

ACCIÓ DELS ANDRÒGENS EN EL TESTICLE: UN PAPER PER A LA MEIOSI

CARLOS A. SUAREZ-QUIAN,¹ JAVIER REGADERA,² MANUEL NISTAL,^{2,3}
PILAR GONZÁLEZ-PERAMATO,² ÁLVARO SERRANO,⁴ OSCAR M. TIRADO,⁵ DAVID M. SELVA,⁵
NÚRIA TORAN,⁶ FRANCINA MUNELL⁵ I JAUME REVENTÓS⁵

¹ *Department de Biologia Cel·lular, Georgetown University Medical Center.*

² *Departament de Morfologia, Universitat Autònoma de Madrid.*

³ *Departament d'Urologia, Hospital de Guadalajara.*

⁴ *Departament de Patologia, Hospital La Paz.*

⁵ *Unitat de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.*

⁶ *Departament de Patologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron.*

Adreça per a la correspondència: Carlos A. Suarez-Quian. Department of Cell Biology, Georgetown University Medical Center. 3900 Reservoir Road NW, Washington DC, 20057, EUA. Adreça electrònica: suarez@georgetown.edu.

RESUM

La funció que duen a terme els andrògens en l'espermatogènesi és, encara en certa mesura, enigmàtica: mentre que llur implicació és absolutament vital en la iniciació i en el manteniment del procés espermatogènic normal, la seva funció específica encara no està definida de manera precisa. Els andrògens, com les altres hormones esteroïdals, actuen a través del seu corresponent receptor anomenat *receptor d'andrògens* (AR). Fins avui, no hi ha gaire evidència que recolzi l'existència de diverses isoformes de l'AR com en el cas del sistema estrògens-receptor d'estrògens. Per tant, la pregunta de com els andrògens duen a terme la seva acció en l'espermatogènesi s'ha d'abordar definint dos processos: en primer lloc, s'han d'identificar amb total certesa els tipus cel·lulars testiculars capaços de respondre directament a l'estimulació androgènica. De manera específica, la qüestió per resoldre és quins són els tipus cel·lulars que expressen l'AR en el testicle. En segon lloc, sabent també que el complex del lligand unit a l'AR actua com a factor de transcripció, caldrà determinar quins són els gens que estaran activats o reprimits en les cèl·lules que tenen AR en resposta a l'estimulació androgènica. Fins que aquestes dues preguntes no estiguin contestades amb tota certesa, el mecanisme pel qual els andrògens regulen l'espermatogènesi serà, en el millor dels casos, especulatiu. En aquesta revisió presentem evidència que els andrògens actuen únicament a les cèl·lules somàtiques del testicle, com són les cèl·lules de Sertoli, les de Leydig, les mioïdes peritubulars i les cèl·lules del múscul llis que envolten els vasos sanguinis. A més a més, també discutim la possibilitat que els andrògens siguin indispensables per a l'inici de la meiosi, encara

que continua essent desconegut el mecanisme pel qual els andrògens actuen en aquest procés.

Paraules clau: receptor d'andrògens, testicle, cèl·lula de Sertoli, cèl·lula de Leydig, cèl·lula germinal, meiosi.

SUMMARY

The role that androgens play in spermatogenesis still remains enigmatic: whereas their involvement is absolutely vital to the initiation and maintenance of the normal spermatogenic process, their specific role is yet to be defined. Androgens, like other steroid hormones, act via their corresponding receptor termed the androgen receptor (AR). To date, there is little evidence to support the notion that there are multiple forms of AR as is the case for the estrogen-estrogen receptor system. Thus, the question of how androgens manifest their action on spermatogenesis becomes one of defining two processes: First, the cell types within the testis that are capable of responding directly to androgen stimulation must be identified with absolute certainty. Specifically, this question can be stated as what cell types in the testis express AR. Second, given that the ligand-bound AR serves as a transcription factor, the question then becomes what are the genes turned on or off in AR positive cells in response to androgen stimulation? Until these two questions are unequivocally answered, the mechanism of how androgens regulate spermatogenesis will remain speculative at best. In this review we present evidence that androgens act solely at the level of the somatic cells of the testis, including Sertoli cells, Leydig cells, peritubular myoid cells and smooth muscle cells surrounding blood vessels. In addition, we discuss the likely possibility that androgens are indispensable for the onset of meiosis, albeit how they accomplish this remains a mystery.

