosis intersticial, observándose la penetración de células CD34+ que progresivamente sustituyen al tubo seminífero.

Insuficiencia Hepática Crónica: Células CD34 + en Intersticio

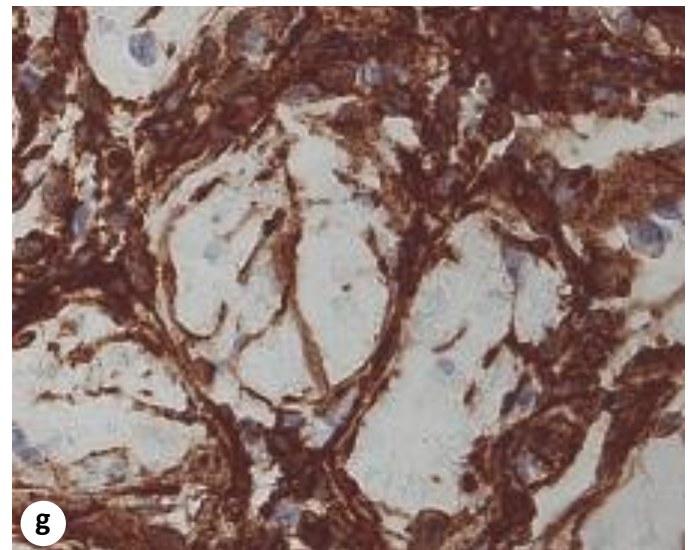
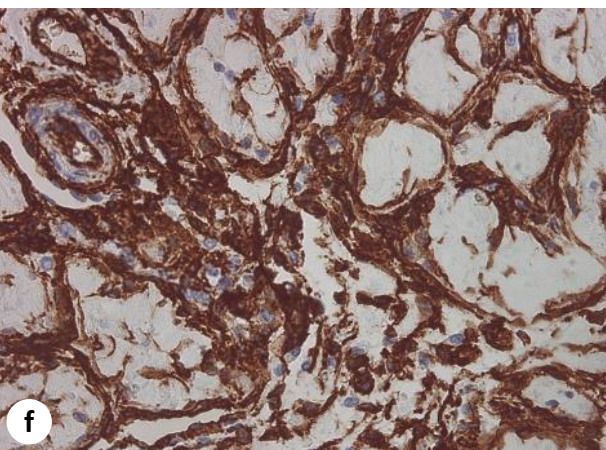
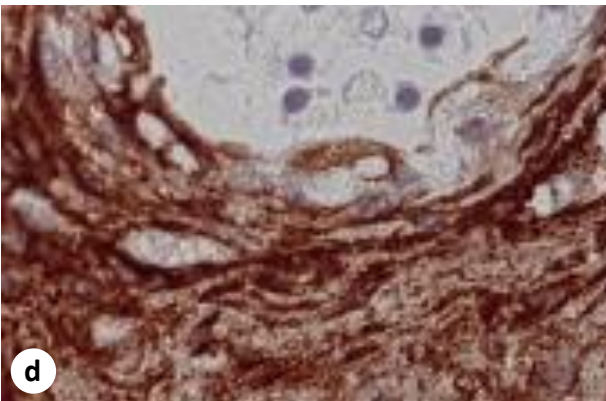
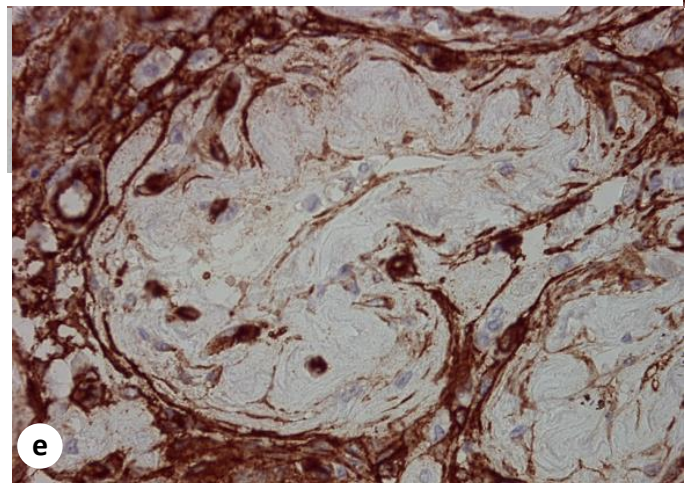
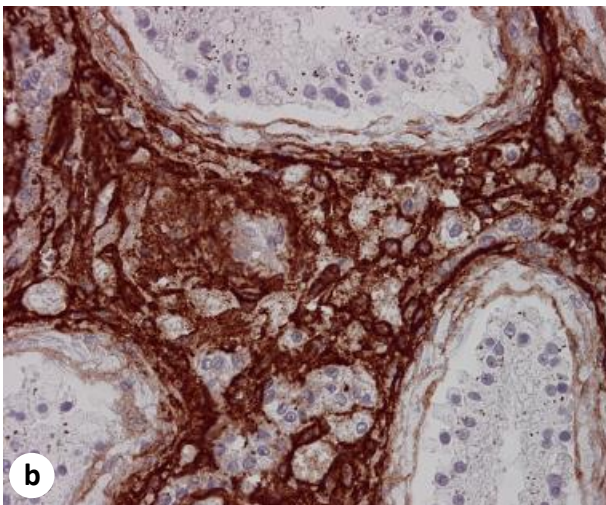
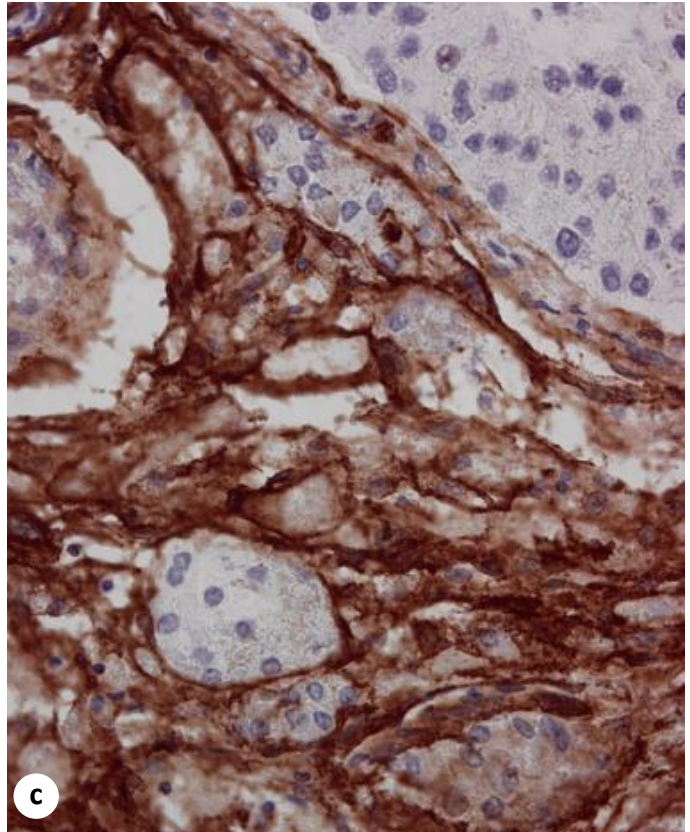
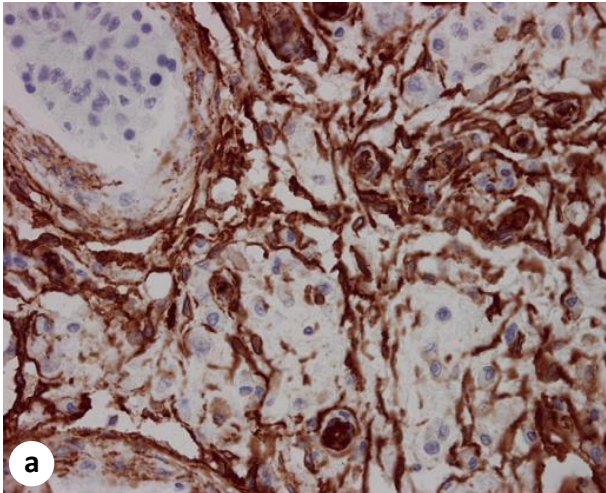


Fig. 11. Valoración de la expresión de CD34 en relación con las células de Leydig en pacientes con insuficiencia hepática crónica

- a) Tubos seminíferos con diferente grado de hipoespermatogénesis y fibrosis peritubular. En el intersticio se observan nódulos de células de Leydig y células CD34+.
- b) Detalle de una hiperplasia de células de Leydig adosadas a la pared peritubular engrosada. Entre las células de Leydig se observan células CD34+. **Inset:** En la íntima vecindad de las células de Leydig se destaca finas prolongaciones con inmunomarcaje de CD34.
- c) La expresión de CD34 es evidente en la pared peritubular engrosada; además, se observan células CD34+ dispuestas entre las células de Leydig.
- d) Extensa hiperplasia de células de Leydig surcada por células CD34+. La pared de los tubos seminíferos es gruesa y la distribución de células CD34+ es muy irregular.
- e) Detalle del intersticio testicular, caracterizado por una irregular distribución de la expresión de CD34, formando finas prolongaciones celulares situadas entre las células de Leydig.
- f) Entre los tubos esclerosados destaca abundantes células CD34+ rodeando las células de Leydig.

Insuficiencia Hepática Crónica: Células CD34 + en Intersticio

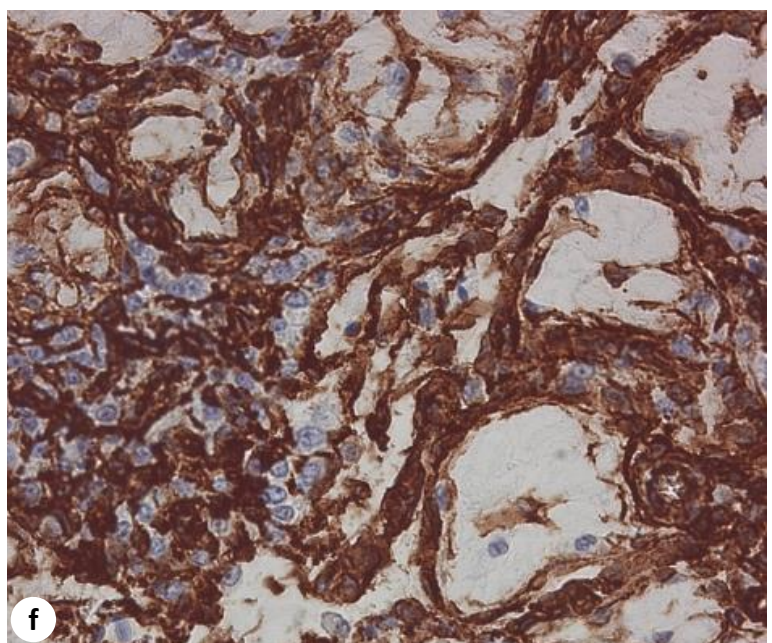
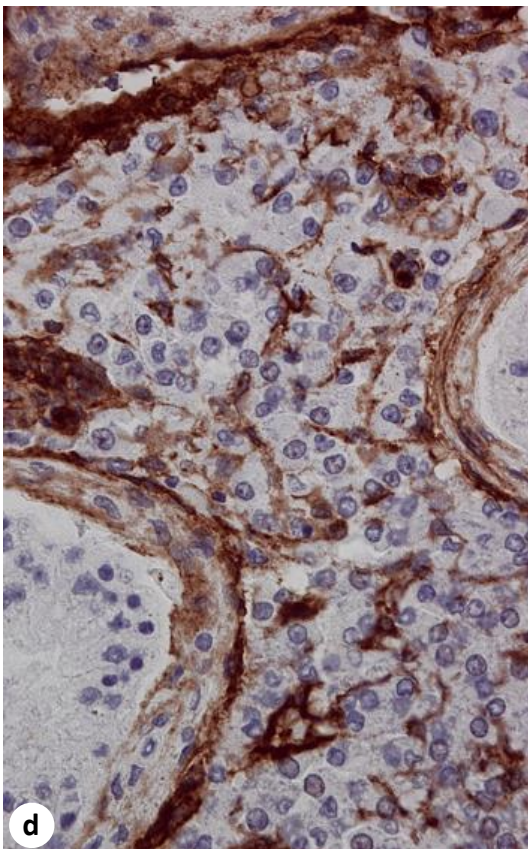
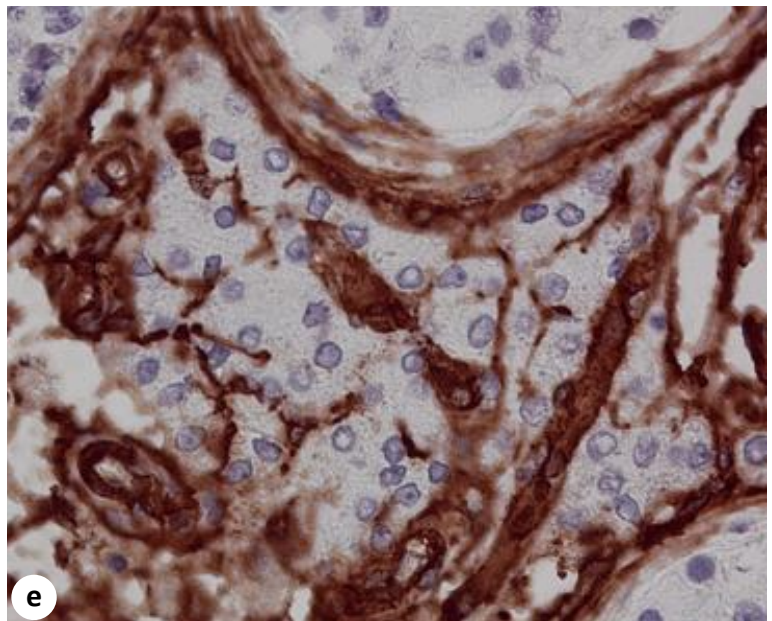
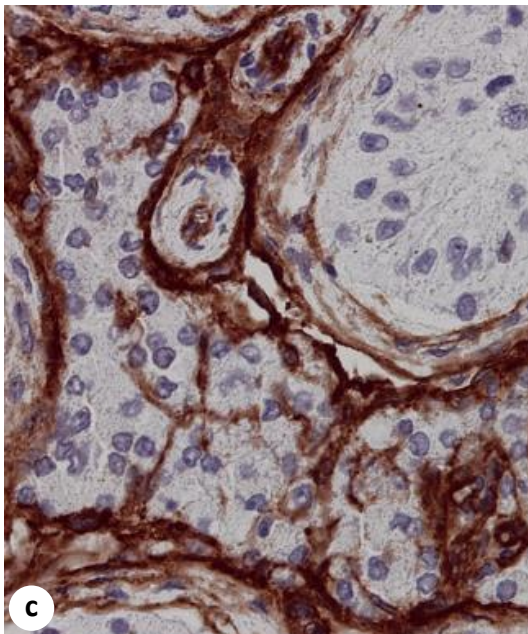
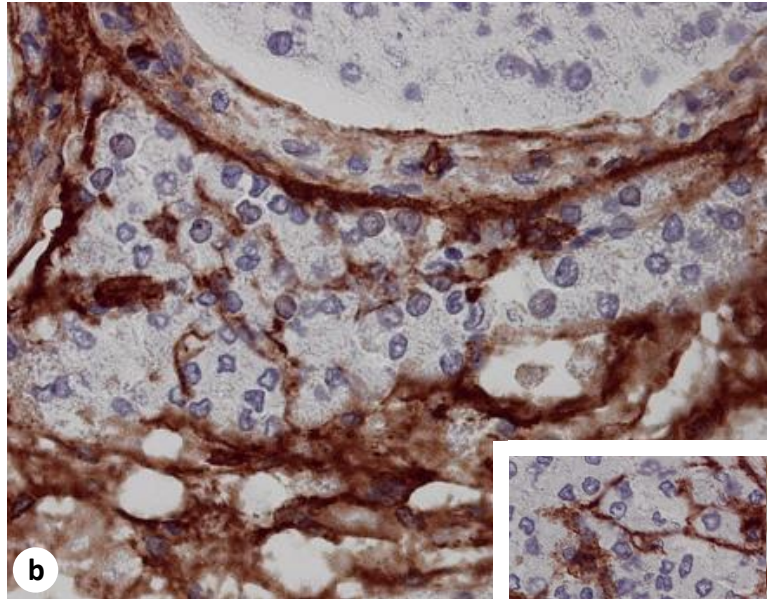
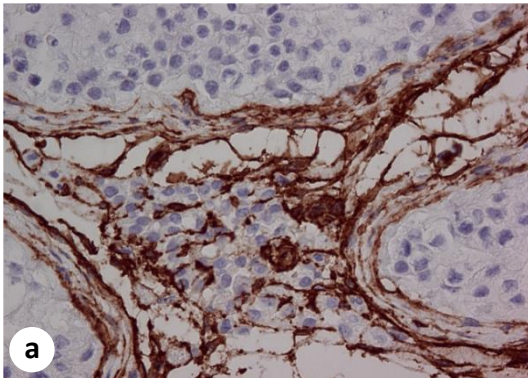


Fig. 12. Expresión de CD68 en los macrófagos testiculares en pacientes con insuficiencia hepática crónica

- a) Tubo seminífero normal con ligera descamación del epitelio tubular.
- b) Moderada atrofia del epitelio seminífero y dilatación luminal. Se observa un macrófago CD68+ en el intersticio peritubular.
- c) Múltiples macrófagos CD68+ en el tejido conjuntivo intersticial testicular. El tubo presenta hipoespermatogénesis moderada.
- d) Se ven nidos de macrófagos intersticiales inmunomarcados. La matriz extracelular está aumentada y los tubos presentan hipoespermatogénesis. Las células de Leydig son histológicamente normales.
- e) Importante fibrosis intersticial y atrofia tubular. En el intersticio se observan nidos de macrófagos CD68+. **Inset:** Intensa inmunotinción de CD68 en el citoplasma de los macrófagos intersticiales.
- f) Masiva presencia de macrófagos en intersticio peritubular. Se observa atrofia de tubos seminíferos y engrosamiento de la pared peritubular.
- g) La inmunoexpresión de CD68 ocupa todo el citoplasma de los abundantes macrófagos intersticiales. El tubo seminífero presenta hipoespermatogénesis intensa.
- h) En la luz del tubo esclerosado se acumulan varios macrófagos intensamente inmunomarcados con el anticuerpo anti-CD68.

Insuficiencia Hepática Crónica: Macrófagos CD68+

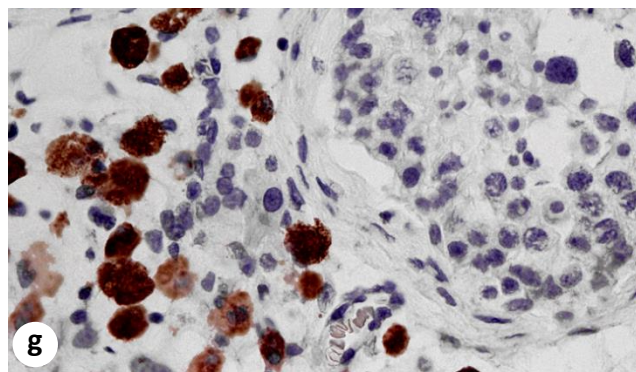
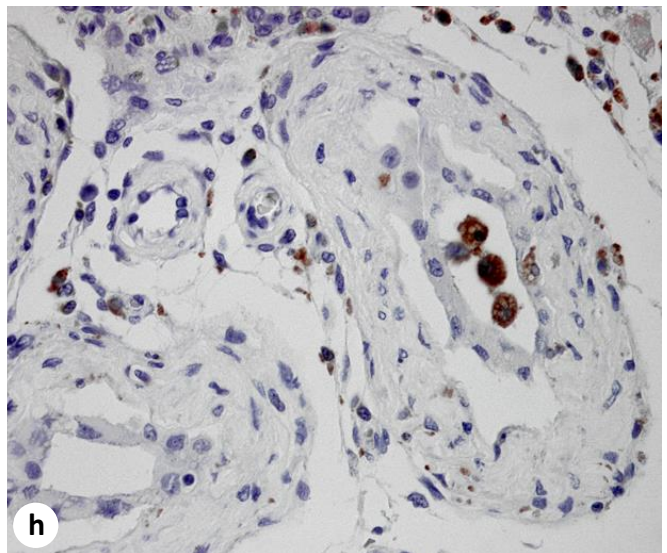
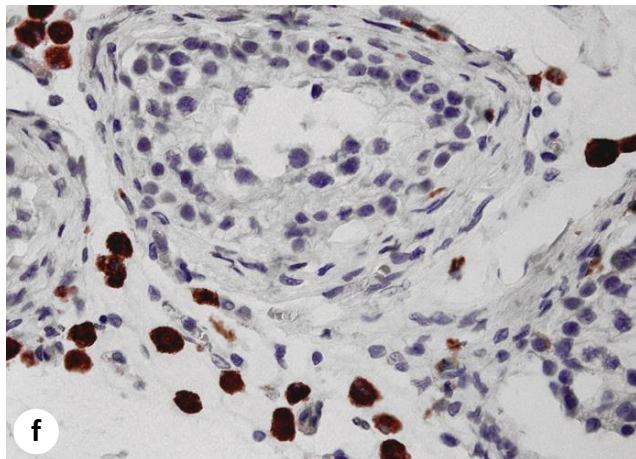
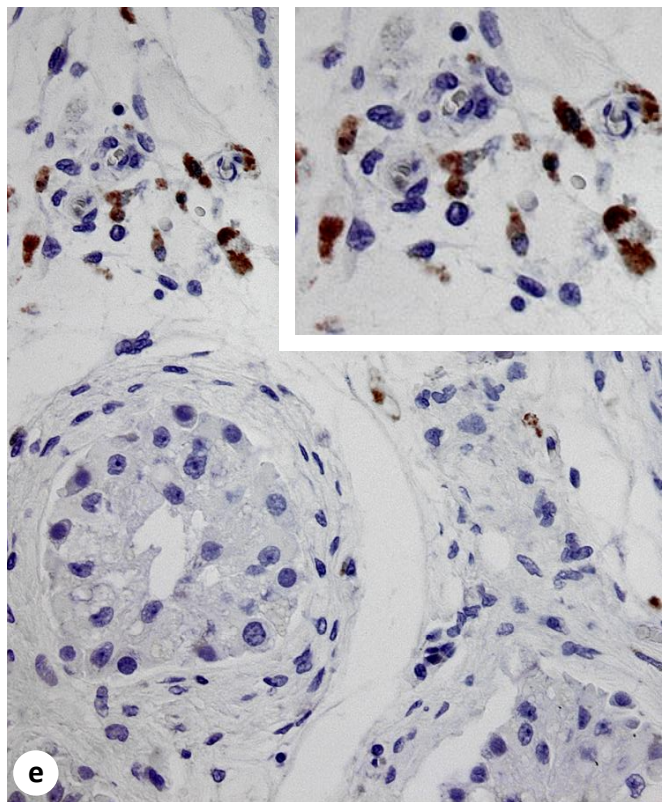
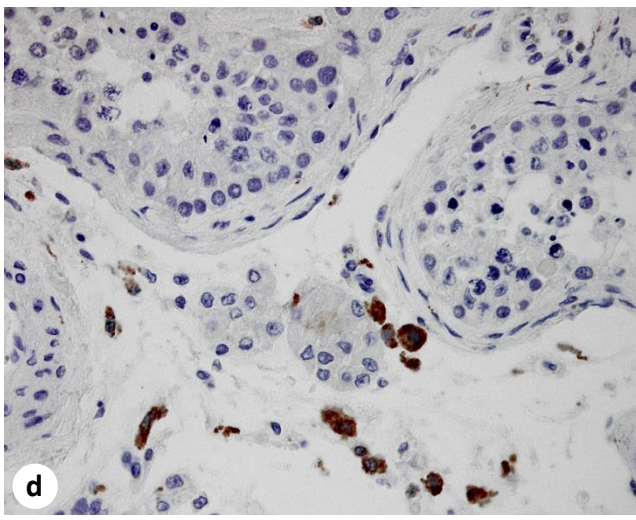
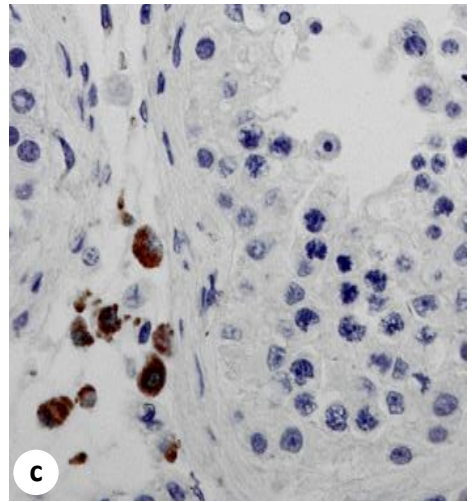
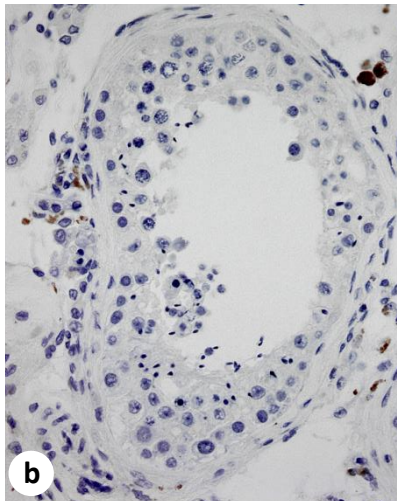
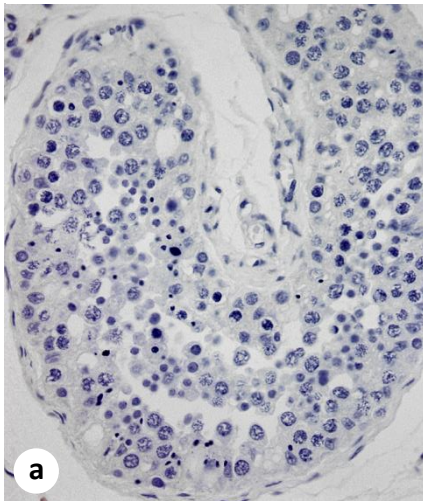


Fig. 13. Expresión de CD68 en los macrófagos testiculares en pacientes con insuficiencia hepática crónica

- a) Patrón mixto de hipoespermatogénesis intensa y esclerosis tubular completa. En el intersticio se observan algunos macrófagos CD68+.
- b) Los macrófagos inmunomarcados, localizados en el tejido conjuntivo intersticial, se disponen en la vecindad de la pared peritubular esclerosada.
- c) La infiltración de macrófagos CD68+ es masiva, y los macrófagos migran y se acumulan en el interior de los tubos seminíferos esclerosados.
- d) El intersticio testicular está ampliado y existe edema y dilatación de los espacios paralinfáticos, los cuales contienen abundantes macrófagos CD68+.
- e) Tubo seminífero con hipoespermatogénesis intensa, en el intersticio adyacente se observan numerosos macrófagos CD68+.
- f) Cúmulos de células de Leydig asociados a atrofia tubular. Nótese la presencia de infiltrados difusos de macrófagos.
- g) Pseudohiperplasia de células de Leydig en un testículo atrófico. Nótese la presencia de macrófagos con intensa expresión de CD68 en su citoplasma.
- h) Se observa una heterogeneidad del tamaño y de la intensidad de inmunotinción en los macrófagos intersticiales.