Keywords: androgen receptor, testicle, Sertoli cell, Leydig cell, germinal cell, meiosis.

ANDRÒGENS I ESPERMATOGÈNESI

L'objectiu del procés espermatogènic és convertir espermatogònies arrodonides en espermatozoides aerodinàmics capaços de fecundar òvuls. Atesa la complexitat del procés espermatogènic, de seguida vénen al cap dues preguntes: primer, com es regula aquest extraordinari procés?; segon, quines són les rutes indispensables que ajuden a mantenir el funcionament normal d'aquest procés?

Pel que fa a la primera qüestió, durant la darrera cinquantena d'anys s'han publicat milers d'articles, i se'n continuen publicant, que descriuen les rutes particulars de les hormones i els factors de creixement implicats en la regulació de l'espermatogènesi. Les evidències són més convincentes per a uns que per

a altres, però atesa aquesta abundància d'informació, resta clar que encara no coneixem gaire el nombre de mecanismes que regulen l'espermatogènesi. Tanmateix, i pel que fa a la segona qüestió, hi ha proves experimentals convincents que mostren que una ruta de senyalització és realment indispensable per al procés espermatogènic, i aquesta és la ruta androgènica.

Es coneix de fa temps que l'espermatogènesi normal en mamífers suposa un balanç delicat entre la proliferació cel·lular i la mort cel·lular programada (Print i Loveland, 2000), un fenomen governat pels andrògens de les cèl·lules de Leydig sota la regulació de la LH de la pituitària (vegeu la figura 1) (Zirkin, 1998). La testosterona de les cèl·lules de Leydig activa al seu torn els receptors d'andrògens,

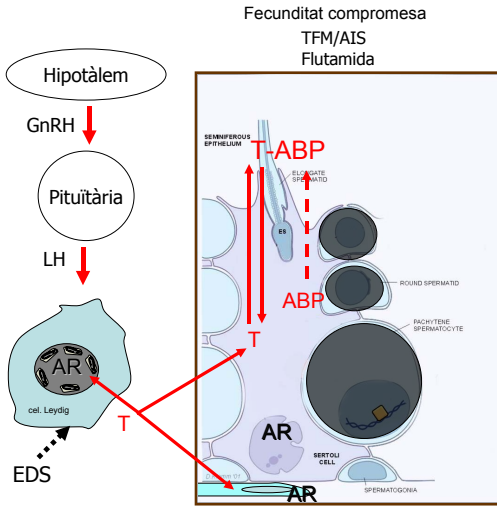


FIGURA 1. Esquema simplificat del control hormonal de l'espermatogènesi mitjançant andrògens. La inducció de testosterona a la cèl·lula de Leydig (T) és regulada per la LH de la pituitària que, al seu torn, és controlada per la GnRH de l'hipotàlem. La testosterona s'uneix al receptor d'andrògens (AR), localitzat en les cèl·lules de Leydig, Sertoli i les mioïdes peritubulars, i l'activa. La testosterona de les cèl·lules de Leydig també s'uneix a la proteïna d'unió a andrògens (ABP), que regula la concentració lliure de T a través de la unió (T-ABP). El tractament de les rates adultes amb EDS destrueix les cèl·lules de Leydig i provoca la disminució de la T intratesticular i una disminució de la fertilitat. Quan es suprimeix l'activitat de l'AR, ja sigui per insensibilitat androgènica o per tractament amb flutamida, la fertilitat es veu seriosament malmesa.

que actuen com un factor de transcripció per a iniciar una certa quantitat de programes cel·lulars (Wilson *et al.*, 2002). La regulació androgènica de l'espermatogènesi no es limita al control dels nivells d'andrògens en circulació, sinó que també suposa una homeòstasi androgènica definida i complexa que necessita andrògens, la proteïna d'unió als andrògens (ABP) i el receptor d'andrògens (AR). Cal tenir en compte també que la concentració adequada de testosterona per a mitjançar i mantenir els efectes androgènics no depèn de la testosterona total, sinó de la testosterona lliure (probablement en funció dels nivells d'ABP) disponible dins l'epiteli seminífer (Munell *et al.*, 2002). Qualsevol pertorbació d'aquesta homeòstasi, tant si és deguda a la disminució de