Insuficiencia Hepática Crónica: Macrófagos CD68+

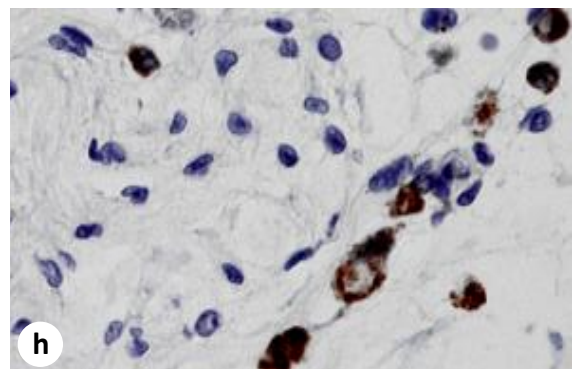
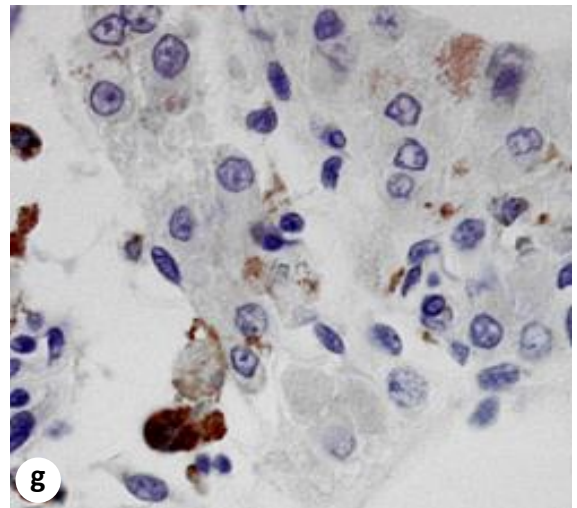
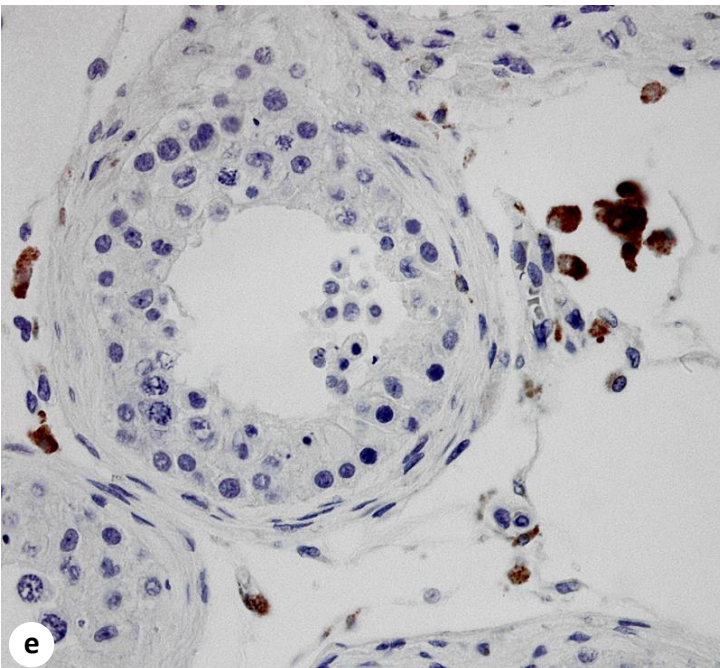
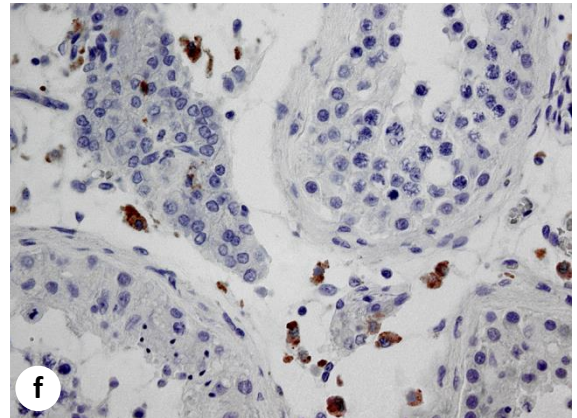
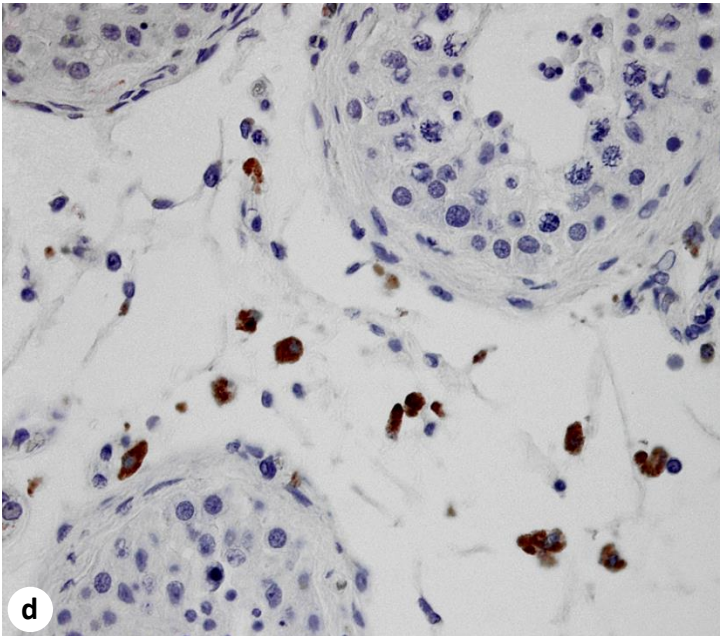
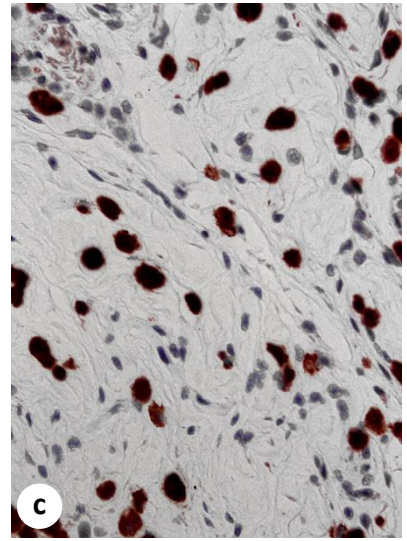
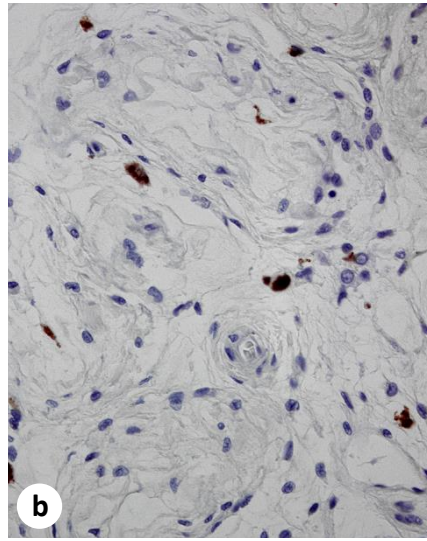
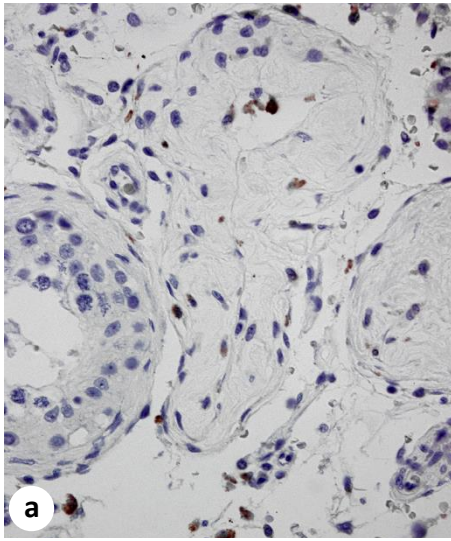


Fig. 14. Expresión de triptasa en las células cebadas testiculares en pacientes con insuficiencia hepática crónica

- a) Los tubos seminíferos presentan hipoespermatogénesis intensa, y el intersticio está ampliado. Se observa una célula cebada triptasa+ en la vecindad de células de Leydig.
- b) La pared del tubo seminífero está engrosada y contiene dos células cebadas inmunomarcadas. Testículo con hipoespermatogénesis y edema intersticial.
- c) La alteración de la espermatogénesis es importante y existe moderada fibrosis peritubular. Se observa pseudohiperplasia de células de Leydig y una célula cebada de gran tamaño y parcialmente degranulada.
- d) El diámetro tubular está disminuido, la espermatogénesis está alterada y solo se observa diferenciación focal de espermátidas maduras. La pared peritubular está muy engrosada y contiene una célula cebada elongada con signos de degranulación.
- e) Los tubos seminíferos están atróficos y existen múltiples grupos de células de Leydig en cuyo interior hay células cebadas triptasa+.
- f) El epitelio seminífero está constituido por células de Sertoli y aisladas espermatogonias. La pared peritubular está engrosada y en su periferia se observan dos células cebadas triptasa+.
- g) Detalle de la imagen anterior en el que se observa una gran célula cebada intensamente inmunomarcada adosada a la pared peritubular. En el otro extremo de la imagen se identifican gránulos triptasa+ en el espesor de la matriz extracelular de la pared.

Insuficiencia Hepática Crónica: Células Cebadas Triptasa +

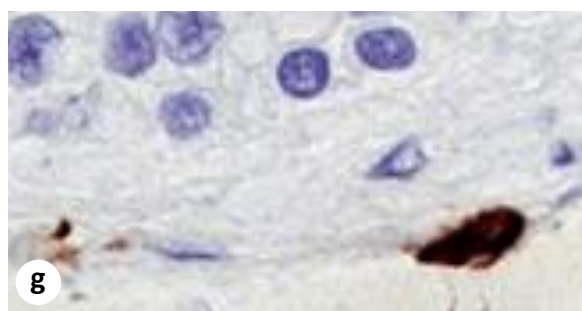
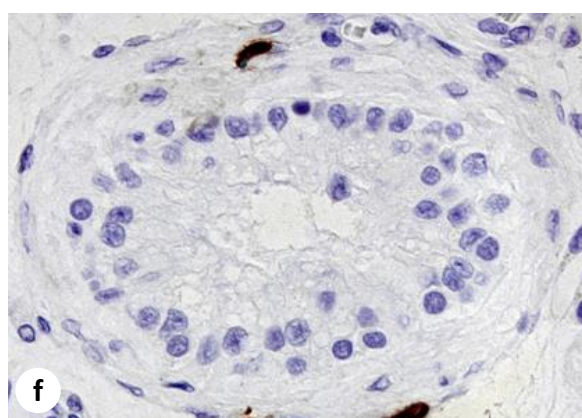
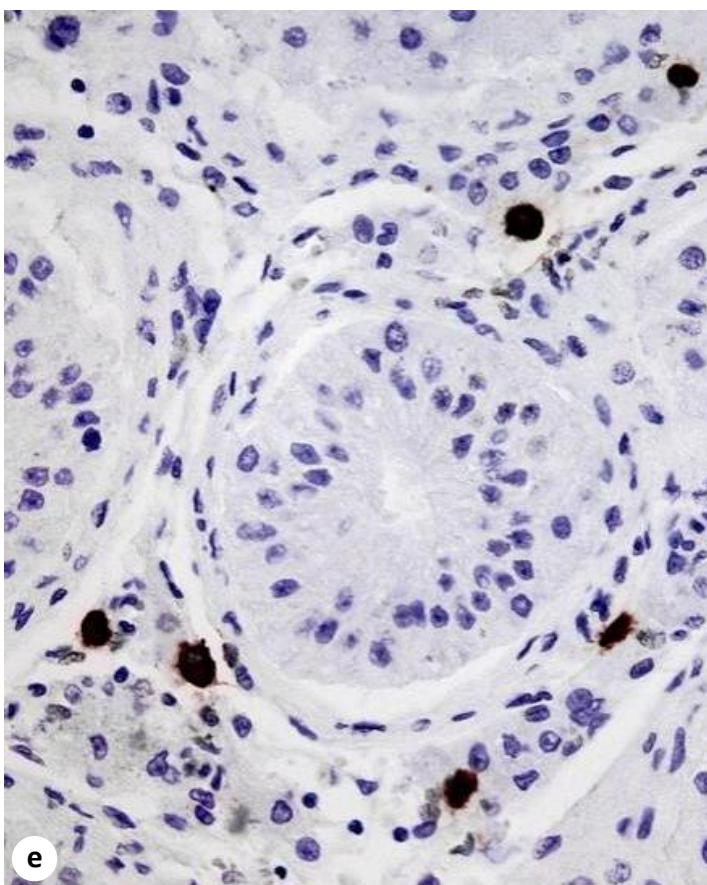
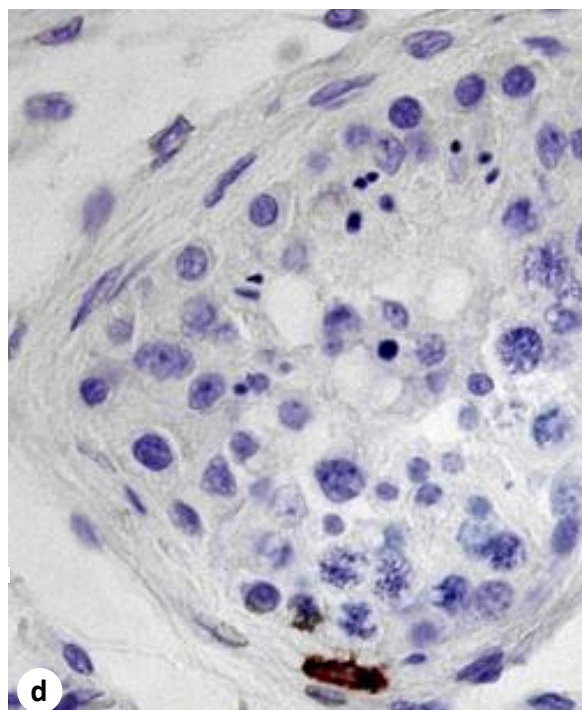
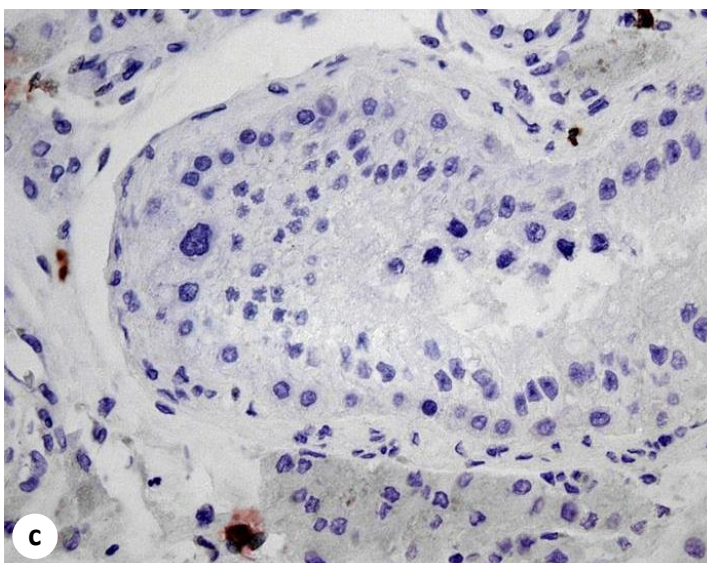
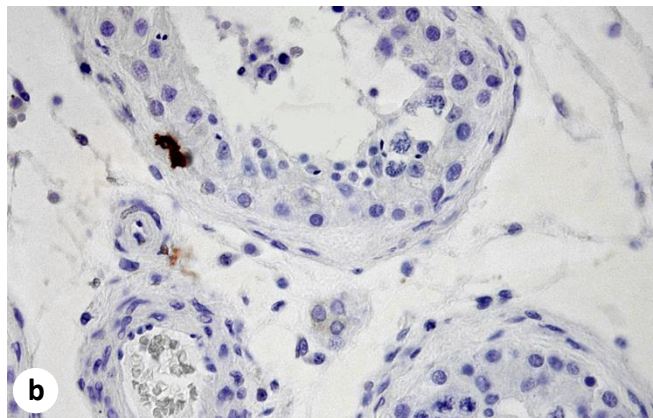
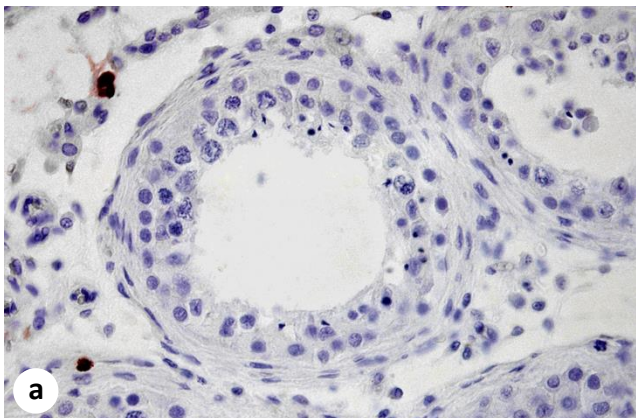


Fig. 15. Expresión de triptasa en las células cebadas testiculares en pacientes con insuficiencia hepática crónica

- a) Se observan tubos atróficos con hipoespermatogénesis y fibrosis peritubular. En el intersticio, se observa edema e infiltrados inflamatorios y se identifican varias células cebadas triptasa+.
- b) Tubos esclerosados en cuyo interior existen células cebadas inmunomarcadas. El intersticio contiene abundantes infiltrados de células inmunocompetentes.
- c) Asociado a tubos esclerosados, se encuentran grupos de células de Leydig rodeadas por tejido intersticial edematoso, en donde se identifican algunas células cebadas.
- d) Detalle de otro campo del caso anterior. Se visualiza una célula cebada triptasa+ en la periferia de un nódulo de células de Leydig.
- e) Extensa fibrosis intersticial, con edema de la matriz y abundantes células cebadas que muestran posibles signos de degranulación.
- f) Las células de Leydig presentan signos de atrofia, y el intersticio está fibrosado y contiene células cebadas de tamaño heterogéneo y parcialmente degranuladas.
- g) Detalle de una célula cebada con intensa expresión intracitoplásmica de triptasa.
- h) Célula cebada inmunomarcada en el intersticio testicular. Nótese la presencia de gránulos intracitoplásmicos triptasa+ y también secretados hacia el intersticio.

Insuficiencia Hepática Crónica: Células Cebadas Triptasa +

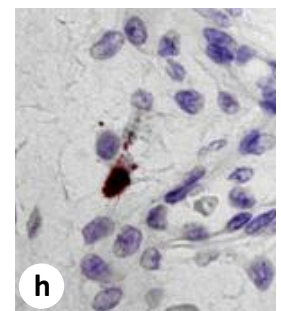
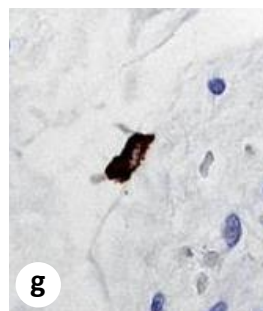
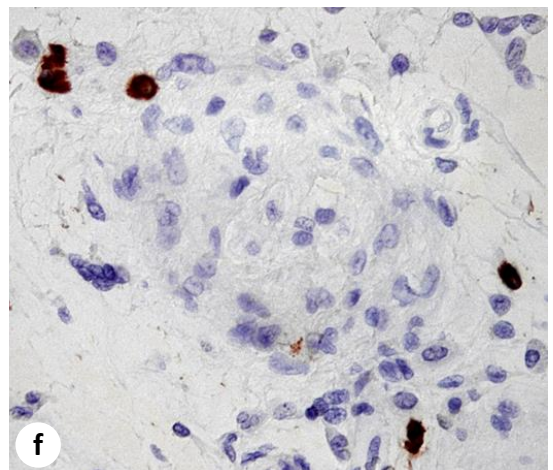
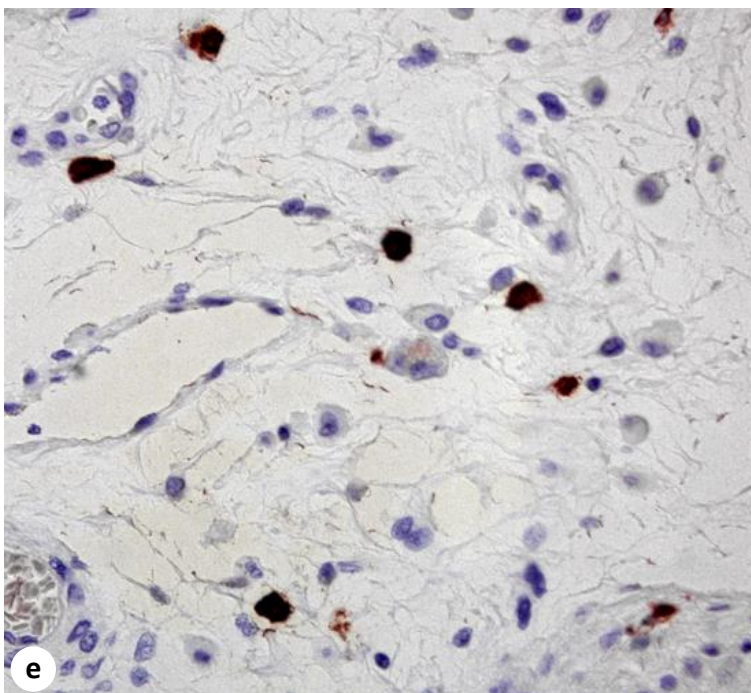
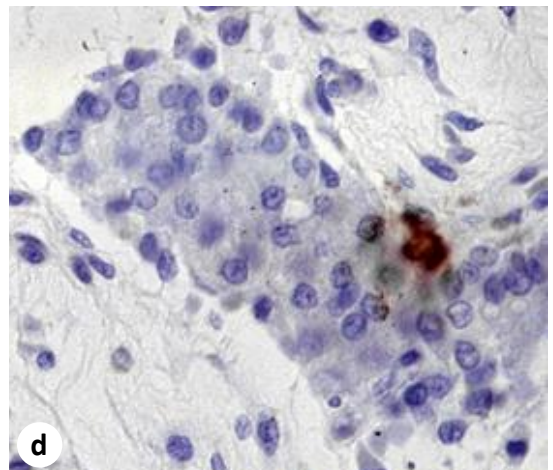
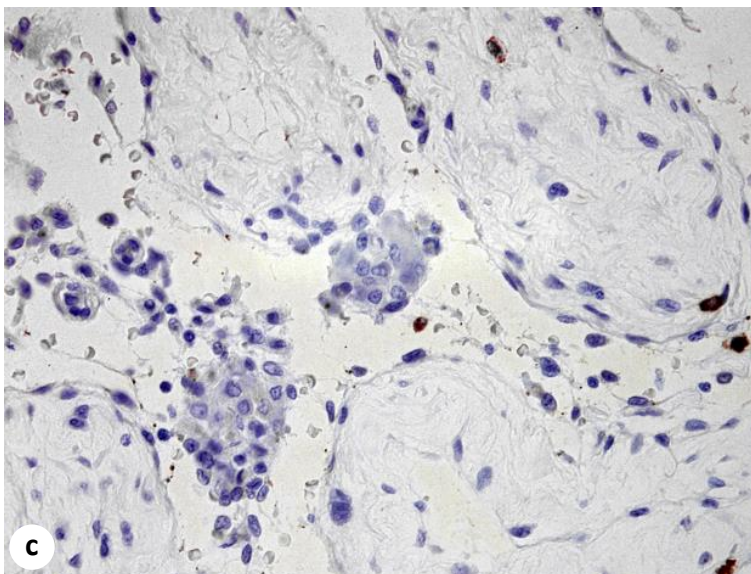
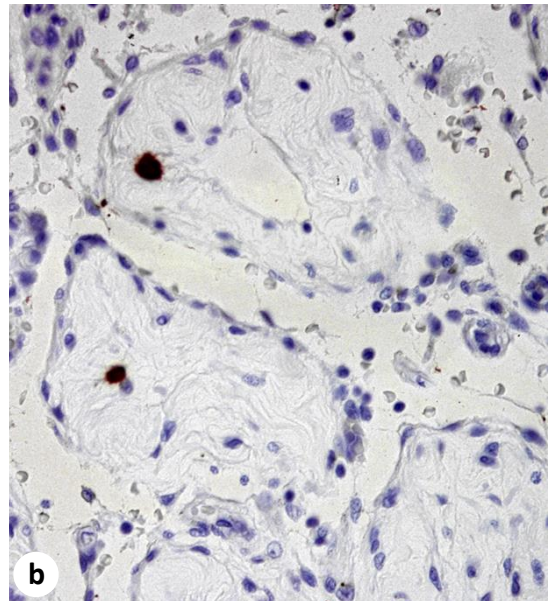
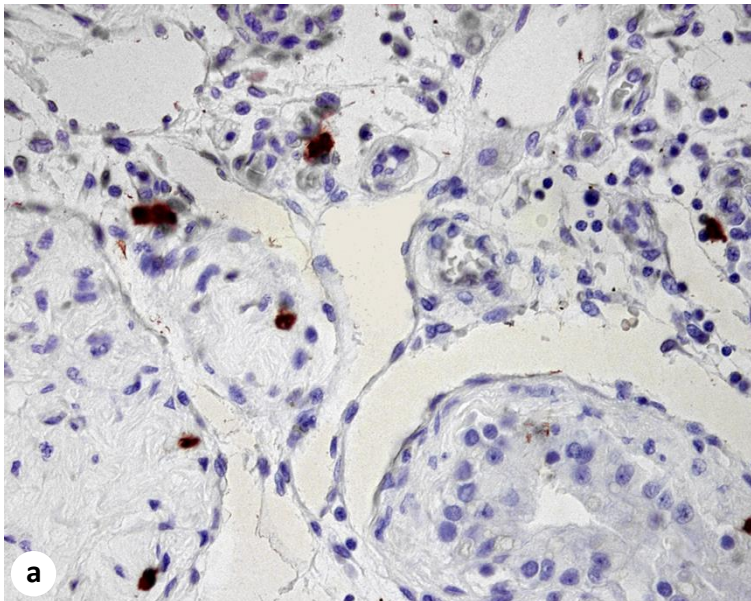


Fig. 16. Evaluación de la expresión de CD34 en la pared peritubular del testículo criptorquídico postpuberal

- a) Los tubos seminíferos tienen células de Sertoli y aisladas espermatogonias y espermatocitos de primer orden. Las células de Sertoli son inmaduras y están microvacuoladas. La pared peritubular externamente está rodeada por una lámina circunferencial de células CD34+.
- b) En otra área del caso anterior se observa engrosamiento de la pared peritubular, secundario al depósito de material hialino, y externamente vemos láminas circunferenciales de células CD34+. En el intersticio, rodeando a los nidos de células de Leydig o a la matriz extracelular, se ven prolongaciones CD34+.
- c) Los tubos están constituidos por células de Sertoli disgenéticas y por una pared intensamente hialinizada, en la que se distingue una capa externa discontinua de células CD34+.
- d) En otra área del caso anterior, el depósito del material hialino en la pared peritubular está delimitada por dos capas circunferenciales concéntricas de células CD34+.
- e) Tubo atrófico disgenético, con intensa hialinización de la pared delimitada externamente por una capa circunferencial concéntrica de células CD34+. En el intersticio, el depósito de células CD34+ es muy escaso.
- f) Patrón mixto de tubos esclerosados y tubos disgenéticos, con irregular distribución de células CD34+.

Criptorquidia: Células CD34 + en Pared Peritubular

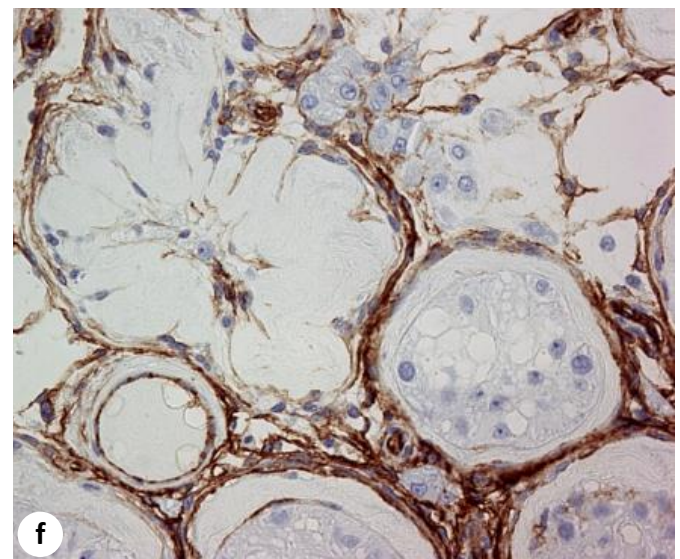
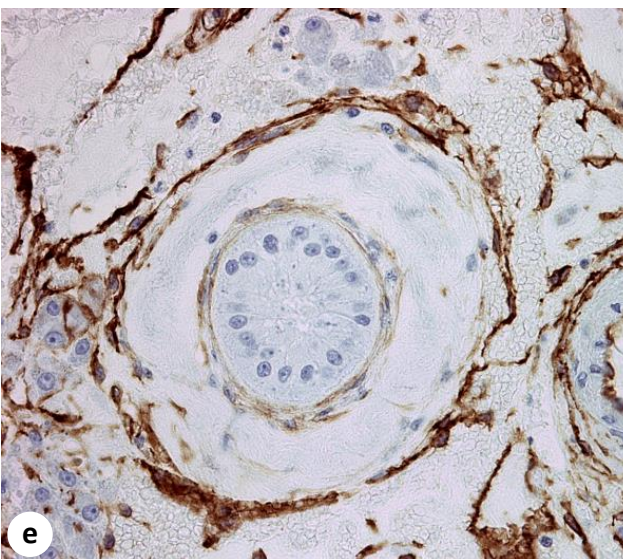
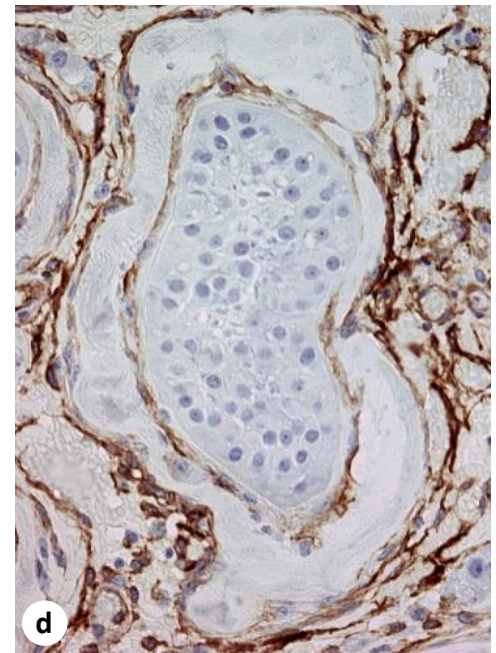
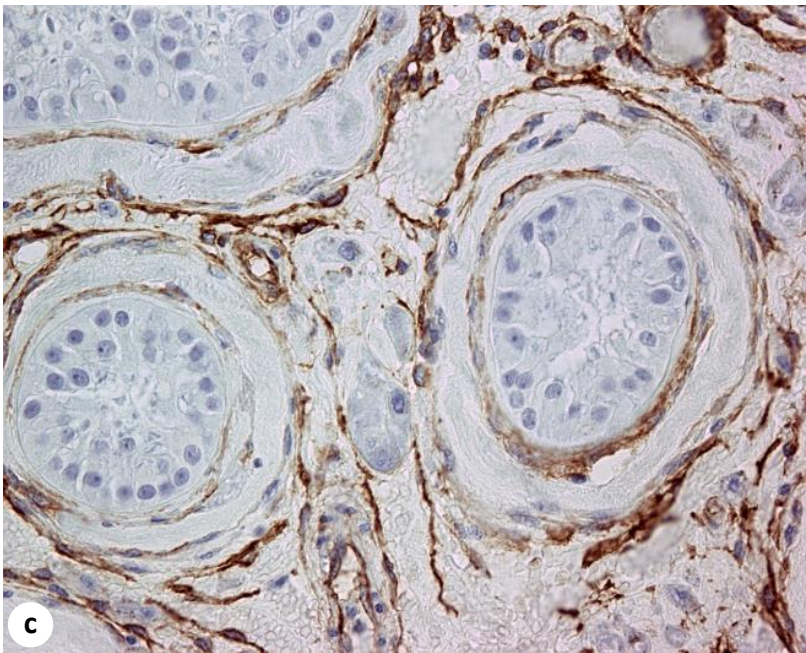
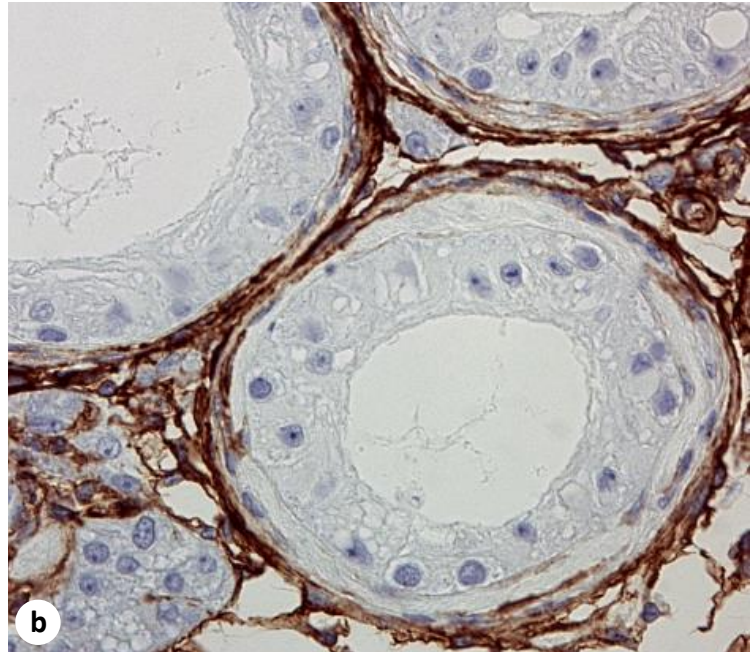
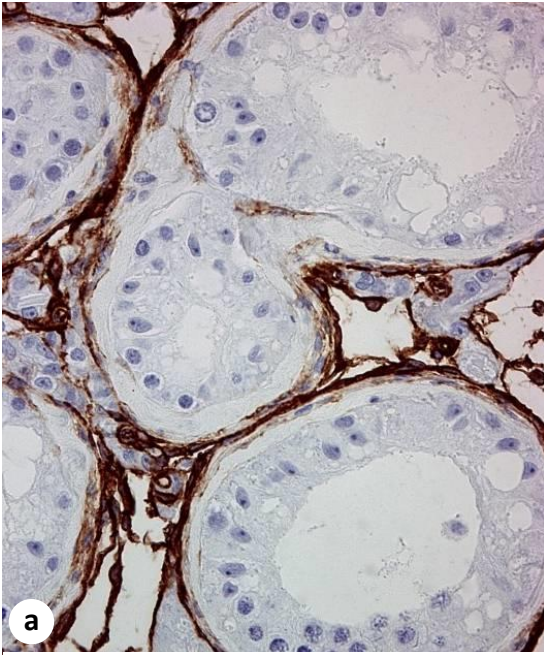


Fig. 17. Expresión de CD34 en la pared peritubular en relación con la migración intratubular de células de Leydig en el testículo criptorquídic postpuberal

- a) El tubo seminífero muestra una hialinización muy extensa de la pared delimitada por una capa fina de células CD34+, que contrasta con las escasas células inmunomarcadas en el intersticio.
- b) La expresión de CD34 en la pared peritubular permite visualizar el inicio circunferencial concéntrico de células alrededor del material hialinizado.
- c) Tubo seminífero hialinizado, separado del intersticio por una pared circunferencial CD34+. En su íntima vecindad existe un nido de células de Leydig que se relacionan con una solución de continuidad del inmunomarcaje de células CD34. En el interior del tubo, adosadas a las células de Sertoli, se ven células de Leydig microvacuoladas.
- d) Tubo con patrón de sólo células de Sertoli disgenéticas, hialinización peritubular y presencia de células de Leydig peritubulares atrapadas entre las células CD34+.
- e) Las células de Leydig se introducen en la pared peritubular hialinizada, y quedan rodeadas por células CD34+.
- f) Tubo atrófico con células de Sertoli microvacuoladas y células de Leydig peritubulares atrapadas entre dos capas de células CD34+.
- g) Tubo esclerosado rodeado por un anillo de células de Leydig microvacuoladas. Externamente, el tubo queda delimitado por una capa de células CD34+.
- h) Las células de Leydig intratubulares microvacuoladas muestran signos de degeneración y están en contacto con el material hialino de la pared de un tubo esclerosado, delimitado por una capa de células CD34+.
- i) Esclerosis completa de los tubos seminíferos con escasas células peritubulares e intratubulares CD34+. En el tubo superior, su pared peritubular contiene células de Leydig microvacuoladas.

Criptorquidia: Células CD34 + en Pared Peritubular

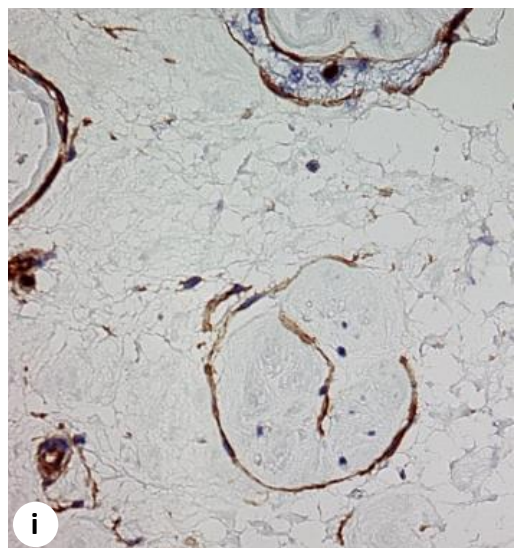
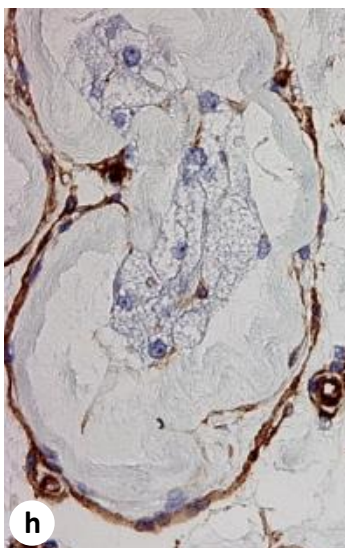
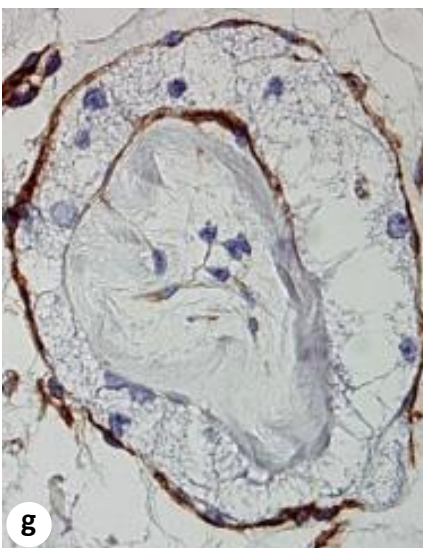
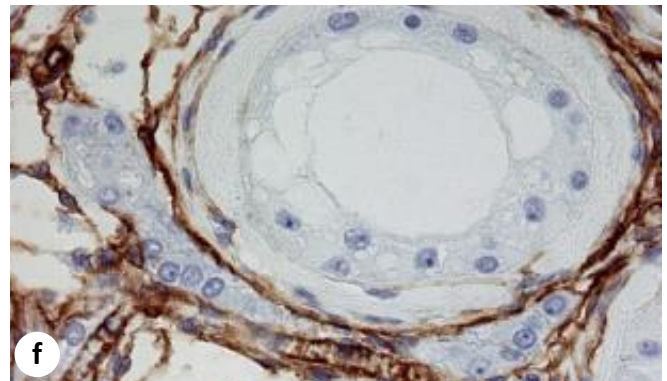
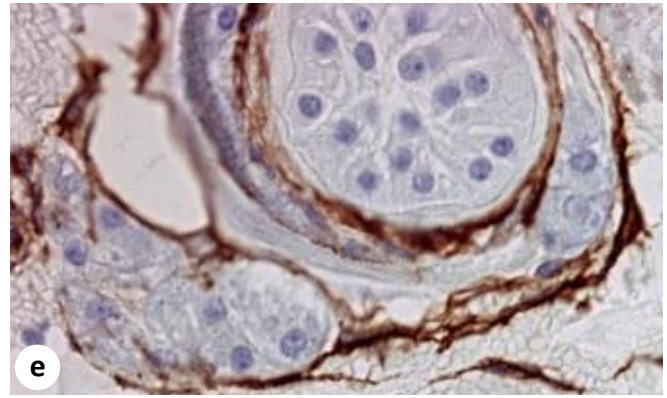
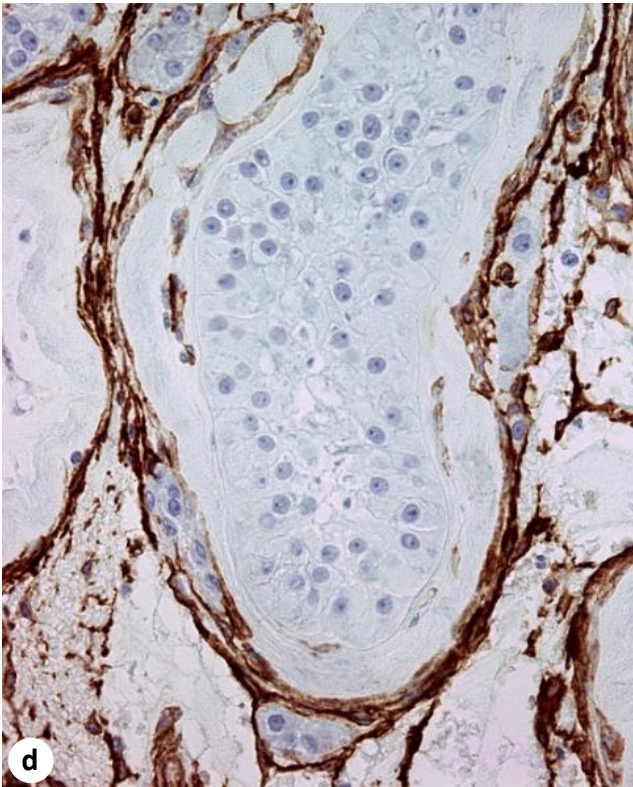
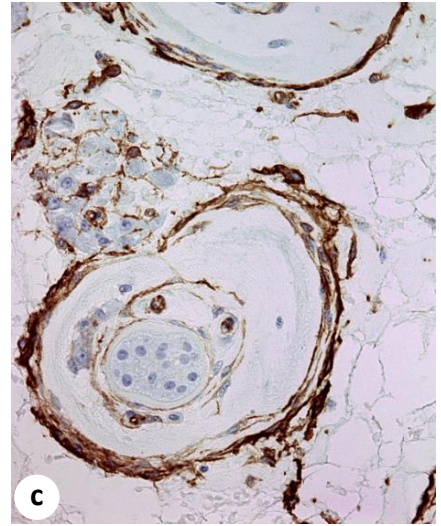
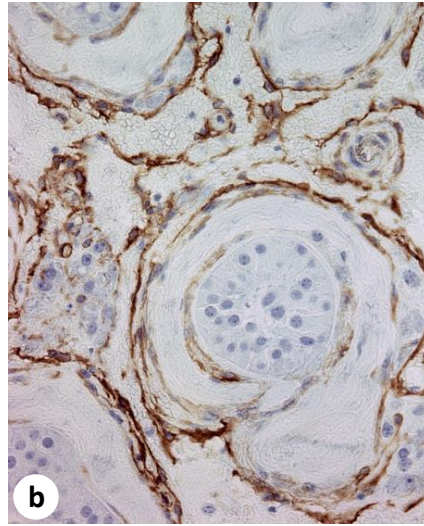
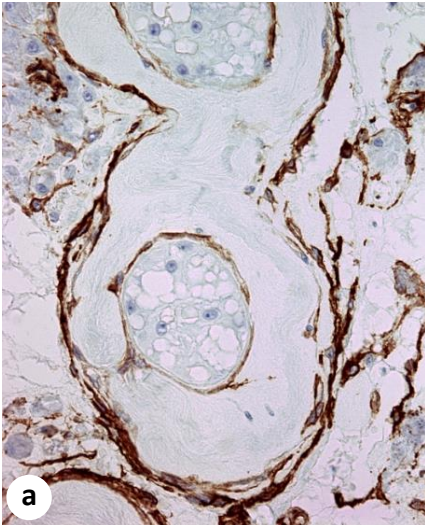


Fig. 18. Expresión de CD34 en relación con fibrosis intersticial en el testículo criptorquídico postpuberal

- a) Tubos disgenéticos con hialinización peritubular y pseudohiperplasia de células de Leydig, separadas por escasas células CD34+.
- b) Intersticio que contiene varios nódulos de células de Leydig, rodeados de células CD34+.
- c) Los tubos están esclerosados y con escasas células CD34+ entre las células de Leydig.
- d) Extensa hiperplasia pseudoadenomatosa de células de Leydig, rodeada por una capa de células CD34+. En el interior del nódulo se visualizan aisladas células CD34+ asociadas en algunos casos, a pequeños vasos sanguíneos.
- e) Detalle de la porción superior de la pared tubular con escasas células CD34+.
- f) Detalle de la porción inferior de la imagen anterior, en la que se observa un revestimiento continuo de células CD34+.
- g) En el interior de nódulo de células de Leydig existe una evidente angiogénesis, con finas y escasas prolongaciones de células CD34+.
- h) Tubos de pequeño diámetro con sólo células de Sertoli y con moderada fibrosis y presencia de células CD34+.
- i) Tubo seminífero con pared intensamente hialinizada, delimitado por dos finas laminas circunferenciales de células CD34+. En el intersticio se ven abundantes células de Leydig separadas por células CD34+.
- j) La matriz extracelular es abundante y queda delimitada múltiples células CD34+.
- k) En otra área del mismo caso, las células CD34+ rodean a pequeños nidos de células de Leydig.
- l) Intersticio con abundantes células CD34+.
- m) Abundante fibrosis intersticial que enmascara las células CD34+.