la producció de testosterona de les cèl·lules de Leydig —per exemple, amb el tractament amb EDS que les elimina (Henriksen *et al.*, 1995; Nandi *et al.*, 1999; Woolveridge *et al.*, 1999)—, com a l'increment dels nivells d'ABP —com en el ratolí transgènic per a ABP que té nivells disminuïts de testosterona lliure (Selva *et al.*, 2000, 2004)—, o a la disminució de l'activitat de l'AR —com en la síndrome d'insensibilitat parcial als andrògens (Lamb, 1995; Lamb *et al.*, 2001; Mifsud *et al.*, 2001)—, o a l'exposició a agents que disminueixen experimentalment l'activació de l'AR —per exemple, flutamida (Meachem *et al.*, 1997; O'Donnell *et al.*, 1999; Kassim *et al.*, 1997; Omezzine *et al.*, 2003)—, posa en perill la fertilitat masculina. Així, una conclusió que es pot extreure del gran nombre d'evidències acumulades durant els darrers trenta anys és que una espermatogènesi normal suposa un procés que només podrà avançar si es manté una homeòstasi androgènica normal. Tanmateix, tot i que hi ha consens general en el fet de que els andrògens tenen un paper essencial, si no el principal, en l'inici i el manteniment de l'espermatogènesi quantitativa, el mecanisme mitjançant el qual això es duu a terme encara és bastant desconegut (Zirkin, 1998).

Els andrògens, com qualsevol altra hormona esteroïdal, actuen sobre les cèl·lules quan s'uneixen al seu receptor respectiu, moment en el qual el complex hormona-receptor migra al nucli, on actua com a factor de transcripció (Beato *et al.*, 1995). Llavors, suposadament, un mecanisme mitjançant el qual els andrògens controlen l'espermatogènesi és la regulació de la síntesi *de novo* de proteïnes en les cèl·lules que responen als andrògens. Atesa la necessitat de mantenir l'homeòstasi androgènica perquè l'espermatogènesi avanci, i coneixent com funcionen els andrògens, per tal d'entendre com regulen aquest procés cal respondre dues preguntes: primera, quins són els gens concrets del testicle regulats pels andrògens?, i segona, quins són els tipus cel·lulars del testicle

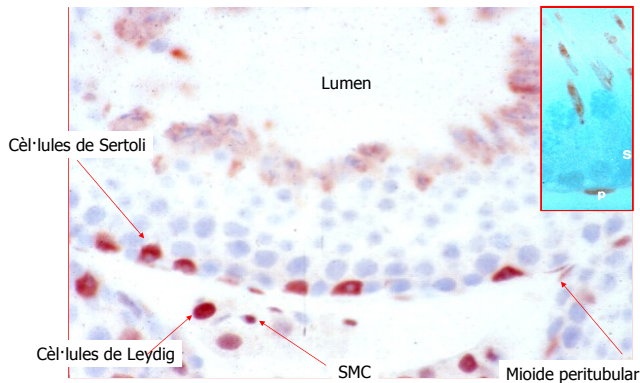


FIGURA 2. Localització immunohistoquímica del receptor d'andrògens (AR) en el testicle. L'AR és present al nucli de les cèl·lules de Sertoli, les cèl·lules mioides peritubulars i les cèl·lules de Leydig. Les espermatides allargades de l'estadi 11 (a dins) també mostren tinció específica. (Figura basada en Vornberger *et al.*, 1994.)

capaços de respondre directament als andrògens?

La resposta a la primera pregunta és força simple. Tot i que ha estat el tema de recerca de diversos grups des de fa anys, els gens regulats pels andrògens no s'han començat a conèixer fins fa poc (Zhou *et al.*, 2005). Tanmateix, encara no coneixem bé com encaixen aquests gens en la regulació androgènica de l'espermatogènesi. Així, la resposta més simple per a aquesta qüestió és que totes les proves menen a considerar que l'homeòstasi androgènica és imprescindible per a l'espermatogènesi normal, però encara no sabem com es regula tot el procés. En contrast amb això, ja fa uns quants anys, ens vam proposar d'investigar la resposta més accessible a la segona pregunta cercant com s'expressava el receptor d'andrògens en el testicle. En aquesta revisió proporcionem els nostres resultats, que confirmen que l'acció androgènica en l'espermatogènesi és mitjançada a través del component somàtic testicular, i que és poc probable que vinculi directament la població de cèl·lules germinals.