Criptorquidia: Células CD34 + en Intersticio

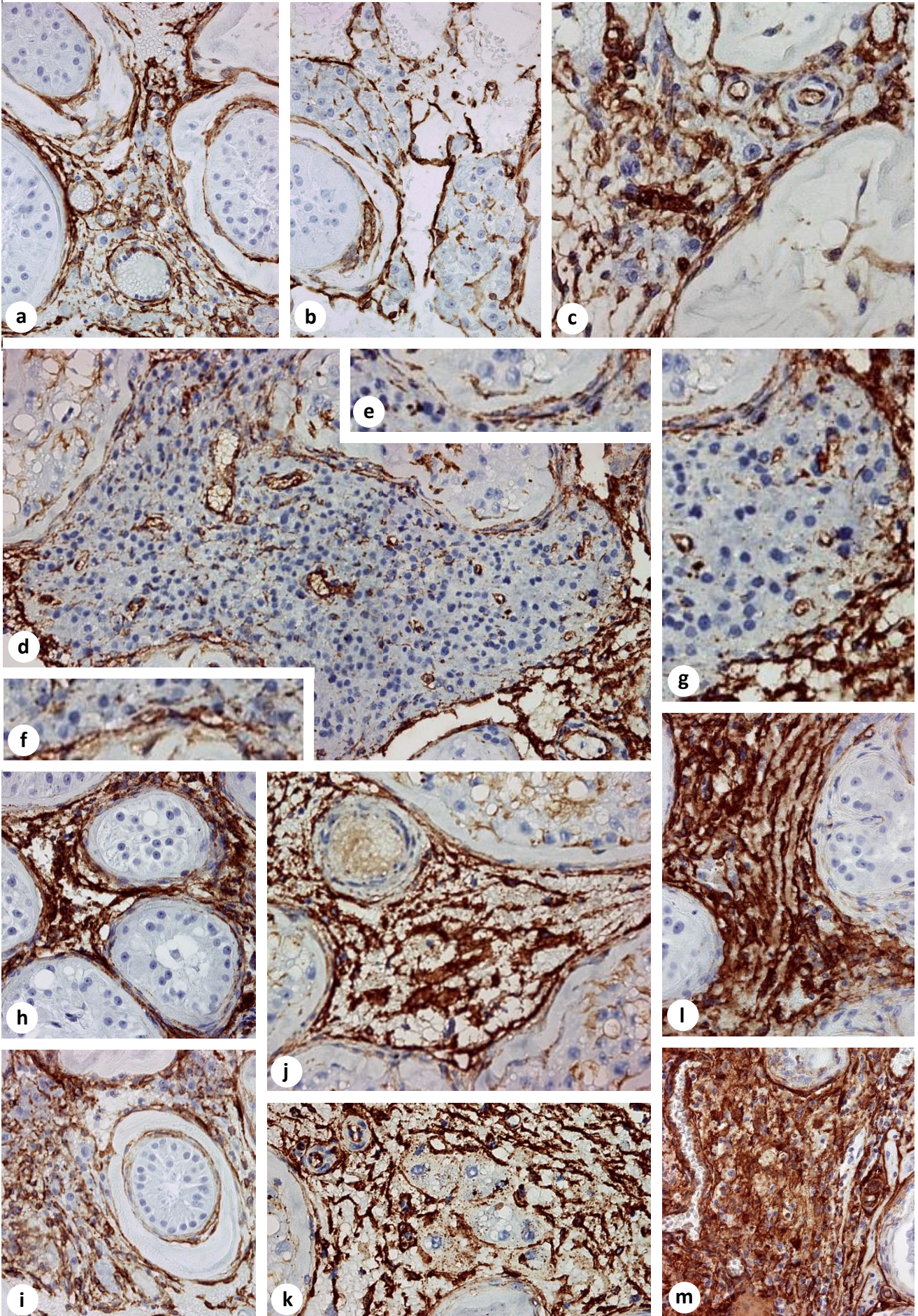


Fig. 19. Expresión de CD34 en relación con las células de Sertoli disgenéticas

- a) Tubos seminíferos con retraso de la maduración formados por células de Sertoli de núcleo esférico. En la pared peritubular existe una capa de células CD34+. En el intersticio predomina la matriz extracelular, en la que se ven algunas células CD34+.
- b) Los tubos seminíferos con sólo células de Sertoli de núcleo esférico y están delimitados por una pared de células CD34+. En el intersticio, las células inmunomarcadas son escasas.
- c) Tubo disgenético de contorno muy irregular, asociado a otros tubos de pequeño diámetro. Se ve marcaje circunferencial de células CD34+ en la pared peritubular y aisladas células inmunomarcadas, en el intersticio.
- d) En la vecindad de un tubo con diferenciación postpuberal y patrón de sólo células de Sertoli disgenéticas y fibrosis peritubular, se disponen nódulos de tubos de tipo infantil, muy irregulares, constituidos exclusivamente por células de Sertoli con núcleo elongado. La pared peritubular está hialinizada y externamente delimitada por una capa discontinua de células CD34+. También se ven en el intersticio prolongaciones celulares inmunomarcadas que rodean a pequeños nidos de células de Leydig.
- e) Nódulo de células de Sertoli disgenéticas. Los tubos seminíferos están íntimamente adosados entre sí y separados por una fina pared intertubular con expresión mínima o ausente de CD34+. Delimitando al nódulo se observa una banda de células CD34+.
- f) Área central de un nódulo de células de Sertoli formado por tubos anulares disgenéticos. Destaca la ausencia de células CD34+ en la pared peritubular, lo que contrasta con la intensa inmunotinción en la pared capilar.

Criptorquidia con Células de Sertoli Disgenéticas : Células CD34 +

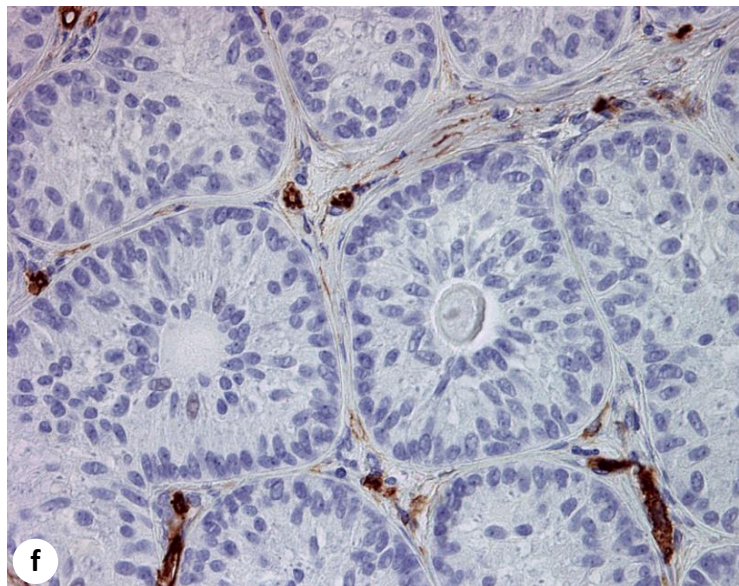
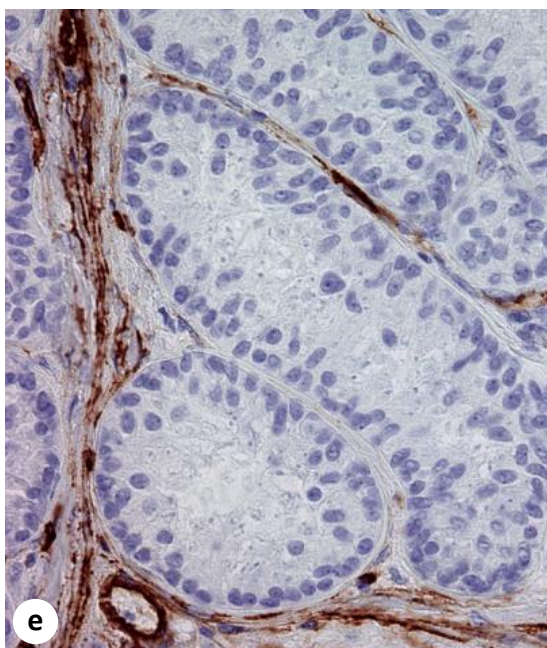
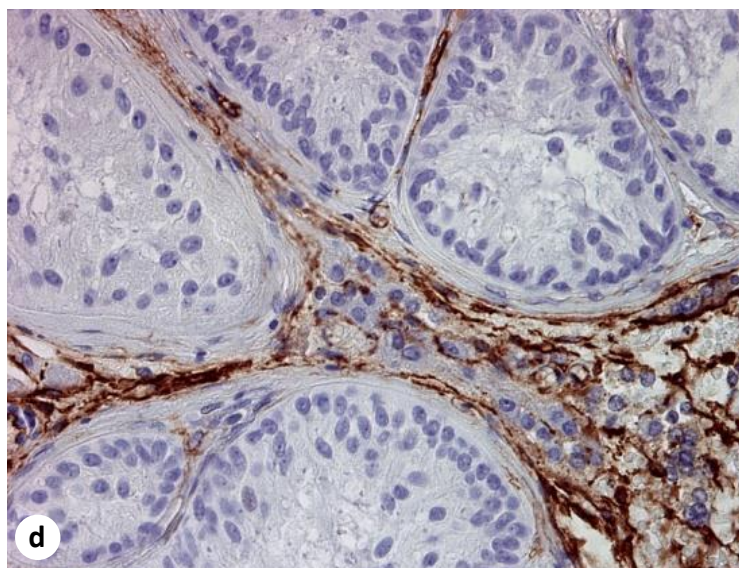
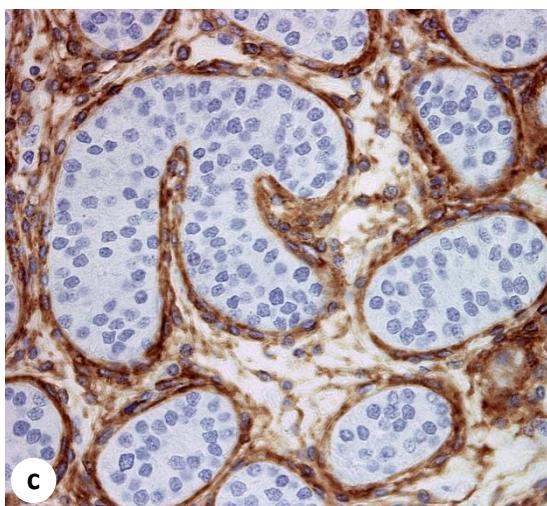
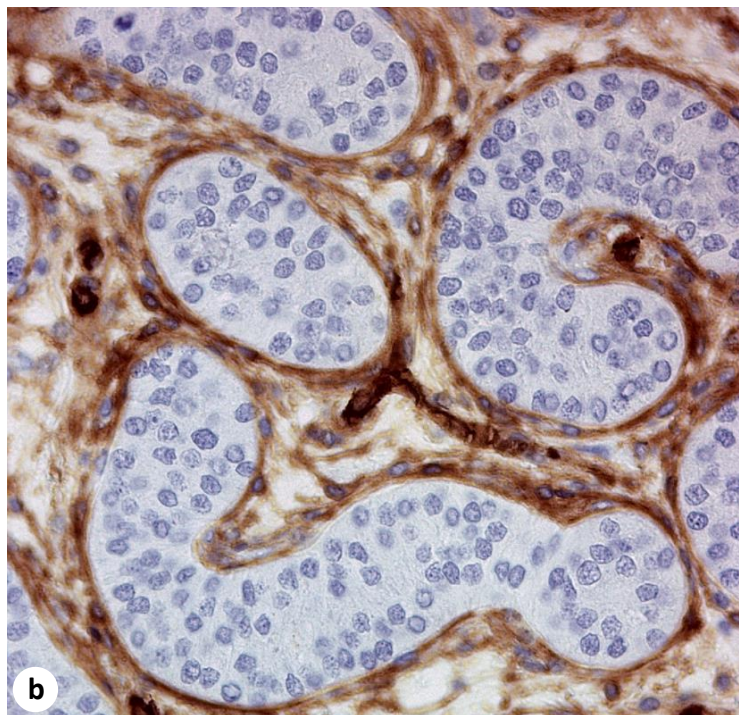
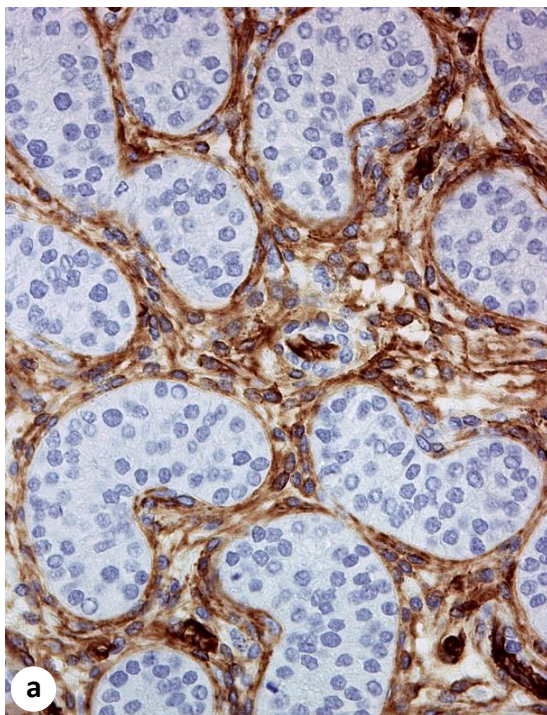


Fig. 20. Expresión de CD68 en los macrófagos de testículos criptorquídicos postpuberales

- a) Tubos seminíferos que muestran sólo células de Sertoli. El intersticio testicular está aumentado y contiene abundantes macrófagos CD68+.
- b) Tubos con sólo células de Sertoli, con múltiples macrófagos CD68+ localizados en la vecindad de la pared peritubular.
- c) Tubo seminífero con importante vacuolización de las células de Sertoli. Se observa engrosamiento de la pared y un macrófago CD68+ en el intersticio.
- d) Tubo seminífero esclerosado en el que se observa un macrófago intensamente marcado con el anticuerpo anti-CD68, localizado en la pared peritubular.
- e) Tubos esclerosados mostrando en su interior macrófagos CD68+. En el intersticio se aprecia una pseudohiperplasia de células de Leydig.
- f) Tubos con sólo células de Sertoli. En el intersticio se observan múltiples células CD68+.
- g) Nódulo de células de Leydig en cuyo interior se identifican múltiples macrófagos CD68+.
- h) Tubos con esclerosis tubular completa y fibrosis intersticial, con aislados macrófagos CD68+.
- i) Detalle de un tubo seminífero esclerosado. En su interior se visualiza un macrófago, con amplio citoplasma e intenso inmunomarcaje con el anticuerpo anti-CD68.
- j) Se observan múltiples macrófagos CD68+ en el interior de un tubo completamente esclerosado. El intersticio presenta moderado edema.

Criptorquidia: Macrófagos CD68+

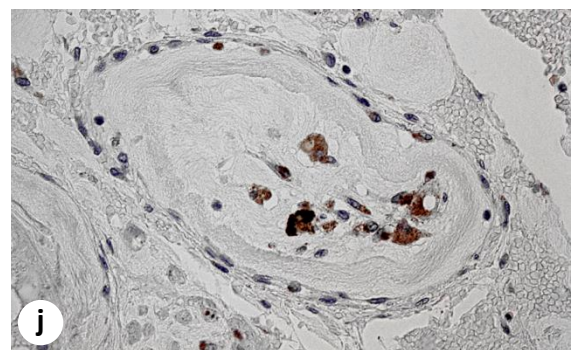
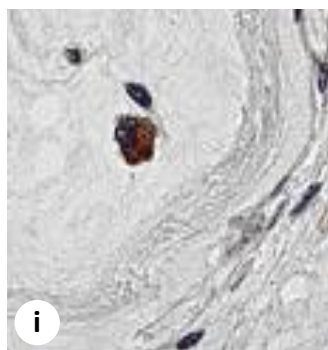
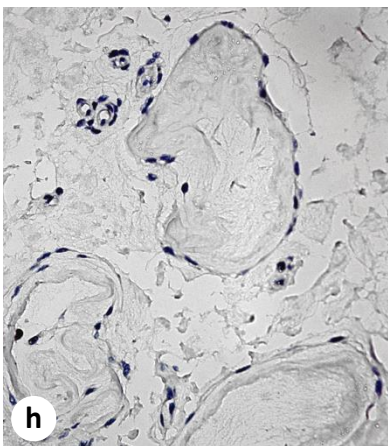
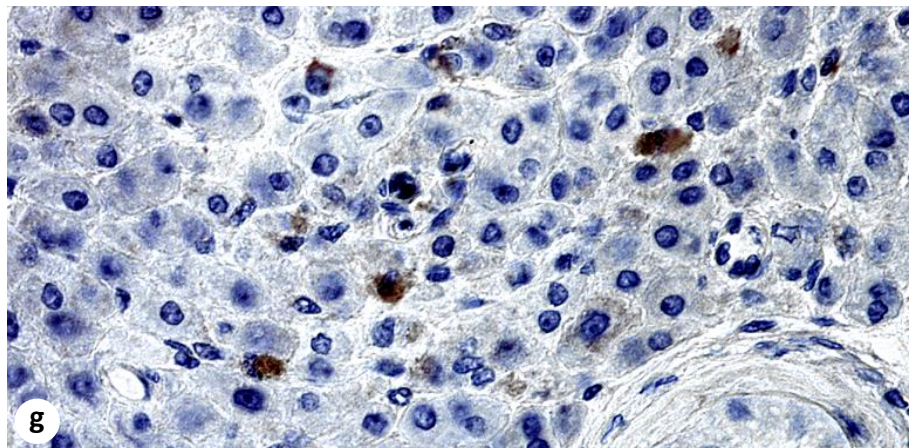
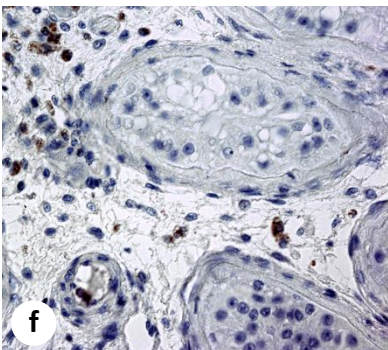
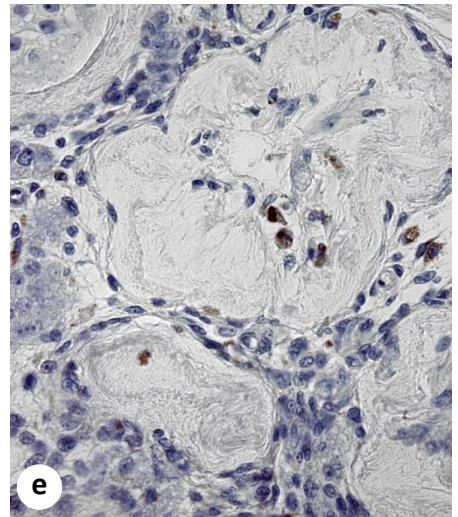
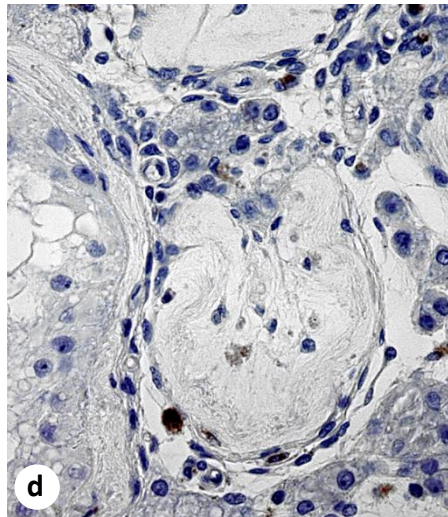
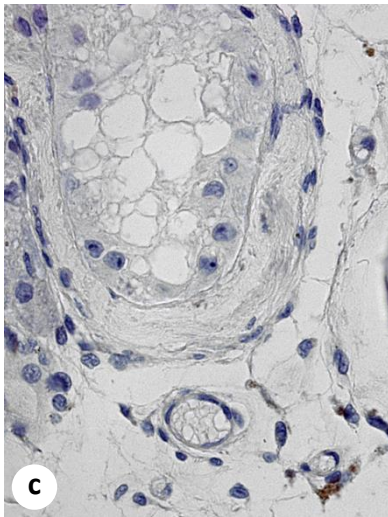
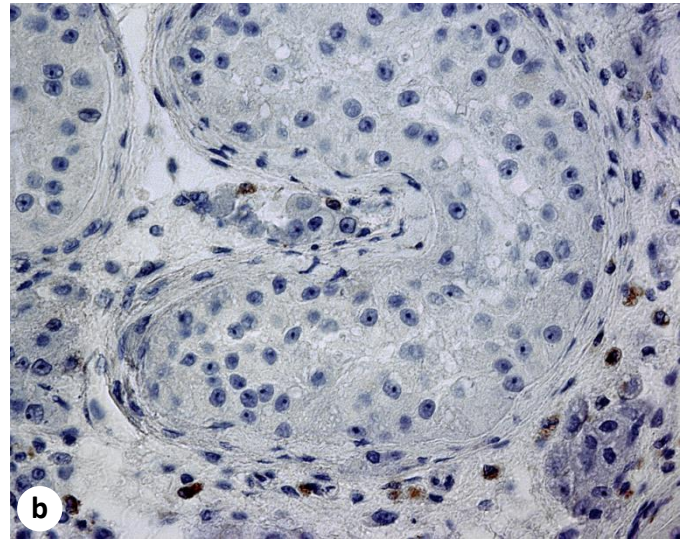
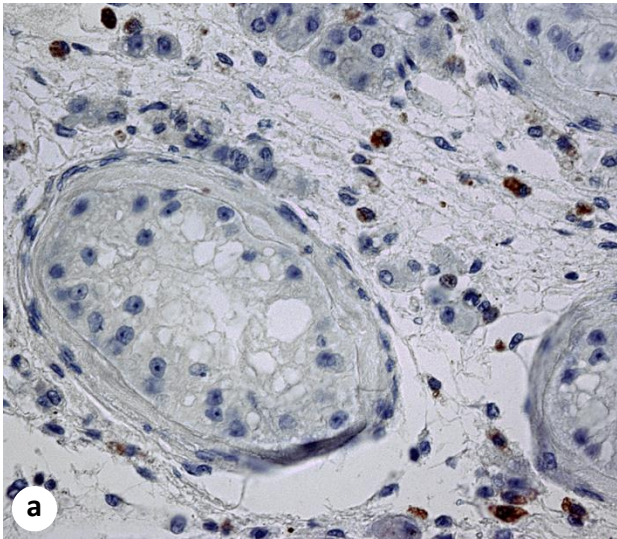


Fig. 21. Expresión de triptasa en las células cebadas en la pared peritubular de testículos criptorquídicos postpuberales

- a) Tubos con células de Sertoli, vacuoladas. Se observan células triptasa+, tanto en la pared peritubular como en el espacio intersticial.
- b) Tubo seminífero con sólo células de Sertoli vacuoladas. Se ven varias células cebadas triptasa+, dispuestas en la vecindad de la pared peritubular y una dentro del tubo.
- c) Tubos seminíferos con sólo células de Sertoli con células disgenéticas. En el intersticio se ven tres células cebadas triptasa+, localizadas en la periferia de un grupo de células de Leydig.
- d) Se observa un tubo seminífero con sólo células de Sertoli disgenéticas y una extensa hialinización peritubular. El intersticio está ampliado, edematoso, y contiene células de Leydig y varias células cebadas triptasa+, entre las que sobresale una de gran tamaño e intenso inmunomarcaje, situada cerca del nido de células de Leydig.
- e) El intersticio está muy ampliado y edematoso. Los tubos seminíferos presentan sólo células de Sertoli, con núcleos esféricos (disgenéticos). En la pared peritubular engrosada se encuentran varias células cebadas triptasa+.
- f) Tubos con sólo células de Sertoli vacuoladas. Se localizan múltiples células cebadas, con signos de degranulación, que infiltran una gruesa pared peritubular.
- g) La pared peritubular está hialinizada y contiene células cebadas. Se observa pseudohiperplasia de células de Leydig pequeño tamaño.

Criptorquidia: Células Cebadas Triptasa + en Pared Peritubular

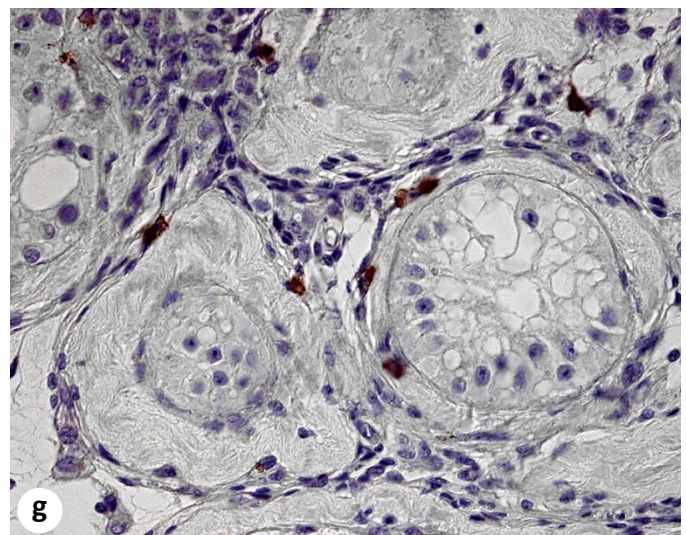
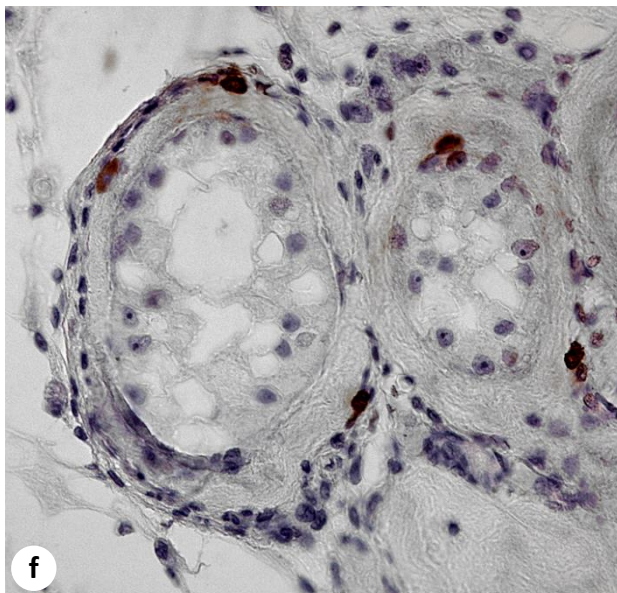
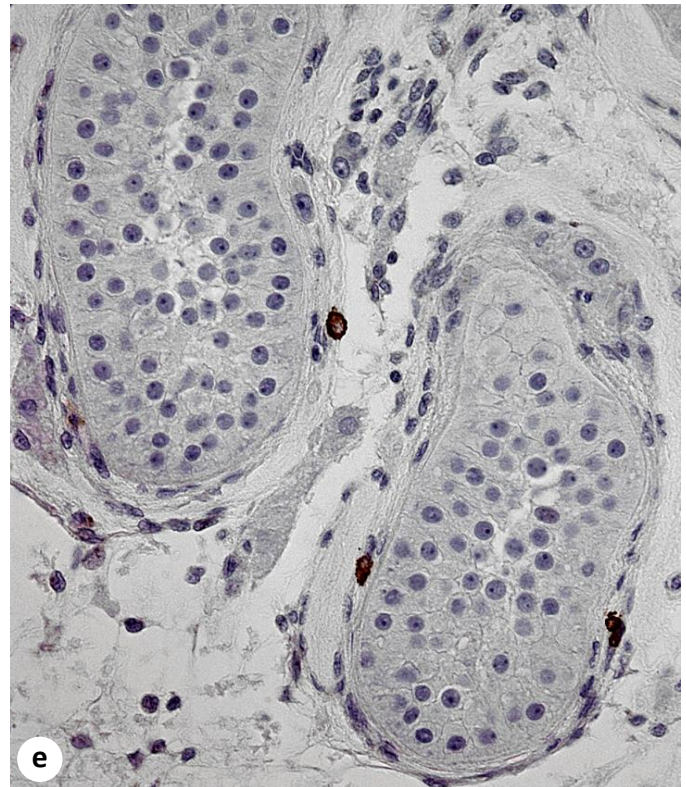
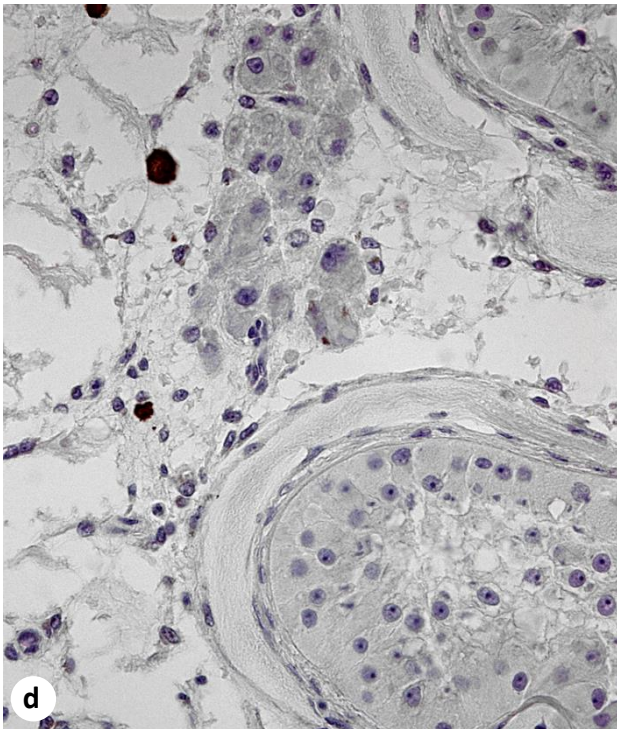
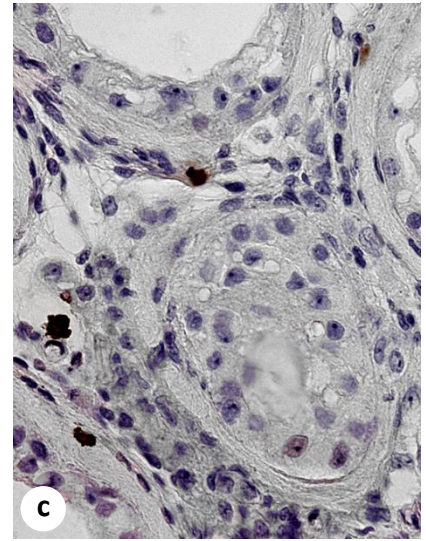
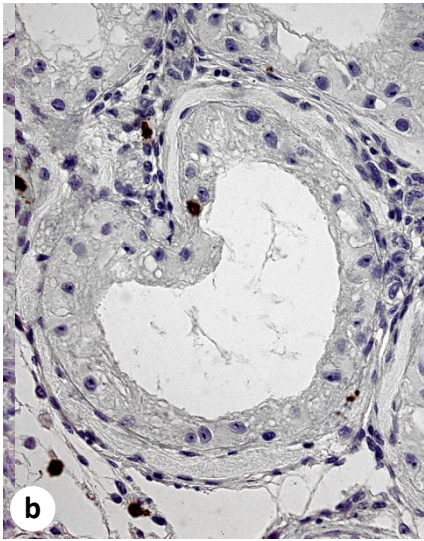
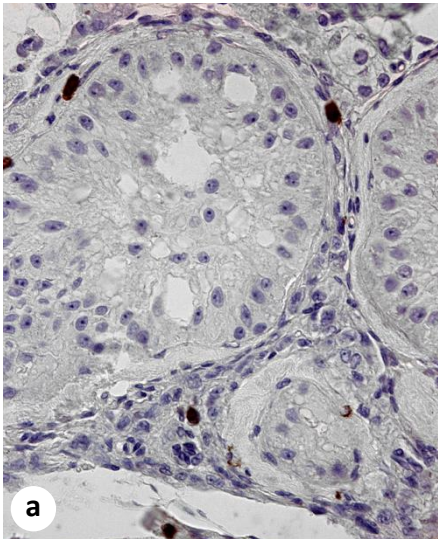
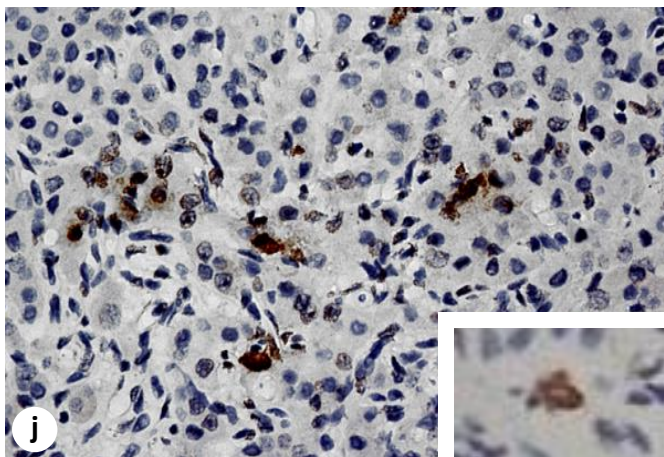
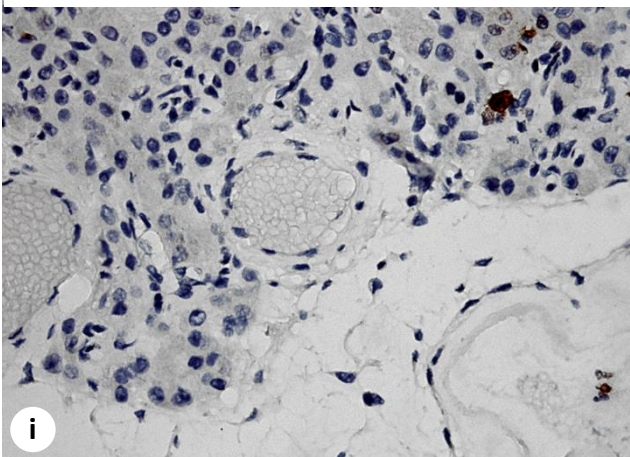
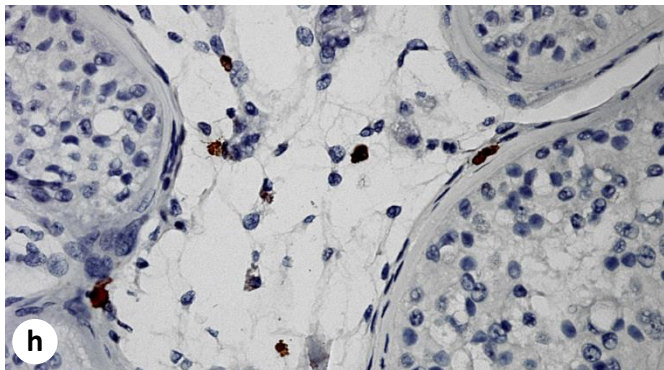
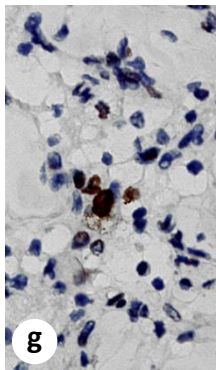
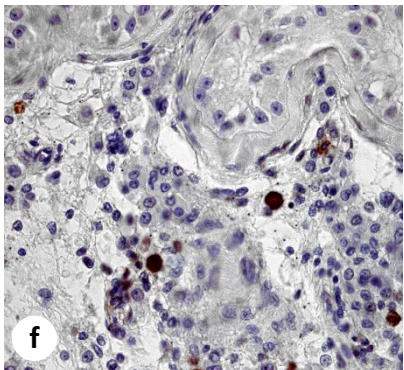
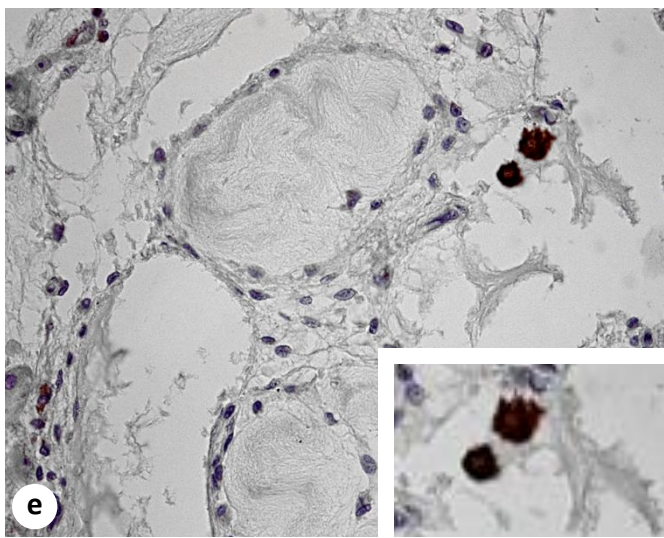
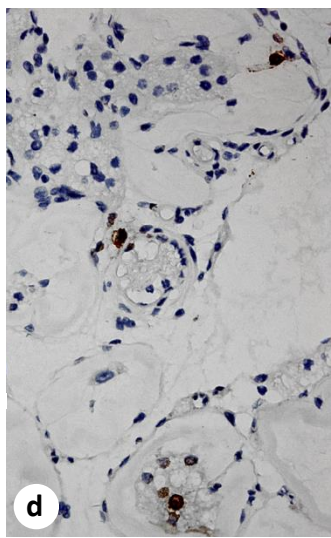
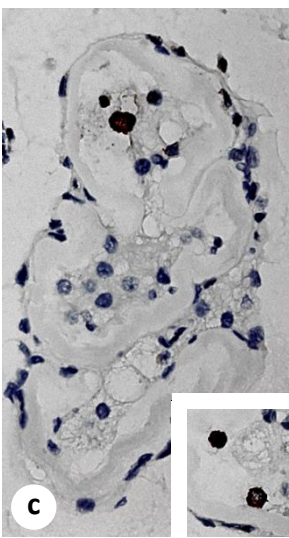
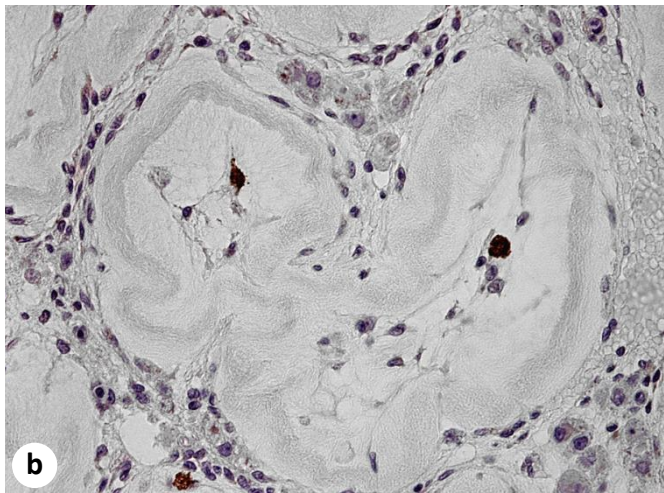
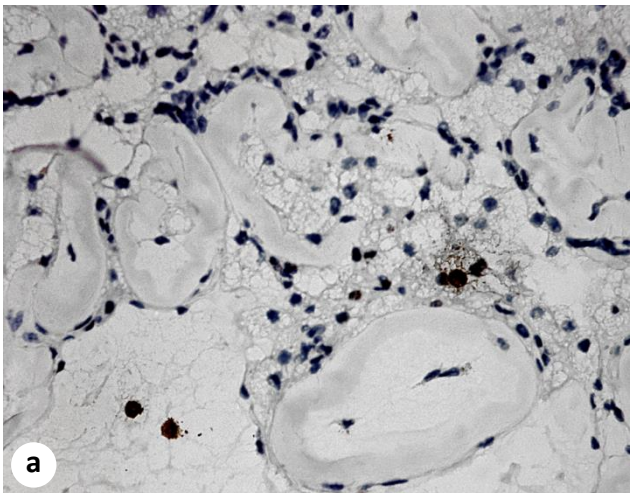


Fig. 22. Expresión de triptasa en las células cebadas de testículos criptorquídicos postpuberales

- a) Esclerosis tubular intensa. Aumento del espacio intersticial que contiene varias células cebadas triptasa+.
- b) Esclerosis tubular intensa. Se observan varias células cebadas con intenso inmunomarcaje de triptasa, en el interior de un tubo seminífero.
- c) En el interior del tubo esclerosado, se observa migración de células de Leydig y también una célula cebada intensamente inmunomarcada. **Inset:** Dos pequeñas células cebadas inmunomarcadas en la pared tubular esclerosada.
- d) Fibrosis tubular completa, asociada a escasas células cebadas.
- e) El intersticio que rodea a los tubos esclerosados presenta edema en el que se identifican dos células cebadas. **Inset:** El inmunomarcaje con anticuerpo antitriptasa permite distinguir células cebadas en proceso de degranulación.
- f) Se ven varias células cebadas dispuestas en la vecindad de pequeños nódulos de células de Leydig.
- g) Una célula cebada está en íntimo contacto con células de Leydig microvacuoladas.
- h) Tubos seminíferos con sólo células de Sertoli. El intersticio está ampliado y edematoso, y contiene células cebadas y escasas células de Leydig atróficas.
- i) Hiperplasia nodular de células de Leydig, en cuyo interior se identifica una célula cebada triptasa+.
- j) Centro de un gran nódulo adenomatoso de células de Leydig, con múltiples células cebadas. **Inset:** La célula cebada del nódulo presenta signos de degranulación.

Criptorquidia: Células Cebadas Triptasa +



Evaluación de inmunotinción CD34+.

Las células más abundantes del tejido conjuntivo intersticial testicular son los fibroblastos y se marcan inmunohistoquímicamente con la glicoproteína CD34. Evaluamos la relación entre el área inmunomarcada con CD34 con respecto al área total intersticial. La expresión de CD34 en el intersticio testicular es significativamente mayor ($p < 0,01$) en los pacientes con hepatopatía crónica comparados con los controles y con los testículos criptorquídicos. (Tabla 7 y Fig. 23).

Tabla 7. Superficie intersticial y tubular positiva para inmunotinción con CD34. Se muestran los promedios de cada grupo.

Grupo	CD34+ Intersticial (μm^2) \pm DE	CD34+ Pared tubular (μm^2) \pm DE
Control	7.442 \pm 2.249	5.478 \pm 619
Insuficiencia Hepática Crónica	13.692 \pm 10.775**	7.308 \pm 660
Criptorquidia	5.470 \pm 3.444	5.804 \pm 353

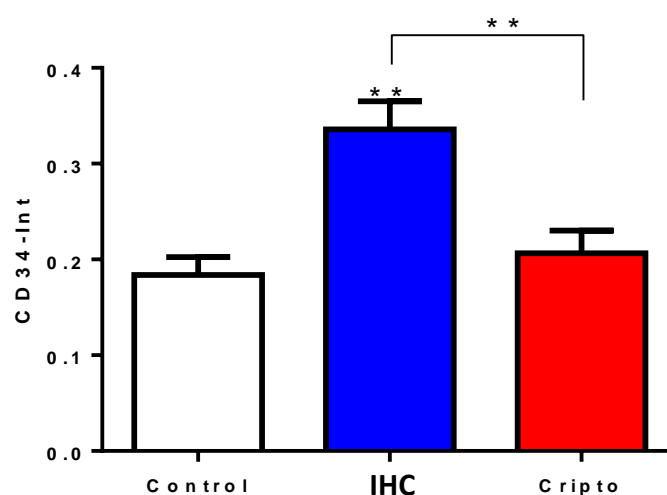


Figura 23. Relación entre área con inmunotinción CD34+ intersticial con respecto al área del intersticio testicular. **: $p < 0,01$.

Al igual que lo observado a nivel intersticial testicular, la expresión de CD34 en la pared de los tubos seminíferos en relación con el área tubular total, es significativamente mayor ($p > 0,01$) en los pacientes con IHC comparados con los controles y con los testículos criptorquídicos. (Tabla 7 y Fig 24).

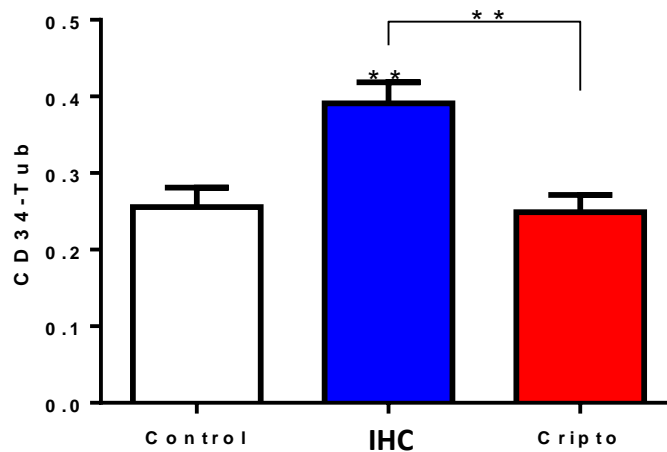


Figura 24. Relación entre área con inmunotinción CD34+ tubular con respecto al área tubular testicular. **: $p < 0,01$

Si tomamos en cuenta el promedio del valor absoluto del área intersticial ocupada por la inmunotinción con CD34 podemos observar que el área CD34+ es mayor en el grupo de hepatopatía crónica, y es una diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos. En cambio, al observar el promedio del área absoluta tubular, vemos que el grupo de IHC es mayor que el de los otros grupos, pero no estadísticamente significativa. (Tabla 7)

Cuantificación de macrófagos CD68 +.

La inmunotinción con CD68 marca a los macrófagos presentes. Se observa que tanto en los casos control como en los testículos criptorquídicos la presencia de macrófagos es mínima, mientras que los testículos de pacientes con hepatopatía crónica muestran un conteo muy elevado, con una significancia muy alta ($p < 0,001$) con respecto a los otros dos grupos. (Tabla 8 y Fig. 25)

Tabla 8. Cuantificación de macrófagos CD68+ y de células cebadas triptasa+. Se muestran los promedios de cada grupo.

Grupo	Nº de macrófagos CD68+ ±DE	Nº de células cebadas triptasa+ ±DE
Control	1,26 ± 0,27	1,19 ± 0,15
Insuficiencia Hepática crónica	18,69 ± 2,36***	3,82 ± 0,36***
Criptorquidia	1,92 ± 0,45	4,16 ± 0,58***

Nº: Número de células promedio. ***: $p < 0,001$.

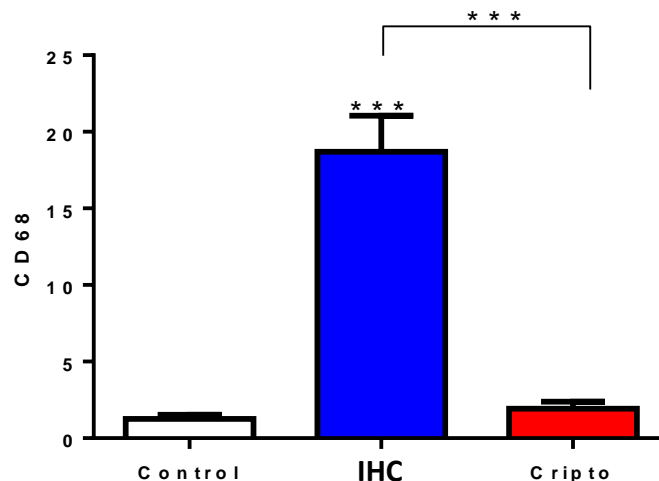


Figura 25. Cuantificación de células CD68+. ***: $p < 0,001$.

Cuantificación de células cebadas triptasa +.

La inmunotinción con triptasa identifica a las células cebadas presentes en el parénquima testicular. Estas células se encuentran significativamente aumentadas tanto en el grupo con hepatopatía crónica como en el grupo con criptorquidia, en comparación con el grupo control, con un alto nivel de significancia ($p < 0,001$). (Tabla 8 y Fig. 26).

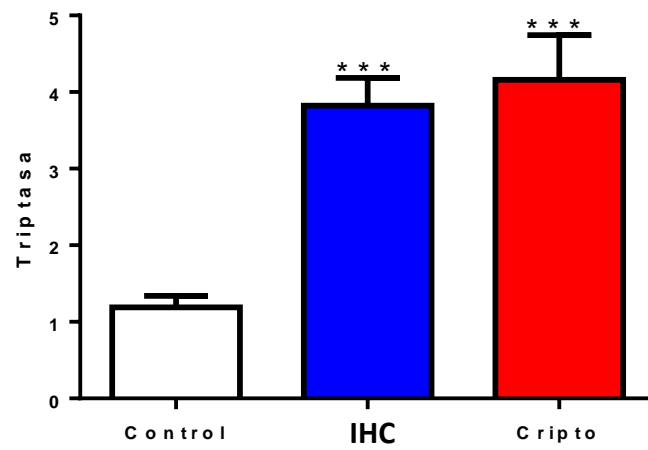


Figura 26. Cuantificación de células triptasa positivo.***: $p < 0,001$.

En el presente trabajo nos hemos propuesto estudiar los cambios en el intersticio testicular y en la pared peritubular en pacientes con IHC y en pacientes criptorquídicos, cuyo testículo fue extirpado después de la pubertad. Si bien ambas patologías son, en principio, muy distintas entre sí, dado que, respectivamente, una es adquirida y la otra congénita, las dos entidades determinan hipogonadismo y lesiones de atrofia progresiva de los tubos seminíferos.

Además, ambas patologías presentan un factor común relevante como es el incremento de estrógenos circulantes, los cuales también producen daño testicular. En efecto, modelos experimentales han descrito alteraciones histológicas testiculares, cuando la exposición estrogénica ocurre durante el período fetal.^{232,247} De otra parte, la IHC está asociada con importantes manifestaciones de hipogonadismo, incluyendo infertilidad, hipoespermatogénesis, atrofia testicular, ginecomastia, disminución del vello corporal y disfunción de la libido.²⁶⁹ De hecho, en muchos casos durante las fases más avanzadas de la IHC se ha encontrado, como denominador común, el aumento de la acción estrogénica, la cual actúa en competición con la actividad androgénica testicular;²⁶⁹ sin duda, esta alteración del equilibrio andrógenos/estrógenos pudiera determinar cambios evidentes en la estructura testicular, tal como se ha planteado investigar en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

En la criptorquidia, el daño testicular, además de estar determinado, en parte, por la exposición del testículo a altas temperaturas, realmente las lesiones son secundarias a una etiología más compleja, que comienza desde los primeros momentos del desarrollo fetal. Desde los trabajos de Skakkebaek,^{232,233} se considera que la criptorquidia es una manifestación del SDT, y respecto a su etiología se ha identificado un aumento de la acción estrogénica endógena. Así mismo, en la actualidad también se ha considerado, como muy verosímil, la hipótesis que aboga por la participación de un incremento de los disruptores endocrinos ambientales en la disregulación endocrina testicular. En las últimas décadas se ha sugerido que los estrógenos tienen una evidente relevancia en el control endocrino y paracrino a nivel testicular, y también se han relacionado con procesos de migración celular y fibrosis testicular.^{269,270}

La secreción sincronizada de andrógenos regula los procesos de espermatogénesis. Para que esta función tan compleja pueda existir y mantenerse en el tiempo, es necesario que se establezcan mecanismos de regulación endocrina y paracrina muy delicados, desarrollándose fundamentalmente entre los tubos seminíferos y el intersticio testicular. En estos mecanismos regulatorios, las células dianas principales son las células de Sertoli y las células de Leydig; pero además también están involucrados la pared peritubular y al barrera hematotesticular.^{3,186,239}

Si bien el primer nivel de regulación endocrina está a cargo del eje hipotálamo-hipófiso-testicular, es muy importante considerar el nivel de regulación intratesticular, dado que las concentraciones de testosterona son completamente distintas de los niveles plasmáticos; por ello, la regulación paracrina, e incluso autocrina, es fundamental en la regulación de la función testicular.²⁶⁹ En este sentido, es evidente que algunos factores testiculares podrían ser mediadores de la acción hormonal y de la comunicación intra e intercelular.²⁷⁰ Sin embargo, es mucho menos conocida la interrelación entre los elementos del intersticio testicular entre sí, y su influencia en la espermatogénesis.^{3,186,239}

Por todos estos hechos, el presente trabajo se ha centrado, de una parte, en los cambios que ocurren en el intersticio testicular y en la pared peritubular en pacientes postpuberales con criptorquidia, como muestra de alteraciones testiculares por aumento de la acción estrogénica en el desarrollo prenatal, y, de otra, en pacientes adultos con IHC con enfermedad adquirida crónica, en la que las lesiones testiculares se relacionan, en parte, con una acción estrogénica.