LLOCS D'ACCIÓ ANDROGÈNICA

La història d'on exerceixen els andrògens l'efecte directe en el testicle és llarga i controvertida. Basada sobretot en consideracions teòriques (dutes a terme per la genetista Mary Lyons, en el treball de la qual dos ratolins químicis de tipus *tfm*/salvatge resultaven fèrtils i capaços de passar el gen *tfm* a la descendència, suposadament perquè les cèl·lules de Sertoli de tipus salvatge podien compensar la manca d'AR funcional de l'esperma *tfm*), Fritz va suggerir que els andrògens manifestaven els seus efectes únicament a les cèl·lules somàtiques (Fritz, 1978). Els estudis immunohistoquímics (IHC) inicials portats a terme per Wilson, French i col·laboradors semblaven corroborar les destacades hipòtesis de Fritz (Sar *et al.*, 1990). Els estudis següents, tant en el nostre laboratori com en el d'altres, però, tornaren a plantejar la controvèrsia sobre si les cèl·lules germinals mostraven immunopositivitat per a AR (Vornberger *et al.*, 1994). Vam utilitzar un anticòs específic per a un pèptid d'AR, purificat per afinitat, generat per Gail Prins (1991) i, mentre que les cèl·lules somàtiques testiculars mostraven tinció nuclear, vam demostrar també que hi havia immunotinció específica en el nucli de l'estadi 11è de

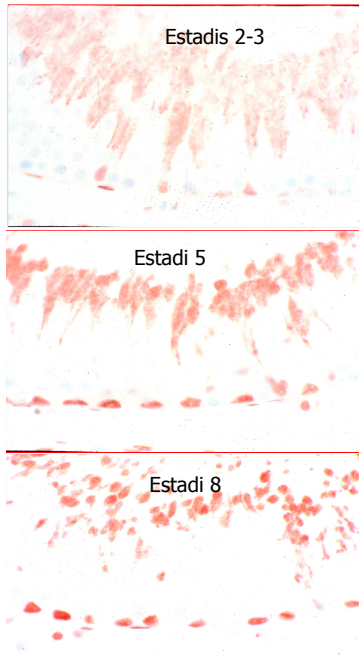


FIGURA 3. Immunolocalització d'AR específica d'estadi en l'epiteli seminífer de rata. La intensitat de la immunotinció d'AR en els nuclis de cèl·lules de Sertoli dels estadis 2-3 al 8. Els estadis 9-14 no mostren tinció d'AR en les cèl·lules de Sertoli. (Figura basada en Vornberger *et al.*, 1994.)

les espermatides allargades (cèl·lules que han experimentat l'elongació nuclear però encara han de completar la condensació; vegeu la figura 2). Així, en teoria, les cèl·lules germinals que mostraven tinció AR positiva podien ser encara actives transcripcionalment. A més, la tinció AR es va detectar també en el citoplasma de les espermatides allargades dels estadis 12-19 (vegeu la figura 2). De manera significativa, una sèrie extensiva d'estudis control, incloent-hi anàlisis per Western blot, va demostrar que els resultats de l'IHC eren específics (Vornberger *et al.*, 1994). Altres investigadors, utilitzant diferents antisèrums i protocols d'IHC, no van obtenir resultats semblants (Bremner *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2002), encara que cal destacar que el nostre grup no va ser l'únic que va informar que les cèl·lules

germinals eren immunoreactives per a AR: Kimura *et al.* (1993) i Zhou *et al.* (1996), fent servir anticossos diferents dels nostres, van detectar immunopositivitat per a AR en cèl·lules germinals, encara que en estadis menys diferenciats. El que calia per a deixar resolt aquest assumpte era una hibridació *in situ* d'àcids nucleics completa, però, tot i que diversos investigadors ho van provar (Shan *et al.*, 1995), la interpretació sense ambigüitats dels resultats d'aquesta aproximació experimental no es va aconseguir. De fet, avui dia encara està per fer la hibridació *in situ* de l'àcid nucleic de l'mRNA de l'AR al testicle.