Se han postulado múltiples mecanismos implicados en la patogénesis de la criptorquidia. La evidencia más reciente sugiere que un número importante de los casos de criptorquidia son el resultado de un déficit androgénico durante la vida fetal, sugiriéndose un exceso materno de estrógenos. La insuficiencia androgénica parece ser leve y transitoria.¹⁷³ El nivel elevado de estrógenos maternos podría causar disminución de la secreción fetal de FSH, lo que favorecería la disminución de la proliferación de las células de Sertoli, y también podría ocasionar un efecto inhibitorio de la producción de andrógenos por las células de Leydig.^{22,146}

En el presente estudio hemos incluido un grupo de pacientes criptorquídicos en los que el testículo se extirpó después de la pubertad (en la mayoría los casos los testículos se extirparon en la tercera década, media de edad: 29 años). El estudio histológico del testículo criptorquídico demostró una lesión de sólo células de Sertoli en el 80% de los casos, y una hiperplasia multinodular de células de Leydig en el 40%; además en todos los casos se encontraron diferente grado de hipoespermatogénesis. El estudio morfométrico del diámetro tubular reveló una disminución significativa en los testículos criptorquídicos con respecto al control.

En general, los hallazgos observados en las piezas de orquiectomía estudiadas, fundamentalmente las lesiones de tubos con sólo células de Sertoli, o la presencia de un patrón de atrofia mixta tubular coinciden con lo publicado en estudios previos.^{1,27,28,258} En algunos casos también hemos encontrado los característicos nódulos de células de Sertoli, adenomas de Pick, e hiperplasia adenomatosa de células de Leydig, así como la presencia de tubos malformados, y la presencia focal de cambios granulares en las células de Sertoli.^{1,27,28,258}

Todos los casos estudiados se han desarrollado en hombre adultos, bien masculinizados; además, en la historia clínica no hemos encontrado otras malformaciones asociadas distintas al mal descenso de uno de los testículos. Todos estos datos nos permiten sugerir que en estos casos la criptorquidia unilateral aparece como un defecto aislado de mal descenso testicular, aunque no se puede descartar completamente que forme parte de un SDT con escasas manifestaciones clínicas,^{232,233} dado que en el estudio histológico exhaustivo del tejido testicular no hemos encontrado una evidente microlitiasis, ni células de CIS, que, como bien es conocido desde los estudios tempranos de Skakkebaek,^{232,233} son lesiones que forman parte del SDT.

En la literatura existen datos que abogan por el desarrollo prenatal de las lesiones del testículo criptorquídico como consecuencia de factores genéticos, pero también en el desarrollo de las lesiones pueden influir factores ambientales, incluidos diferentes disruptores endocrinos que causarían una alteración en el cociente estrógenos/andrógenos.^{22,82,146,177,226} Se consideran como disruptores endocrinos diversas

sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal,¹¹³ los cuales pueden causar un desequilibrio en el balance de los estrógenos, los andrógenos, los progestágenos y las hormona tiroideas. En el varón, los disruptores hormonales podrían provocar alteraciones de la función reproductiva, incluidas la presencia de malformaciones en el tracto genitourinario, una mayor frecuencia de cáncer de testículo, así como alteraciones del seminograma y disminución de la fertilidad.¹⁸⁵ En este sentido, se han propuesto la acción deletérea de pesticidas policlorados en relación con las alteraciones del descenso del testículo y con el cáncer testicular. Además, en niños, la exposición prenatal a los ftalatos se correlacionó negativamente con los niveles de testosterona y la distancia anogenital, que es una medida del efecto antiandrogénico. De otra parte, los disruptores endocrinos posiblemente también estarían implicados, asociados a otros factores genéticos, en el desarrollo del SDT; pero además, también cabe la posibilidad de que ciertos polimorfismos genéticos específicos podrían potenciar el papel deletéreo de los factores ambientales sobre el aparato genital masculino.^{164,247} Todos estos datos corroboran la evidencia actual que aboga a favor de los efectos adversos de los disruptores hormonales ambientales sobre el desarrollo del tracto reproductivo masculino.¹⁴⁵

Respecto a la relación de hepatopatías con patología testicular, en la presente Tesis Doctoral se ha investigado también las lesiones testiculares en la IHC, dado que puede ser un buen modelo experimental natural de investigación del equilibrio de los niveles de andrógenos y de estrógenos circulantes en el hombre adulto. Estudios previos han publicado que la IHC está asociada con importantes manifestaciones de hipogonadismo, incluyendo infertilidad, hipoespermatogénesis, atrofia testicular.²⁶⁹ Por ello, en nuestro estudio de los pacientes con IHC se han investigado las lesiones generales de los tubos seminíferos; pero además se ha efectuado una investigación mucho más pormenorizada de las alteraciones estructurales del intersticio testicular y de la pared peritubular.

En nuestro trabajo hemos evaluado los testículos provenientes de la autopsia de 17 pacientes con IHC, con una edad promedio de 51 años. De la revisión de la historia clínica se desprende que un 35% de los pacientes presentaba hepatitis vírica y que el 41% habían desarrollado una cirrosis; sin embargo, el antecedente de alcoholismo sólo se constató en dos casos. En presente serie de pacientes con IHC hemos observado una espermatogénesis

completa sólo en el 35% de los casos, y en el resto de los casos se vieron diferentes lesiones tubulares, incluyendo hipoespermatogénesis, que fue evidente en el 23% de los casos, parada de la maduración de las espermatogonias, la cual se vio en el 23%, e hialinización tubular que se encontró en el 47% de los casos con IHC. En nuestro estudio, independientemente de la causa de IHC, el diámetro tubular medio fue de 144,5 μm , presentando una disminución significativa con respecto al promedio del diámetro del grupo control.

Todos estos datos indican lesiones testiculares muy importantes en los pacientes con IHC, las cuales muy probablemente sean la consecuencia del efecto deletéreo desencadenado por las evidentes alteraciones hormonales presentes en las hepatopatías crónicas. En este sentido, se sabe que el hígado juega un papel fundamental en el metabolismo, detoxificación y excreción de los esteroides sexuales, y que la IHC daña el eje hipotálamo-hipófiso-testicular. El desarrollo de hipogonadismo es frecuente en la fase final de la enfermedad hepática crónica severa, tanto en la secundaria al alcoholismo crónico, como también los casos de enfermedad hepática no alcohólica, y en los pacientes con hemocromatosis.¹⁷³

En los pacientes con IHC, la producción de testosterona está disminuida, lo que conlleva niveles circulantes más bajos, a pesar del aumento concomitante de los niveles circulantes de la SHBG;¹⁴⁴ estos mecanismos determinan una disminución en la velocidad de eliminación renal de testosterona, lo que puede enmascarar la severidad de la deficiencia androgénica en las primeras etapas de la IHC. Estos cambios funcionales de la regulación de la testosterona, no se pueden relacionar con cambios morfológicos, al menos en nuestro material, de las células de Leydig, dado que su distribución peritubular e intersticial no muestra alteraciones morfológicas evidentes, las cuales sí han sido muy relevantes en los casos de criptorquidia postpuberal, tal como ha sido publicado previamente.²⁰⁵ Cabe considerar que en la IHC los niveles de gonadotropinas permanecen por debajo o dentro del rango eugonadal, a pesar de la disminución de los niveles de testosterona observada en estos pacientes, asimismo es frecuente observar una disminución de la secreción pulsátil de LH. Todos estos datos permiten enfatizar la importancia de la disregulación hipotalámica en la patogénesis del hipogonadismo de los pacientes con IHC.²⁵⁵

En definitiva, tanto la IHC como la criptorquidia presentan en común, como se ha indicado previamente, un aumento de la acción estrogénica, que ocurre desde el período perinatal en los casos criptorquidia, y en el caso de las alteraciones hepáticas a partir de la vida adulta. El papel fisiológico de los estrógenos en el tracto reproductivo masculino ha sido debatido por mucho tiempo. Los testículos producen cantidades significativas de hormonas estrogénicas, vía aromatasa, y receptores estrogénicos (ERs) α y β que son expresados selectivamente en los diferentes tipos celulares testiculares.^{34,99,183}

En la presente Tesis, dado que en la criptorquidia postpuberal y en al IHC existe un aumento de estrógenos, se ha planteado el siguiente interrogante: ¿situaciones con una exposición a niveles estrogénicos elevados podrían producir cambios morfológicos semejantes en el intersticio testicular y en la pared peritubular?. Con el fin de responder a esta hipótesis, se ha evaluado pormenorizadamente la organización del tejido conjuntivo intersticial y peritubular, y, en concreto, se han cuantificado los fibroblastos CD34+, incluyendo la formación reticular integrada por sus prolongaciones celulares; y asimismo se ha cuantificado la presencia de macrófagos y de células cebadas en el tejido testicular, dado que estos dos tipos de células participan en la remodelación del tejido conjuntivo y en los procesos de inflamación y de fibrosis. Para evaluar estas alteraciones previamente se han estudiado la distribución de macrófagos, células cebadas y de células CD34+ en el testículo adulto normal (grupo control). En nuestro material del grupo control hemos observado que las células CD34+ tienen largas prolongaciones que rodean a las células de Leydig y a los escasos macrófagos y células cebadas del intersticio intertubular. En la pared peritubular de los tubos con espermatogénesis completa también se identifica una fina capa circunferencial concéntrica de células CD34+. Estos datos coinciden con los previamente publicados, en los que se describen células de morfología dendrítica que corresponden a células estromales CD34+, presentes en la túnica albugínea y alrededor y entre los tubos seminíferos, las cuales también forman una red que rodea a las células de Leydig.^{21,60,87,130,265}

La distribución de estas células CD34+ en el intersticio testicular y pared peritubular en los casos con criptorquidia y en los casos con IHC no ha sido descrita, por ello el CD34 es uno de los marcadores que se estudiaron sistemáticamente en nuestro trabajo. En testículos criptorquídicos postpuberales, los tubos seminíferos con patrón de sólo células de Sertoli

presentaron una capa de células CD34+ que delimita la pared peritubular, la cual tiene una matriz extracelular hialinizada; sin embargo, en aquellos tubos en los que aún se conserva alguna célula germinal, sólo se visualizó una capa circunferencial de fibras CD34+ en la parte exterior de la pared peritubular. Esta peculiar disposición contrasta con los hallazgos de la expresión de CD34 en la pared peritubular normal, en la que se objetiva la presencia de prolongaciones irregulares inmunomarcadas con CD34 que rodean a las células miodes de la pared peritubular que rodea a tubos normales con espermatogénesis completa. Descripciones similares han sido publicadas previamente.^{60,130}

Nuestros datos cuantitativos demuestran que la expresión de CD34 en el intersticio testicular es significativamente mayor ($p < 0,01$) en los pacientes con IHC, comparados con los controles y con los testículos criptorquídicos postpuberales. Así mismo, la expresión de CD34 en la pared de los tubos seminíferos es significativamente mayor ($p < 0,01$) en los pacientes con IHC, comparados con los controles y con los testículos criptorquídicos postpuberales. Se desencadenan mecanismos profibrogénicos en el testículo de pacientes con IHC. En este sentido, se sabe que los fibroblastos CD34+ participan en el recambio de la matriz extracelular, produciendo colágeno tipo I, III y V, y fibronectina, y contribuyen con la formación de la membrana basal con la secreción de laminina y colágeno tipo IV; además las células CD34+ contribuyen a modificar la producción de colágeno y de metaloproteinasas de la matriz extracelular.¹⁴⁹

En definitiva, los cambios de la distribución histológica de las células CD34+ y, sobre todo de sus prolongaciones, en la criptorquidia y en la IHC, con respecto al testículo normal, permiten sugerir que en los mecanismos de fibrosis intersticial y peritubular participa un incremento de las células CD34+, lo cual determinaría una progresiva e irreversible atrofia de los tubos seminíferos y una fibrosis del intersticio testicular.

En la regulación de estos mecanismos de incremento de las células CD34+ y de la superficie ocupada por este marcador, tanto en el intersticio como en la pared peritubular de los casos con criptorquidia postpuberal y con IHC podrían participar alteraciones en el número y capacidad funcional de los macrófagos y de las células cebadas testiculares. Las prolongaciones citoplasmáticas finas de las células estromales CD34+ están estrechamente

conectadas a la membrana celular de los macrófagos del estroma testicular y pueden jugar un papel en la vigilancia inmune, como se ha sugerido previamente para otros órganos.^{130,274,275} De hecho, los macrófagos pueden interactuar con los fibroblastos, a través de la producción de Interleukina-1, TNF- α , PDGF-AB, TGF α y β , VEGF β , prostaglandinas, y especies reactivas de oxígeno, favoreciendo su actividad, por lo que pueden jugar un papel muy importante en los procesos de fibrosis.¹⁴⁹

Se sabe que los macrófagos establecen una relación paracrina con las células de Leydig y que los macrófagos están alterados en diversas patologías testiculares que cursan con cambios funcionales de las células de Leydig y con alteraciones del equilibrio andrógenos/estrógenos. En el presente estudio, la cuantificación de macrófagos ha demostrado que los testículos de pacientes con IHC tienen un número de macrófagos muy elevado, con una significación estadística muy alta ($p < 0,001$) con respecto al grupo control; contrariamente, en el grupo de testículos criptorquídicos postpuberales no se observaron cambios en el promedio de macrófagos. Es posible que en los testículos de pacientes con IHC se encuentren presentes múltiples mediadores quimiotácticos que atraen a los macrófagos y perpetúan el proceso inflamatorio testicular. Ha sido descrito previamente por Frungieri *et al.*⁷³ diferentes grados de alteración de la espermatogénesis con relación al número de macrófagos CD68+ presentes en los testículos de pacientes infértiles. Se demostró que estos macrófagos expresaban los genes de la interleukina 1 y el factor de necrosis tumoral- α . En el síndrome de sólo células de Sertoli y en los casos de detención de la maduración de las células germinales, el número total de macrófagos se incrementó más del doble.

También en trabajos previos acerca de fibrosis intersticial testicular se ha descrito un incremento del número de células cebadas.⁷⁴ En los pacientes con atrofia mixta testicular se han observado cambios en el número de células cebadas testiculares y en su fenotipo, con respecto a la capacidad de expresar la ciclooxigenasa 2 y sintetizar prostaglandinas. Por tanto, las células cebadas pueden participar en mecanismos involucrados en la disfunción espermatogénica.²⁷¹

Está establecido que las células cebadas participan en mecanismos de fibrosis testicular, los cuales en el presente estudio ya han sido claramente demostrados con el incremento de

células CD34+. Nuestros datos morfométricos demuestran que la cuantificación de células cebadas triptasa+ está significativamente aumentada, tanto en el grupo con IHC como en el grupo con criptorquidia postpuberal, en comparación con el grupo control, con un alto nivel de significancia ($p < 0,001$). Se infiere que el aumento de la actividad de las células cebadas en estos casos podría relacionarse con los procesos de fibrosis intersticial presentes en estos dos grupos de patología testicular. Estos datos coinciden con múltiples publicaciones previas, en las que se ha demostrado que las células cebadas promueven la fibrosis, debido a la estimulación de la proliferación de fibroblastos y al depósito de colágeno.^{5,213}

Estudios *in vitro* en modelos humanos han demostrado que las proteasas de las células cebadas, quimasa y tripsina, inducen la proliferación de fibroblastos.^{5,213} Se ha descrito un aumento en la síntesis proteica y de colágeno, cuando los fibroblastos fueron expuestos a los productos de secreción de células cebadas, la histamina y la triptasa.⁷⁸ Otra forma en la que las células cebadas pueden influir en el desencadenamiento de mecanismos de fibrosis es a través de la activación de las metaloproteinasas de la matriz, que son dependientes de las células cebadas y de su producto, la quimasa.²⁴²

Los datos obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que es posible que el incremento de las células cebadas en el intersticio testicular, observado en ambos grupos de estudio -criptorquidia e IHC- participe en el aumento del proceso de fibrosis intersticial y peritubular, mientras que la mayor presencia de macrófagos y células CD34+ podrían contribuir con dicho proceso fibrogénico, predominantemente en los casos con IHC. Sin duda, esta fibrosis testicular podría determinar la perpetuación de importantes alteraciones paracrinas testiculares presentes en los testículos criptorquídicos; pero además, en la actividad fibrogénica presente en el intersticio testicular en los casos con IHC, además de los cambios paracrininos, pudiera participar mecanismos procesos inflamatorios crónicos que forman parte de los cuadros de IHC.

En el caso particular de los cambios testiculares presentes en los casos con IHC, podemos proponer el siguiente mecanismo patogénico, el cual puede explicar los resultados obtenidos en este grupo de pacientes: La mayor presencia de macrófagos en el tejido intersticial testicular pudiera determinar la interacción de factores de crecimiento,

especialmente Interleukina 1 y $\text{TNF-}\alpha$, con los fibroblastos CD34+ ;⁷³ subsecuentemente estos mecanismos afectarían a los procesos de regulación de esteroidogénesis en las células de Leydig; estimulándose los mecanismos de síntesis de colágeno y de la remodelación de la matriz extracelular, lo cual desencadenaría el inicio de la fibrosis testicular. Está claro que las alteraciones funcionales de las células de Leydig también están involucradas con el evidente hiperestrogenismo con el que cursan muchos pacientes con hepatopatías crónicas, incluidos los pacientes con cirrosis, en los que están incrementados los niveles de estradiol total y libre, y la relación estradiol/testosterona, los cuales disminuyen y llegan a normalizarse cuando se realiza el trasplante hepático.²²¹ Pero además, todas estas alteraciones intersticiales testiculares presentes en casos con IHC determinarían un efecto quimiotáctico aún mayor, que facilitarían la capacidad de atraer un mayor número de células inmunocompetentes que participarían en los procesos inflamatorios, incluyendo la migración de más macrófagos infiltrantes en el tejido intersticial, en la pared peritubular e, incluso, en la luz de los tubos seminíferos. **(Fig. 27)**

En cambio, las alteraciones observadas en el intersticio de testículos criptorquídicos postpuberales muestran un aumento del proceso de fibrosis, posiblemente relacionado con la exposición a factores deletéreos durante el desarrollo testicular fetal. Dada la relación de la criptorquidia con el síndrome de disgenesia testicular,^{232,233} se ha sugerido que la presencia de niveles de estrógenos elevados, o la participación de factores intercurrentes con acción estrogénica (por ejemplo los niveles de estrógenos elevados o la presencia de sustancias químicas que ejercen como disruptores hormonales). Esta elevación de los estrógenos, acompañada o no de un aumento de la expresión de receptores estrogénicos, podría explicar, en parte, los hallazgos histológicos tubulares y la fibrosis intersticial observados en los testículos criptorquídicos.

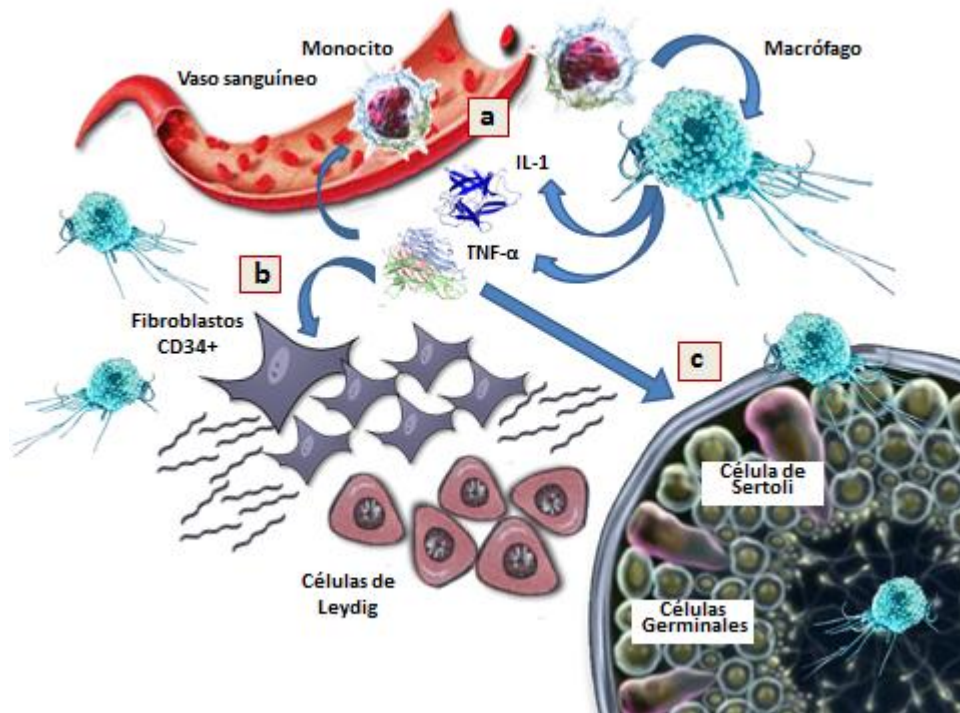


Fig. 27. Relación entre macrófagos activados y fibroblastos CD34+ para la producción de colágeno y matriz extracelular. **a)** Factores quimiotácticos inflamatorios atraen a monocitos, con posterior transformación en macrófagos en el tejido intersticial testicular. **b)** Los macrófagos activados producen mediadores, especialmente IL-1 y TNF- α , que estimulan a los fibroblastos CD34+ para la producción de colágeno y matriz extracelular. **c)** IL-1 y TNF- α ejercen efecto quimiotáctico, favoreciendo la llegada de mayor número de macrófagos, que infiltran intersticio testicular y tubos seminíferos.

En relación con la estimulación estrogénica sobre el testículo, se ha observado un incremento en el número de las células cebadas en varios modelos experimentales.^{79,155} En un modelo ratas recién nacidas, la administración de estradiol produjo un aumento en el número de células cebadas en el intersticio testicular y la alteración de la espermatogénesis.⁷⁹ En otro modelo en ranas, dos semanas después de la inyección de estrógenos, el grupo con estrógenos mostró un aumento del número de células cebadas, y estas células contenían gránulos maduros, este efecto se revirtió con la administración de tamoxifén.¹⁵⁵ Todos estos hallazgos experimentales sugieren que las células cebadas están reguladas por los estrógenos y que esta interacción tiene un efecto en el desarrollo testicular en animales. Sin embargo, en humanos no existen estudios que valoren la relación del

número de células cebadas en respuesta a la exposición estrogénica durante el desarrollo testicular.¹⁴⁹

Se sabe que las células cebadas humanas expresan receptores estrogénicos α (α ER)^{111,279} y que la exposición a los estrógenos determina una retroalimentación positiva de la expresión de triptasa y un incremento en la degranulación de las células cebadas.¹⁸² También se ha demostrado que la migración y activación de las células cebadas intervienen en la degradación de la matriz extracelular y en el inicio de mecanismos de fibrosis; así mismo,¹¹¹ también se ha demostrado la exposición a los estrógenos produce una retroalimentación positiva de la expresión de tripsina y un incremento en la degranulación de las células cebadas.¹⁸² Todos estos estudios abogan por una estrecha relación causa-efecto entre la exposición a estrógenos y la activación de las células cebadas humanas.

Los resultados encontrados en nuestra investigación podrían obedecer al siguiente mecanismo de regulación paracrina testicular mediada por células cebadas: Las alteraciones que llevan al hipogonadismo favorecen la actividad de la aromatasa en las células de Leydig, lo cual determina una mayor producción de estrógenos intratesticulares. El estradiol estimula la migración de las células cebadas y su activación a nivel intersticial, favoreciendo la producción de sustancias con actividad paracrina, especialmente Triptasa, que actúan en la pared peritubular y en los fibroblastos CD34+, produciéndose el engrosamiento de la pared, y el aumento de la producción de colágeno y matriz extracelular, lo que conlleva finalmente al desarrollo de fibrosis intersticial y peritubular en los testículos con criptorquidia e IHC. **(Fig. 28)**

En definitiva, el factor común entre los grupos de estudio (prenatal en el caso de criptorquidia, y adquirida en el caso de IHC) pudiera estar relacionado con una exposición estrogénica aumentada. Los resultados inmunohistoquímicos y morfométricos obtenidos en la presente Tesis nos van a permitir avanzar en el conocimiento de la importancia del intersticio testicular en la fisiopatología testicular; así como correlacionar los hallazgos histológicos con las alteración endocrina y paracrina presentes en las enfermedades que cursan con fibrosis testicular, tal como claramente ha quedado demostrada en los testículos criptorquídicos y en los testículos de pacientes con IHC.

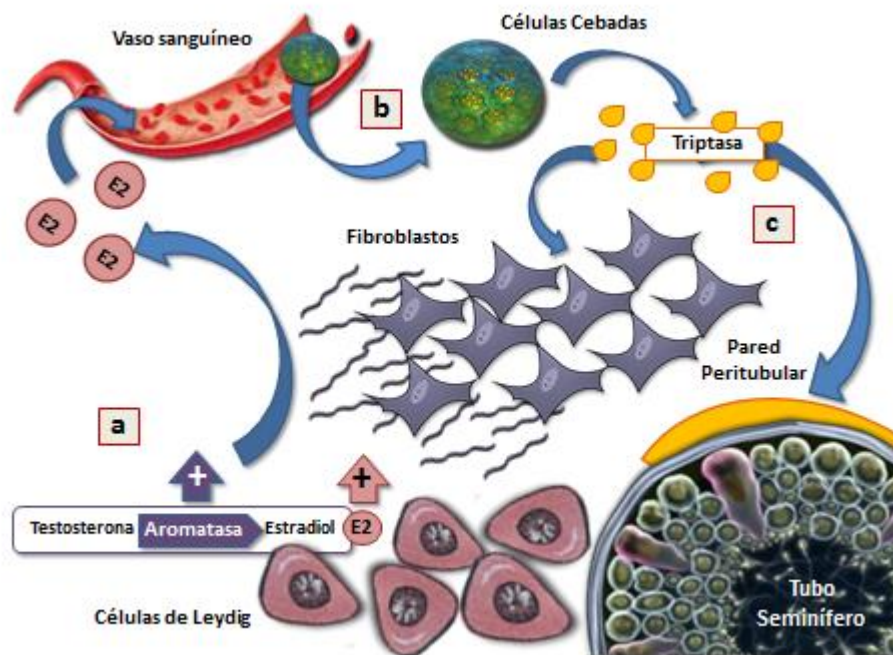


Fig. 28. Relación entre células cebadas y fibroblastos CD34+. **a)** Aumento de la actividad de aromatasa testicular en las Células de Leydig, con aumento de la síntesis de estradiol. **b)** A nivel vascular, efecto quimiotáctico del estradiol, que favorece el aumento de las células cebadas en el intersticio testicular. **c)** Las células cebadas producen triptasa, con efectos en los fibroblastos CD34+ y en la pared peritubular, con aumento de la producción de colágeno y matriz extracelular, y engrosamiento de la pared peritubular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Primera. La cuantificación del área ocupada por las células CD34 positivas y sus prolongaciones, tanto en el intersticio testicular como en la pared peritubular, es significativamente mayor en los casos de insuficiencia hepática crónica, con respecto al testículo normal.

Segunda. Las áreas del intersticio testicular y de la pared peritubular ocupadas por inmunotinción CD34 positiva son significativamente mayores en pacientes con insuficiencia hepática crónica, con respecto a la cuantificada en los testículos criptorquídicos; sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas de la cuantificación de la expresión de CD34 en los testículos criptorquídicos, con respecto al control.

Tercera. En el intersticio testicular de pacientes con insuficiencia hepática crónica existe un marcado incremento de los macrófagos CD68 positivos, comparado con el testículo normal. También es significativamente mayor el número de macrófagos intersticiales en los casos de insuficiencia hepática crónica, con respecto a los encontrados en los testículos criptorquídicos. Sin embargo, no hay diferencias significativas del número de macrófagos, cuando se comparan los casos con criptorquidia con el grupo control.

Cuarta. El número de células cebadas triptasa positivo en el intersticio testicular es significativamente mayor en los casos con insuficiencia hepática crónica o con criptorquidia, respecto al testículo normal, pero no hay diferencias significativas entre estas dos patologías testiculares.

Quinta. Las alteraciones del intersticio testicular y de la pared peritubular de causa congénita -criptorquidia- y de causa adquirida -insuficiencia hepática crónica-, relacionadas con alteraciones hormonales, son semejantes, aunque de diferente intensidad, y conllevan lesiones irreversibles de la pared peritubular y del intersticio testicular, probablemente secundarios a las importantes alteraciones de la regulación paracrina testicular.

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación se pretende estudiar los cambios presentes en testículos de pacientes con insuficiencia hepática crónica, una patología adquirida, en relación con la pared de los tubos seminíferos y el intersticio testicular, y compararlos con los cambios observados en criptorquidia postpuberal, una patología congénita. Con este fin, se ha diseñado un estudio inmunohistoquímico para la exploración de la expresión de las siguientes moléculas: CD34, para identificar las células mioides y fibroblastos peritubulares, CD68 para identificar los macrófagos presentes, y triptasa, como marcador de células cebadas tisulares.

Como material de estudio se han incluido sujetos controles (10 casos), pacientes con insuficiencia hepática crónica (17 casos), y pacientes con criptorquidia postpuberal (10 casos). Todas las moléculas exploradas se identificaron mediante el método inmunohistoquímico de estreptavidina-biotina-peroxidasa. La cuantificación del área de inmunotinción con CD34 se realizó con el programa *image J*, y se realizaron contajes celulares de macrófagos CD68+ y células cebadas triptasa +.

Se ha encontrado que el intersticio testicular y la pared peritubular presentan grandes cambios en presencia de patología hepática crónica, con gran variedad de alteraciones de la espermatogénesis, desde hipoespermatogénesis a atrofia tubular completa, fibrosis intersticial aumentada, mostrando una mayor área de fibroblastos y fibras CD34+ y mayor presencia de macrófagos CD68+ tanto en intersticio como en pared peritubular. Estas diferencias son estadísticamente significativas con respecto al grupo control y con el grupo de testículos criptorquídicos postpuberales.

Tanto en el grupo de insuficiencia hepática como en el grupo de criptorquidia postpuberal se observó aumento de la presencia de células cebadas triptasa+ en el tejido intersticial testicular y en la pared peritubular, siendo estadísticamente significativa con respecto al grupo control, pero no entre ambos grupos de estudio.

Todos estos datos sugieren cambios importantes en el intersticio testicular y en la pared peritubular en testículos de pacientes con insuficiencia hepática y pacientes con criptorquidia postpuberal.

SUMMARY

This research project aims to study the changes present in testes of patients with chronic hepatic impairment, an acquired condition, in relation to the wall of the seminiferous tubules and the testicular interstitium, and compare them with the changes observed in postpubertal cryptorchidism, a congenital pathology. For this purpose, it has been designed an immunohistochemical study to explore the expression of the following molecules: CD 34 to identify myoid cells and peritubular fibroblasts, CD68 to identify macrophages, and tryptase, as marker of mast cells.

The material included control subjects (10 cases), patients with chronic liver failure (17 cases), and patients with postpubertal cryptorchidism (10 cases). All scanned molecules were identified by immunohistochemical method of streptavidin-biotin-peroxidase. Quantification of the area of immunostaining with CD34 was performed with the *Image J* program, and cell counts of CD68 + macrophages and tryptase + mast cell were performed.

It has been found that the testis interstitium and peritubular wall show the alterations in chronic liver disease. A variety of alterations in spermatogenesis, from hypospermatogenesis to full tubular atrophy, increased interstitial fibrosis, showing a major area of CD34 + fibroblasts and fibers and presence of CD68 + macrophages in both interstitium and peritubular wall were observed. These differences are statistically significant compared to the control group and the group of postpubertal undescended testicles.

Both the group with liver failure and the group of postpubertal cryptorchidism showed increased presence of tryptase+ mast cells in testicular interstitial tissue and peritubular wall. The increment was statistically significant compared to the control group, but not between the two groups study.

All these data suggests significant changes in the testicular interstitium and the peritubular wall in testes of patients with liver failure and patients with postpubertal cryptorchidism.

REFERENCIAS

1. **Acerini CL, Miles HL, Dunger DB, Ong KK, Hughes IA.** The descriptive epidemiology of congenital and acquired cryptorchidism in a UK infant cohort. *Arch Dis Child* 2009;94:868-872.
2. **Akre O, Lipworth L, Cnattingius S, Sparén P, Ekbom A.** Risk factor patterns for cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 1999;10:364-369
3. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: **Dries DJ** (ed). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York. 2002;pp:949-1009.
4. **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.
5. **Algermissen B, Hermes B, Feldmann-Boeddeker I, Bauer F, Henz BM.** Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars. *Exp Dermatol* 1999;8:193-198.
6. **Amat P, Paniagua R, Montero J.** Seminiferous tubule degeneration in human cryptorchid testes. *J Androl* 1985;6:1-9.
7. **Anderson AM, Edvardsen K, Skakkebaek NE.** Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymus. *Int J Androl* 1994;17:174-180.
8. **Apa DD, Cayan S, Polat A, Akbay E.** Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl* 2002;48:337-344.
9. **Arenas MI, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R.** Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. *Histochem Cell Biol* 1997;107:469-477.
10. **Asklund C, Jensen TK, Main KM, Sobotka T, Skakkebaek NE, Jørgensen N.** Semen quality, reproductive hormones and fertility of men operated for hypospadias. *Int J Androl* 2010;33:80-87.
11. **Augusto D, Leteurtre E, De La Taille A, Gosselin B, Leroy X.** Calretinin: a valuable marker of normal and neoplastic Leydig cells of the testis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:159-162.
12. **Aukland K, Reed RK.** Interstitial lymphatic mechanism in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev* 1993;73:1-73.
13. **Badr FM, Bartke A.** Effect of ethyl alcohol on plasma testosterone level in mice. *Steroids* 1974;23:921-928.
14. **14. Barakat B, Itman C, Mendis SH, Loveland KL.** Activins and inhibins in mammalian testis development: new models, new insights. *Mol Cell Endocrinol* 2012;359:66-77.
15. **15. Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL.** Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction* 2008;136:345-359.
16. **Barr RW, Sommers SC.** Endocrine abnormalities accompanying hepatic cirrhosis and hepatoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1957;17:1017-1029.
17. **Barreiro ML, Tena-Sempere M.** Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol* 2004;226:1-9.
18. **Bar-Shira Maymon B, Yavetz H, Yogev L, Kleiman SE, Lifschitz-Mercer B, Schreiber L, Botchan A, Hauser R, Paz G.** Detection of calretinin expression in abnormal immature Sertoli cells in non-obstructive azoospermia. *Acta Histochem* 2005;107:105-112.
19. **Barth PJ, Ebrahimsade S, Hellinger A, Moll R, Ramswamy A.** CD34(+) fibrocytes in neoplastic and inflammatory

- pancreatic lesions. *Virchows Arch* 2002;440:128-133.
20. **Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramswamy A, Moll R.** CD34(+) fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma *in situ*, and benign breast lesions. *Virchows Arch* 2002;440:298-303.
21. **Barth PJ, Ramswamy A, Moll R.** CD34(+) fibrocytes in normal cervical stroma, cervical intraepithelial neoplasia III, and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2002;441:564-568.
22. **Bay K, Asklund C, Skakkebaek NE, Andersson AM.** Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:77-90.
23. **Bennett HS, Baggenstoss AH, Butt HR.** The testis, breast and prostate of men who die of cirrhosis of the liver. *Am J Clin Pathol* 1950;20:814-828.
24. **Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, Donaldson CJ, Fischer WH, Vale WW.** Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225:29-36.
25. **Bilinska B, Kotula-Balak M, Gancarczyk M, Sadowska J, Tabarowski Z, Wojtusiak A.** Androgen aromatization in cryptorchid mouse testis. *Acta Histochem* 2003;105:57-65.
26. **Boepple PA, Hayes FJ, Dwyer AA, Raivio T, Lee H, Crowley WF Jr, Pitteloud N.** Relative roles of inhibin B and sex steroids in the negative feedback regulation of follicle-stimulating hormone in men across the full spectrum of seminiferous epithelium function. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1809-1814.
27. **Boisen KA, Chellakooty M, Schmidt IM, Kai CM, Damgaard IN, Suomi AM, Toppari J, Skakkebaek NE, Main KM.** Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at three months of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4041-4046.
28. **Boisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen HE, Haavisto AM, Schmidt IM, Chellakooty M, Damgaard IN, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek NE, Toppari J.** Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 2004;363:1264-1269.
29. **Boisen KA, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE.** Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome. *Ann NY Acad Sci* 2001;948:90-99.
30. **Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM.** Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 2007;72:381-405.
31. **Bustos-Obregon E.** Ultrastructure and function of the lamina propria of mammalian seminiferous tubules. *Andrologia* 1976;8:179-185.
32. **Cao QJ, Jones JG, Li M.** Expression of calretinin in human ovary, testis, and ovarian sex cord-stromal tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2001;20:346-352.
33. **Carreau S.** Leydig cell aromatase. In: **Payne AH, Hardy MP** (eds). Contemporary endocrinology: the Leydig cell in health and disease. Humana Press. Totowa. 2009;pp:189-195.
34. **Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Denis I.** Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv Med Sci* 2008;53:139-144.
35. **Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, Galeraud-Denis I, Delalande C.** Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:761-768.
36. **Carreau S, Wolczynski S, Galeraud-Denis I.** Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Phil Trans R Soc B* 2010;365:1571-1579.
37. **Castilla-Cortazar I, Diez N, Garcia-Fernandez M, Puche JE, Diez-Caballero**

- F, Quiroga J, Diaz-Sanchez M, Castilla A, Casares AD, Varela-Nieto I, Prieto J, Gonzalez-Baron S. Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: effect of insulin-like growth factor 1. *World J Gastroenterol* 2004;10:2529-2534.
38. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Diez N, Diez-Caballero F, Calvo A, Diaz M, Prieto J. Insulin-like growth factor-I reverts testicular atrophy in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:592-600.
39. Cayan S, Apa DD, Akbay E. Effect of fexofenadine, a mast cell blocker, in infertile men with significantly increased testicular mast cells. *Asian J Androl* 2002;4:291-294.
40. Chandrashekar V, Bartke A. Growth factors in Leydig cell functions. In: Payne AH, Hardy MP (eds). Contemporary endocrinology: the Leydig cell in health and disease. Humana Press. Totowa. 2009;pp:263-277.
41. 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.
42. Chen H, Midzak A, Luo L, Zirkin BR. Aging and the decline of androgen production. In: Payne AH, Hardy MP (eds). Contemporary endocrinology: the Leydig cell in health and disease. Humana Press. Totowa. 2009;pp:117-131.
43. Cheng CY, Wong EWP, Yan HHN, Mruk DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: New insights and advances. *Moll Cell Endocrinol* 2010;315:49-56.
44. Chiao YB, Johnston DE, Gavalier JS, Van Thiel DH. Effect of chronic ethanol feeding on testicular content of enzymes required for testosteronegenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 1981;5:230-236.
45. Christensen AK. The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs. *J Cell Biol* 1965;26:911-935.
46. Christl HW. The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: A comparative light and electron microscopic investigation. *Andrologia* 1990;22:85-94.
47. Cicero TJ, Bell RD. Effects of ethanol and acetaldehyde on the biosynthesis of testosterone in the rodent testes. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;94:814-819.
48. Cicero TJ, Bell RD, Meyer ER, Badger TM. Ethanol and acetaldehyde directly inhibit testicular steroidogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;213:228-233.
49. Cobb CF, Ennis MF, van Thiel DH, Gavalier JS, Lester R. Isolated testes perfusion: a method using a cell- and protein-free perfusate useful for the evaluation of potential drug and/or metabolic injury. *Metabolism* 1980;29:71-79.
50. Corda L. Sulla c.d. reviviscenza della mammella maschile nella cirrosi epatica (nota preventiva.) *Minerva Medica* 1925;5:1064-1067.
51. Cummings TJ, Burxhette JL, McLendon RE. CD34 and dural fibroblasts: the relationship to solitary fibrous tumor and meningioma. *Acta Neuropathol* 2001;102:349-354.
52. 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.
53. Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* 2004;167:935-944.
54. Davidoff MS, Middendorff R, Müller D, Holstein AF. The neuroendocrine Leydig cells and their stem cell progenitors, the pericytes. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2009;205:1-107.

55. De Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225:57-64.
56. De Kretser DM, Kerr JB. The cytology of the testis. In: Knobil E, Neill J (eds). The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 1988;pp:837-932.
57. De Kretser DM, Kerr JB, Paulsen CA. The peritubular tissue in the normal and pathological human testis: An ultrastructural study. *Biol Reprod* 1975;12:317-324.
58. De Kretser DM, Loveland KL, Meehan T, O'Bryan MK, Phillips DJ, Wreford NG. Inhibins, activins and follistatin: actions on the testis. *Mol Cell Endocrinol* 2001;180:87-92.
59. Diamond T, Pojer R, Stiel D, Alfrey A, Posen S. Does iron affect osteoblast function? Studies in vitro and in patients with chronic liver disease. *Calcif Tissue Int* 1991;48:373-379.
60. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, Sáez FJ, Díaz-Flores Jr L, Valladares F, Madrid JF. CD34+ stromal cells/fibroblasts/ fibrocytes/ telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol* 2014;29:831-870.
61. Dym M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev* 1994;15:102-115.
62. Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, Huleihel M. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *Eur Cytokine Netw* 2005;16:167-172.
63. Ellingboe J, Varanelli CC. Ethanol inhibits testosterone biosynthesis by direct action on Leydig cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;24:87-102.
64. Eriksson CJ, Widenius TV, Leinonen P, Härkönen M, Ylikahri RH. Inhibition of testosterone biosynthesis by ethanol: relation to the pregnenolone-to-testosterone pathway. *FEBS Lett* 1984;172:177-182.
65. Ewing LL, Zirkin B: Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res* 1983;39:599-635.
66. Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 1973;9:500-532.
67. Feng S, Bogatcheva NV, Truong A, Engel W, Adham IM, AgoulNIK AI. Over expression of insulin-like 3 does not prevent cryptorchidism in GNRHR or HOXA10 deficient mice. *J Urol* 2006;176:399-404.
68. Ferlin A, Bogatcheva NV, Giansello L, Pepe A, Vinanzi C, AgoulNIK AI, Foresta C. Insulin-like factor 3 gene mutations in testicular dysgenesis syndrome: clinical and functional characterization. *Mol Hum Reprod* 2006;12:401-406.
69. Fernandez MF, Duran I, Olea N, Avivar C, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE, Jørgensen N. Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *Int J Androl* 2012;35:1-10.
70. Fernandez MF, Olmos B, Olea N. Exposure to endocrine disruptors and male urogenital tract malformations [cryptorchidism and hypospadias]. *Gac Sanit* 2007;21:500-514.
71. Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev* 2006;213:66-81.
72. Franca LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 1998;59:1371-1377.
73. Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Köhn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril* 2002;78:298-306.

74. **Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A.** Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15072-15077.
75. **Furuya S, Kumamoto Y, Suzuki T, Takauji M, Nagai T.** Actin- like filaments in the peritubular cells of human testis: chemical extraction and binding with heavy meromyosin. *Andrologia* 1977;9:349-356.
76. **Galvão-Teles A, Gonçalves L, Carvalho H, Monteiro E.** Alterations of testicular morphology in alcoholic disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1983;7:144-149.
77. **Galvao-Teles A, Goncalves L, Vieira MR, Fernandes JP, Calca F, Carvalho H, Monteiro E.** Male hypogonadism in alcoholic patients with or without liver cirrhosis. In: **Langer M, Chiandussi L, Chopra JG, Martini L** (eds). *The Endocrine and the liver*. Academic Press. New York. 1982;pp:135-144.
78. **Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, Levi-Schaffer F.** Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2002;32:237-246.
79. **Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, Van Rooijen N.** Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J Androl* 1994;15:558-564.
80. **Ge R, Hardy MP.** Regulation of Leydig cells during pubertal development. In: **Payne AH, Hardy MP** (eds). *Contemporary endocrinology: the Leydig cell in health and disease*. Humana Press. Totowa. 2009;pp:55-70.
81. **Gilfillan AM, Tkaczyk C.** Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2006;6:218-230.
82. **Giwerzman A, Rylander L, Hagmar L, Giwerzman YL.** Ethnic differences in occurrence of TDS: genetics and/or environment? *Int J Androl* 2006;29:291-297.
83. **Glass SJ, Edmonson HA, Soll SN.** Sex hormone changes associated with liver disease. *Endocrinology* 1940;27:749-752.
84. **Glud C.** Serum testosterone concentrations in men with alcoholic cirrhosis: background for variation. *Metabolism* 1987;36:373-378.
85. **Glud C, Tage-Jensen U, Bahnsen M, Dietrichson O, Svejgaard A.** Autoantibodies, histocompatibility antigens and testosterone in males with alcoholic liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1981;44:31-37.
86. **Gomathi C, Balasubramanian K, Bhanu NV, Srikanth V, Govindarajulu P.** Effect of chronic alcoholism on semen -studies on lipid profiles. *Int J Androl* 1993;16:175-181.
87. **Gonzalez R, Griparic L, Vargas V, BURGEE K, Santacruz P, Anderson R, Schiewe M, Silva F, Patel A.** A putative mesenchymal stem cells population isolated from adult human testes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385:570-575.
88. **Gordon GG, Altman K, Southren AL, Rubin E, Lieber CS.** Effect of alcohol (ethanol) administration on sex-hormone metabolism in normal men. *N Engl J Med* 1976;295:793-797.
89. **Gumbiner BM.** Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84:345-357.
90. **Guyton AC.** Interrelationships among interstitial fluid volume, interstitial fluid pressure, interstitial fluid protein concentration and lymph flow. In: **Reed RK, Laine GA, Bert JL, Winlove P, McHale N** (eds). *Interstitialium, connective tissue and lymphatics*. Portland Press Ltd. London. 1995;pp:167-180.
91. **Haider SG.** Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology* 2007;148:2581-2582.

92. **Hales DB.** Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 2002;57:3-18.
93. **Hales DB.** Regulation of Leydig cell functions as it pertains to the inflammatory response. In: **Payne AH, Hardy MP** (eds). The Leydig cell in health and disease. Humana Press. Totowa. 2007;pp:305-322.
94. **Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, van Nunen SA.** Testicular function and fertility in men with homozygous alpha-1 antitrypsin deficiency. *Andrologia* 1986;18:406-412.
95. **Handelsman DJ, Strasser S, McDonald JA, Conway AJ, McCaughan GW.** Hypothalamic-pituitary-testicular function in end-stage non-alcoholic liver disease before and after liver transplantation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;43:331-337.
96. **Hayes FJ, Crowley WF Jr.** Gonadotropin pulsations across development. *Horm Res* 1998;49:163-168.
97. **Hayes FJ, Pitteloud N, DeCruz S, Crowley WF Jr, Boepple PA.** Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5541-5546.
98. **Hess RA.** The efferent ductules: structure and functions. In: **Robaire B, Hinton B** (eds). The epididymis: from molecules to clinical practice. Kluwer Academic. New York. 2002;pp:49-80.
99. **Hess RA.** Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:52-65.
100. **Hess RA.** Estrogen in the adult male: from a curiosity to absolute necessity. *Ann Rev Biomed Sci* 2004;6:1-12.
101. **Hess RA, Bunick D, Lubahn D B, Zhou Q, Bouma J.** Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. *J Androl* 2000;21:107-121.
102. **Hess RA, Carnes K.** The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod* 2004;1:5-30.
103. **Hess RA, Zhou Q, Nie R, Oliveira C, Cho H, Nakai M, Carnes K.** Estrogens and epididymal function. *Reprod Fertil Dev* 2001;13:273-283.
104. **Hibi H, Kato K, Mitsui K, Taki T, Yamada Y, Honda N, Fukatsu H, Yamamoto M.** Treatment of oligoasthenozoospermia with tranilast, a mast cell blocker, after long-term administration. *Arch Androl* 2002;48:451-459.
105. **Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS.** Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogenous phenotype. *Arch Histol Cytol* 1996;59:109-125.
106. **Hussein MR, Abou-Deif ES, Bedaiwy MA, Said TM, Mustafa MG, Nada E, Ezat A, Agarwal A.** Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 2005;83:1447-1453.
107. **Hutson JC.** Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:1-7.
108. **Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P.** Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* 2003;170:5-11.
109. **Isaac JR, Skinner S, Elliot R, Salto-Tellez M, Garkavenko O, Khoo A, Lee KO, Calne R, Wang DZ.** Transplantation of neonatal porcine islets and sertoli cells into nonimmunosuppressed nonhuman primates. *Transplant Proc* 2005;37:487-488.
110. **Jarow JP, Budin RE, Dym M, Zirkin BR, Noren S, Marshall FF.** Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy. A controlled study. *N Engl J Med* 1985;313:1252-1256.
111. **Jensen F, Woudwyk M, Teles A, Woidacki K, Taran F, Costa S, Malferteiner SF, Zenclussen AC.** Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the

- periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLoS One* 2010;5:e14409.
112. **Jin B, McCaughan GW, Handelsman DJ.** Effects of liver disease and transplantation on the human prostate. *J Androl* 1999;20:559-565.
113. **Joensen UN, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE.** Testicular dysgenesis syndrome and Leydig cell function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:155-161.
114. **Johnson L, Petty CS, Neaves WB.** Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J Reprod Fertil* 1984;70:211-218.
115. **Johnson L, Petty CS, Neaves WB.** Age-related variation in seminiferous tubules in men: A stereologic evaluation. *J Androl* 1986;7:316-322.
116. **Johnston DE, Chiao YB, Gavaler JS, Van Thiel DH.** Inhibition of testosterone synthesis by ethanol and acetaldehyde. *Biochem Pharmacol* 1981;30:1827-1831.
117. **Jones ME, Boon WC, Proietto J, Simpson ER.** Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2006;17:55-64.
118. **Jørgensen N, Asklund C, Carlsen E, Skakkebaek NE.** Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern. *Int J Androl* 2006;29:54-61.
119. **Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Main KM, Skakkebaek NE.** Testicular dysgenesis syndrome comprises some but not all cases of hypospadias and impaired spermatogenesis. *Int J Androl* 2010;33:298-303.
120. **Juliano RL.** Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:283-323.
121. **Kaymakoğlu S, Okten A, Cakaloğlu Y, Boztaş G, Beşişik F, Taşçioğlu C, Yalçın S.** Hypogonadism is not related to the etiology of liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 1995;30:745-750.
122. **Kelce WR, Ganjam VK, Rudeen PK.** Effects of fetal alcohol exposure on brain 5 alpha-reductase/aromatase activity. *J Steroid Biochem* 1990;35:103-106.
123. **Kim Y, Kim JS, Song MS, Seo HS, Kim JC, Bae CS, Kim S, Shin T, Kim SH, Moon C.** The expression and localization of inhibin isotypes in mouse testis during postnatal development. *J Vet Sci* 2008;9:345-349.
124. **Kim J, Seandel M, Falciatori I, Wen D, Rafii S.** CD34+ testicular stromal cells support long-term expansion of embryonic and adult stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2008;26:2516-2522.
125. **Kimata M, Ishizaki M, Tanaka H, Nagai H, Inagaki N.** Production of matrix metalloproteinases in human cultured mast cells: involvement of protein kinase C-mitogen activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Allergol Int* 2006;55:67-76.
126. **Kley HK, Stremmel W, Kley JB, Schlaghecke R.** Testosterone treatment of men with idiopathic hemochromatosis. *Clin Investig* 1992;70:566-572.
127. **Kley HK, Strohmeier G, Krüskemper HL.** Effect of testosterone application on hormone concentrations of androgens and estrogens in male patients with cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1979;76:235-241.
128. **Koch M, Olson PF, Albus A, Jin W, Hunter DD, Brunken WJ, Burgeson RE, Champlaud MF.** Characterization and expression of the laminin γ 3 chain: a novel, nonbasement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol* 1999;145:605-618.
129. **Kuller LH, May SJ, Perper JA.** The relationship between alcohol, liver disease, and testicular pathology. *Am J Epidemiol* 1978;108:192-199.

130. **Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, Enzan H.** Distribution and role of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in human normal testicular stroma. *Histol Histopathol* 2004;19:743-751.
131. **Kurosumi M, Ishimura K, Fujita H, Osawa Y.** Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. *Histochemistry* 1985;83:401-404.
132. **Lange PH.** Serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in the management of testicular tumors. *Natl Cancer Inst Monogr* 1978;49:215-217.
133. **Langford GA, Heller GA.** Fine structure of muscle cells of the human testicular capsule: Basis of testicular contractions. *Science* 1973;179:573-575.
134. **Laron Z, Klinger B.** Effect of insulin-like growth factor-I on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). *Eur J Endocrinol* 1998;138:176-180.
135. **Lee PA, Coughlin MT.** Fertility after bilateral cryptorchidism. Evaluation by paternity, hormone, and semen data. *Horm Res* 2001;55:28-32.
136. **Lehmann D, Temminck B, Da Rugna D, Leibundgut B, Sulmoni A, Muller HJ.** Role of immunological factors in male infertility: immunohistochemical and serological evidence. *Lab Invest* 1987;57:21-28.
137. **Leydig F.** Zur anatomie der mannlichen geschlechtorgane und analdrüsen der sangethiere. *Ztschr Wiss Zool* 1850;2:1-57.
138. **Li X, Strauss L, Kaatrasalo A, Mayerhofer A, Huhtaniemi I, Santti R, Mäkelä S, Poutanen M.** Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. *Endocrinology* 2006;147:1271-1277.
139. **Lian G, Enders GC.** Entactin ultrastructural immunolocalization in the basal laminae of mouse seminiferous tubules and with only subtle changes following hypophysectomy. *J Androl* 1994;15:52-60.
140. **Lloyd CW, Williams RH.** Endocrine changes associated with Laennec's cirrhosis of the liver. *Am J Med* 1948;4:315-330.
141. **Loveland K, Schlatt S, Sasaki T, Chu ML, Timpl R, Dziadek M.** Developmental changes in the basement membrane of the normal and hypothyroid postnatal rat testis: segmental localization of fibulin-2 and fibronectin. *Biol Reprod* 1998;58:1123-1130.
142. **Lui WY, Cheng CY.** Transcriptional regulation of cell adhesion at the blood-testis barrier and spermatogenesis in the testis. *Adv Exp Med Biol* 2012;763:281-294.
143. **Lui WY, Lee WM.** Regulation of junction dynamics in the testis-transcriptional and post-translational regulations of cell junction proteins. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250:25-35.
144. **Luppa PB, Thaler M, Schulte-Frohlinde E, Schreiegg A, Huber U, Metzger J.** Unchanged androgen-binding properties of sex hormone-binding globulin in male patients with liver cirrhosis. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:967-973.
145. **Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J.** Cryptorchidism as part of the testicular dysgenesis syndrome: the environmental connection. *Endocr Dev* 2009;14:167-173.
146. **Martin O, Shialis T, Lester J, Scrimshaw M, Boobis A, Voulvoulis N.** Testicular dysgenesis syndrome and the estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. *Cien Saude Colet* 2008;13:1601-1618.
147. **Martínez-Frías ML, Prieto D, Prieto L, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Cuevas L.** Secular decreasing trend of the frequency of hypospadias among newborn male infants in Spain. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:75-81.
148. **Meachem S, Nieschlag E, Simoni M.** Inhibin B in male reproduction:

- pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:561-571.
149. **Mechlin C, Kogan B.** Mast cells, estrogens, and cryptorchidism: A histological based review. *Transl Androl Urol* 2012;1:97-102.
150. **Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, de Kretser DM, Loveland KL.** Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol* 2000;220:225-237.
151. **Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A.** Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril* 2000;74:239-244.
152. **Micevych P, Dominguez R.** Membrane estradiol signaling in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2009;30:315-327.
153. **Middendorff R, Muller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS.** The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3486-3499.
154. **Miller SC, Bowman BM, Rowland HG.** Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *Am J Anat* 1983;168:1-13.
155. **Minucci S, Di Matteo L, Chieffi P, Pierantoni R, Fasano S.** 17 beta-estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool* 1997;278:93-100.
156. **Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y.** Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. *Urology* 2011;77:251.e1-6.
157. **Morimoto I.** Gonadal dysfunctions in liver cirrhosis. *Nihon Rinsho* 1994;52:132-137.
158. **Morrione TG.** Effect of estrogens on the testis in hepatic insufficiency. *Arch Pathol* 1944;37:39-48.
159. **Mruk DD, Cheng CY.** Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 2004;25:747-806.
160. **Mulholland DJ, Dedhar S, Vogl AW.** Rat seminiferous epithelium contains a unique junction (ectoplasmic specialization) with signaling properties both of cell/cell and cell/matrix junctions. *Biol Reprod* 2001;64:396-407.
161. **Murono EP, Lin T, Osterman J, Nankin HR.** Direct inhibition of testosterone synthesis in rat testis interstitial cells by ethanol: possible sites of action. *Steroids* 1980;36:619-631.
162. **Naftolin F, Garcia-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Leranath C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A, Parducz A.** Estrogen induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogeninduced gonadotrophin surge. *Reproductive Sciences* 2007;14:101-116.
163. **163. Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M.** Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol* 2000;53:626-629.
164. **164. Nef S, Parada LF.** Cryptorchidism in mice mutant for *Ins13*. *Nat Genet* 1999;22:295-299.
165. **Niemi M, Sharpe RM, Brown MA:** Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res* 1986;243:337-344.
166. **Nightingale SS, Western P, Hutson JM.** The migrating gubernaculum grows like a "limb bud". *J Pediatr Surg* 2008;43:387-390.
167. **Nistal M, González-Peramato P, de Miguel MP.** Immunodetection of inhibin in the human testis and epididymis

- during normal development and in non-tumoural testicular lesions. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:558-563.
168. **Nistal M, Gonzalez-Peramato P, De Miguel MP.** Sertoli cell dedifferentiation in human cryptorchidism and gender reassignment shows similarities between fetal environmental and adult medical treatment estrogen and antiandrogen exposure. *Reprod Toxicol* 2013;42:172-179.
169. **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.
170. **Nistal M, Jiménez-Heffernan JA.** Rete testis dysgenesis. A characteristic lesion of undescended testes. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:1259-1264.
171. **Nistal M, Paniagua R.** Testicular and epididymal pathology. Thieme-Stratton Inc. New York. 1984;pp:1-25.
172. **Nistal M, Paniagua R, Díez-Pardo JA.** Histologic classification of undescended testes. *Hum Pathol* 1980;11:666-674.
173. **Nistal M, Paniagua R, González - Peramato.** Nonneoplastic diseases of the testis. In: **Bostwick DG, Cheng L** (eds). Urologic Surgical Pathology. Elsevier. Philadelphia. 2014;pp:560-735.
174. **Nistal M, Paniagua R, Queizán A.** Histologic lesions in undescended ectopic obstructed testes. *Fertil Steril* 1985;43:455-462.
175. **Nistal M, Paniagua R, Riestra ML, Reyes-Múgica M, Cajaiba MM.** Bilateral prepubertal testicular biopsies predict significance of cryptorchidism-associated mixed testicular atrophy, and allow assessment of fertility. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1269-1276.
176. **Nistal M, Pastrían LG, González-Peramato P, De Miguel MP.** Inhibin bodies: a new marker for immature Sertoli cells. *Histopathology* 2011;58:1019-1027.
177. **Nistal M, Regadera J, Winitzky P, Tejerina E, Chemes H.** Granular changes in Sertoli cells in children and pubertal patients. *Fertil Steril* 2005;83:1489-1499.
178. **Nistal M, Riestra ML, Paniagua R.** Correlation between testicular biopsies (prepubertal and postpubertal) and spermogram in cryptorchid men. *Hum Pathol* 2000;31:1022-1030.
179. **Nistal M, Santamaría L, Paniagua R.** Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat (Basel)* 1984;119:155-160.
180. **Nistal M, Santamaria L, Paniagua R, Regadera J.** Changes in the connective tissue and decrease in the number of mast cells in the testes of men with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis. *Acta Morphol Hung* 1986;34:107-115.
181. **Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, 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.
182. **Ochi H, Hirani WM, Yuan Q, Yuan Q, Friend DS, Austen KF, Boyce JA.** T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med* 1999;190:267-280.
183. **O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER.** Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001;22:289-318.
184. **184. Ohtsuka T.** Different interaction of mast cells with human endothelial cells and fibroblasts. *Eur J Dermatol* 2000;10:115-121.
185. **185. Olea N, Fernandez MF.** Chemicals in the environment and human male fertility. *Occup Environ Med* 2007;64:430-431.
186. **Ortega N, Werb Z.** New functional roles for noncollagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci* 2002;115:4201-4214.

187. **O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Monteiro A, Cassie S, Bhattacharya S, Fowler PA.** Developmental changes in human fetal testicular cell numbers and messenger ribonucleic acid levels during the second trimester. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4792-4801.
188. **Pajarinen JT, Karhunen PJ.** Spermatogenic arrest and 'Sertoli cell-only' syndrome-common alcohol-induced disorders of the human testis. *Int J Androl* 1994;17:292-299.
189. **Paniagua R, Martin A, Nistal M, Amat P.** Testicular involution in elderly men: comparison of histologic quantitative studies with hormone patterns. *Fertil Steril* 1987;47:671-679.
190. **Paniagua R, Martinez-Onsurbe P, Santamaria L, Saez FJ, Amat P, Nistal M.** Quantitative and ultrastructural alterations in the lamina propria and Sertoli cells in human cryptorchid testes. *Int J Androl* 1990;13:470-487.
191. **Paniagua R, Rodríguez MC, Nistal M, Fraile B, Regadera J, Amat P.** Changes in surface area and number of Leydig cells in relation to the 6 stages of the cycle of the human seminiferous epithelium. *Anat Embryol (Berl)* 1988;178:423-427.
192. **Papadas T, Batistatou A, Ravazoula P, Zolota V, Goumas P.** S-100 protein-positive dendritic cells and CD34-positive dendritic interstitial cells in palatine tonsils. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258:243-245.
193. **Papadopoulos V, Drosowsky MA, Carreau S.** In vitro effects of prolactin and dexamethasone on rat Leydig cell aromatase activity. *Andrologia* 1986;18:79-83.
194. **Paulozzi LJ.** International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Perspect* 1999;107:297-302.
195. **Payne AH.** Steroidogenic enzymes in Leydig cells. In: **Payne AH, Hardy MP** (eds). Contemporary endocrinology: the Leydig cell in health and disease. Humana Press. Totowa. 2009;pp:157-171.
196. **Perez-Moreno M, Avila A, Islas S, Sanchez S, Gonzalez-Mariscal L.** Vinculin but not alpha-actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium. *J Cell Sci* 1998;111:3563-3571.
197. **Pfeiffer DC, Vogl AW.** Evidence that vinculin is co-distributed with actin bundles in ectoplasmic ("junctional") specializations of mammalian Sertoli cells. *Anat Rec* 1991;231:89-100.
198. **Prener A, Engholm G, Jensen OM.** Genital anomalies and risk for testicular cancer in Danish men. *Epidemiology* 1996;7:14-19.
199. **Prockop DJ, Kivirikko KI.** Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995;64:403-434.
200. **Provost E, Rimm DL.** Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:567-572.
201. **Puliyel MM, Vyas GP, Mehta GS.** Testosterone in the management of cirrhosis of the liver: a controlled study. *Aust N Z J Med* 1977;7:17-30.
202. **Rajah R, Katz L, Nunn S.** Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog Growth Factor Res* 1995;6:273-284.
203. **Rather LJ.** Hepatic cirrhosis and testicular atrophy. *Arch Intern Med* 1947;80:397-402.
204. **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 fetuses, young adults, elderly men and patients with cryptorchidism. *Andrologia* 1993;25:115-122.
205. **Regadera J, Codesal J, Paniagua R, Gonzalez-Peramato P, Nistal M.** Immunohistochemical and quantitative study of interstitial and intratubular Leydig cells in normal men,

- cryptorchidism, and Klinefelter's syndrome. *J Pathol* 1991;164:299-306.
206. **Regadera J, Martínez-García F, González-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suárez-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;86:413-421.
207. **Regadera J, Nistal M, Paniagua R.** Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. Correlation of angiographic and histologic studies with systemic arteriosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:663-667.
208. **Richardson LL, Kleinman HK, Dym M.** Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol Reprod* 1995;52:320-330.
209. **Roaiha MM, Khatab H, Mostafa T.** Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia* 2007;39:185-189.
210. **Robinson LL, Sznajder NA, Riley SC, Anderson RA.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Mol Hum Reprod* 2001;7:641-648.
211. **Rommerts FF, 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.
212. **Ross MH, Long IR.** Contractile cells in human seminiferous tubules. *Science* 1966;153:1271-1273.
213. **Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH.** Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 1991;88:493-499.
214. **Salomon F, Hedinger CE.** Abnormal basement membrane structures of seminiferous tubules in infertile men. *Lab Invest* 1982;47:543-554.
215. **Salomon F, Saresmalani P, Jakob M, Hedinger CE.** Immune complex orchitis in infertile men. Immunoelectron microscopy of abnormal basement membrane structures. *Lab Invest* 1982;47:555-567.
216. **Santamaria L, Martinez-Onsurbe P, Paniagua R, Nistal M.** Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. *Int J Androl* 1990;13:135-146.
217. **Santoro G, Romeo C, Impellizzeri P, Gentile C, Anastasi G, Santoro A.** Ultrastructural and immunohistochemical study of basal lamina of the testis in adolescent varicocele. *Fertil Steril* 2000;73:699-705.
218. **Schell C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB, Mayerhofer A.** Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 2008;149:1678-1686.
219. **Schulze C.** On the morphology of the human Sertoli cell. *Cell Tissue Res* 1974;153:339-355.
220. **Schulze C.** Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1984;88:1-104.
221. **Seehofer D, Steinmueller T, Graef KJ, Rayes N, Wiegand W, Tullius SG, Settmacher U, Neuhaus P.** Pituitary function test and endocrine status in patient with cirrhosis of the liver before and after hepatic transplantation. *Ann Transplant* 2002;7:32-37.
222. **Setchell BP, Rommerts FFG.** The importance of the Leydig cells in the vascular response to hCG in the testis. *Int J Androl* 1985;8:436-440.
223. **Sezer C, Koksall IT, Usta MF, Gulkesen KH, Erdogru T, Ciftcioglu A, Baykara M.** Relationship between mast cell and iNOS expression in testicular tissue associated with infertility. *Arch Androl* 2005;51:149-158.
224. **Sharpe RM.** The roles of oestrogen in the male. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1998;9:371-377.
225. **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.
226. **Sharpe RM, Skakkebaek NE.** Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 2008;89:e33-38.
227. **Sierens JE, Sneddon SF, Collins F, Millar MR, Saunders PT.** Estrogens in testis biology. *Ann NY Acad Sci* 2005;1061:65-76.
228. **Silvestrini R.** La reviviscenza mammaria nell'uomo affetto da cirrosi del Laennec. *Riforma Med* 1926;42:701-704.
229. **Simoni M, Weinbauer GF, Gromoll J, Nieschlag E.** Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol (Paris)* 1999;60:102-106.
230. **Siu MK, Cheng CY.** Extracellular Matrix: Recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol Reprod* 2004;71:375-391.
231. **Siu MK, Lee WM, Cheng CY.** The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor-alpha, gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology* 2003;144:371-387.
232. **Skakkebaek NE.** Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. *Int J Androl* 2004;27:189-191.
233. **Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM.** Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;16:972-978.
234. **Stamenkovic I.** Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003;200:448-464.
235. **Steger K, Schimmel M, Wrobel KH.** Immunocytochemical demonstration of cytoskeletal proteins in seminiferous tubules of adult rams and bulls. *Arch Histol Cytol* 1994;57:17-28.
236. **Stelekati E, Orinska Z, Bulfone-Paus S.** Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology* 2007;212:505-519.
237. **Stocco DM.** The role of Star in Leydig cell steroidogenesis. In: **Payne AH, Hardy MP** (eds). Contemporary endocrinology: the Leydig cell in health and disease. Humana Press. Totowa. 2009;pp:149-155
238. **Strauss KI, Isaacs KR, Ha QN, Jacobowitz DM.** Calretinin is expressed in the Leydig cells of rat testis. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219:435-440.
239. **Streuli C.** Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:634-640.
240. **Suárez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J.** Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:350-358.
241. **Tanaka S, Togashi K, Rankinen T, Pérusse L, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Després JP, Bouchard C.** Sex differences in the relationships of abdominal fat to cardiovascular disease risk among normal-weight white subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:320-323.
242. **Tchougounova E, Lundquist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M, Pejler G.** A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 2005;280:9291-9296.
243. **Terasaki T, Nowlin DM, Pardridge WM.** Differential binding of testosterone and estradiol to isoforms of sex hormone-binding globulin: selective alteration of estradiol binding in cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:639-643.
244. **Timpl R.** Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:618-624.
245. **Timpl R, Brown JC.** Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 1996;18:123-132.

246. **Toppiari J, Kaleva M, Virtanen HE.** Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Hum Reprod Update* 2001;7:282-286.
247. **Toppiari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jégou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Müller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE.** Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104:741-803.
248. **Toppiari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE.** Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88:910-919.
249. **Toppiari J, Virtanen H, Skakkebaek NE, Main KM.** Environmental effects on hormonal regulation of testicular descent. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102:184-186.
250. **Toran-Allerand CD.** Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1052:136-144.
251. **Toyama Y.** Actin-like filaments in the myoid cell of the testis. *Cell Tissue Res* 1977;177:221-226.
252. **Van de Rijn M, Rouse RV.** CD34. A review. *Appl Immunohistochem* 1994;2:71-80.
253. **Van der Molen HJ, Bakker GH, Rommerts FFG.** Biochemical actions of luteinizing hormone in the regulation of testicular steroid production. In: **D'Agata R, Lipsett MB, Polosa P, Van der Molen HJ** (eds). Recent advances in male reproduction: molecular basis and clinical implications. Raven Press. New York. 1983;pp:91-100.
254. **Van Thiel DH, Caraceni P, De Maria N, Nadir A, Hassanein T, Nadir F.** Panhypopituitarism in two cirrhotics: clinical presentation and liver disease associations. *J Okla State Med Assoc* 1995;88:299-304.
255. **Van Thiel DH, Gavalier JS, Spero JA, Egler KM, Wright C, Sanghvi AT, Hasiba U, Lewis JH.** Patterns of hypothalamic-pituitary-gonadal dysfunction in men with liver disease due to differing etiologies. *Hepatology* 1981;1:39-46.
256. **Van Thiel DH, Lester R, Sherins RJ.** Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. *Gastroenterology* 1974;67:1188-1199.
257. **Van Thiel DH, Lester R, Vaitukaitis J.** Evidence for a defect in pituitary secretion of luteinizing hormone in chronic alcoholic men. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:499-507.
258. **Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnion F, Lobaccaro JM, Volle DH.** Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:150-161.
259. **Villalta J, Ballescà JL, Nicolás JM, Martínez de Osaba MJ, Antúnez E, Pimentel C.** Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:128-133.
260. **Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM.** Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr* 2007;96:611-666.
261. **Virtanen HE, Cortes D, Rajpert-De Meyts E, Ritzén EM, Nordenskjöld A, Skakkebaek NE, Toppari J.** Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. *Acta Paediatr* 2007;96:622-627.
262. **Virtanen HE, Rajpert-De Meyts E, Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J.** Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207:501-505.
263. **Virtanen I, Kallojoki M, Narvanen O.** Peritubular myoid cells of human and rat

- testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments. *Anat Rec* 1986;215:10-20.
264. **Vogl AW, Pfeifer DC, Mulholland D, Kimel G, Guttman J.** Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Arch His Cytol* 2000;63:1-15.
265. **Volkman J, Müller D, Feuerstacke C, Kliesch S, Bergmann M, Mühlfeld C, Middendorff R.** Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. *Hum Reprod* 2011;26:1450-1461.
266. **Vu TH, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14:2123-2133.
267. **Wang CQF, Cheng CY.** A seamless trespass: germ cell migrations across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *J Cell Biol* 2007;178:549-556.
268. **Weidner IS, Møller H, Jensen TK, Skakkebaek NE.** Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J Urol* 1999;161:1606-1609.
269. **Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E.** Physiology of Testicular Function. In: **Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S** (eds). *Andrology. Male Reproductive Health and dysfunction*. 3rd edition. Springer Verlag. Berlin. 2010;pp:11-21.
270. **Weinbauer GF, Wessels J.** 'Paracrine' control of spermatogenesis. *Andrologia* 1999;31:249-262.
271. **Welter H, Köhn FM, Mayerhofer A.** Mast cells in human testicular biopsies from patients with mixed atrophy: increased numbers, heterogeneity, and expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin D2 synthase. *Fertil Steril* 2011;96:309-313.
272. **Wohlfahrt-Veje C, Main KM, Skakkebaek NE.** Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;71:459-465.
273. **Yamazaki K, Eyden BP.** Ultrastructural and immunohistochemical observations on intralobular fibroblasts of human breast, with observations on the CD34 antigen. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1995;27:309-323.
274. **Yamazaki K, Eyden BP.** Ultrastructural and immunohistochemical studies of stromal cells in lamina propria of human fallopian tube ampullar mucosa: the recognition of 'CD34 positive reticular network' and its putative function for immune surveillance. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;28:325-337.
275. **Yamazaki K, Eyden BP.** Ultrastructural and immunohistochemical studies of intralobular fibroblasts in human submandibular gland: the recognition of "CD34 positive reticular network" connected with gap junction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;28:471-483.
276. **Yamazaki K, Eyden BP.** Interfollicular fibroblasts in the human thyroid gland: recognition of a CD34 positive stromal cell network communicated by gap junctions and terminated by autonomic nerve endings. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997;29:461-476.
277. **Yamazawa K, Wada Y, Sasagawa I, Aoki K, Ueoka K, Ogata T.** Mutation and polymorphism analyses of INSL3 and LGR8/GREAT in 62 Japanese patients with cryptorchidism. *Horm Res* 2007;67:73-76.
278. **Ylikahri R, Huttunen M, Harkonen M, Sevderling U, Onikki S, Karonen SI, Adlercreutz H.** Low plasma testosterone values in men during hangover. *J Steroid Biochem* 1974;5:655-658.
279. **Zaitso M, Narita S, Lambert KC, Grady JJ, Estes DM, Curran EM, Brooks EG, Watson CS, Goldblum RM, Midoro-Horiuti T.** Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx. *Mol Immunol* 2007;44:1977-1985.

280. **Zifroni A, Schiavi RC, Schaffner F.** Sexual function and testosterone levels in men with nonalcoholic liver disease. *Hepatology* 1991;14:479-482.