Probablement, l'observació més fascinant sobre la tinció nuclear de les cèl·lules de Sertoli fou que la intensitat de la tinció variava en funció del cicle de l'epiteli seminífer (vegeu la figura 3). Per exemple, en estadis primerencs del cicle, la intensitat de la immunotinció de l'AR era feble, però esdevenia més forta en estadis més tardans, i finalment culminava amb el senyal més fort en l'estadi 8è, moment en què tenia lloc l'espermiació. És interessant veure com la intensitat de tinció també coincidia amb els estadis que semblaven més susceptibles a la pertorbació de l'homeòstasi androgènica. És a dir, si destruïm les cèl·lules de Leydig amb EDS, el primer estadi que demostraria la mort de les cèl·lules germinals per apoptosi seria el 8è.

El desenvolupament d'un protocol d'IHC (basat en l'amplificació amb biotina) que augmentava la sensibilitat del senyal de tinció i minimitzava el soroll de fons potencial, ens va portar a reconsiderar si la tinció d'AR de les cèl·lules germinals podia ser un artefacte (Suarez-Quian *et al.*, 1999). En aquest protocol l'anticòs primari es dilueix fins a un nivell en què es conserva el senyal intens i específic, a costa de perdre el senyal no específic. Els resultats de la utilització d'aquest mètode ens van portar a concloure que la tinció citoplasmàtica de les cèl·lules germinals de què s'havia informat prèviament era probablement el resultat d'un senyal no específic (vegeu la figura 4).

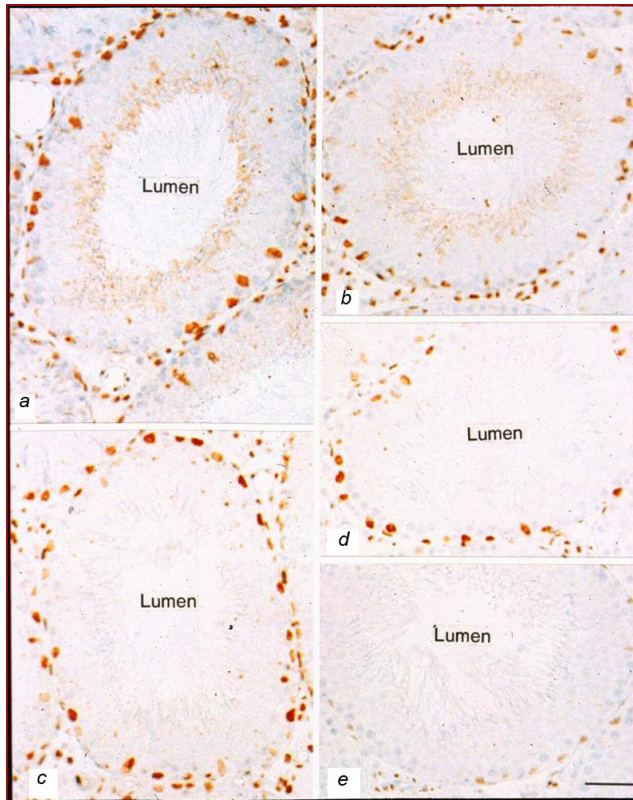


FIGURA 4. Immunolocalització d'AR en l'epiteli seminífer de la rata amb la utilització d'un mètode d'IHC millorat. La distribució d'AR en el túbul seminífer fou reavaluada utilitzant un mètode d'amplificació amb biotina (Suarez-Quian *et al.*, 1999). Els plafons a-e representen la immunotinció d'AR amb l'antisèrum cada cop més diluït. Noteu que en els plafons a i b el senyal d'immunotinció es pot detectar al lumen, que es correspon amb la localització de les cèl·lules germinals, juntament amb la tinció positiva per a AR en els nuclis de les cèl·lules de Sertoli i de les cèl·lules peritubulars. Quan la concentració d'antisèrum es redueix, només les cèl·lules de Sertoli i les peritubulars conserven la tinció positiva per a l'AR.

L'alta sensibilitat del protocol IHC d'amplificació amb biotina ens va portar a investigar si la intensitat de la remarcable immunotinció d'AR observada en rates que variava en funció del cicle de l'epiteli seminífer també era present en el testicle humà. De fet, s'ha treballat molt sobre el fet que l'espermatogènesi en rosegadors està altament organitzada d'acord amb un sistema d'associacions cel·lulars anomenades *estadis*, i aquests s'organitzen alhora en el temps i en l'espai. Tal com es mostra a la

figura 3 per a l'AR, i en molts altres estudis, altres gens i proteïnes s'expressen de manera semblant amb especificitat d'estadi en el testicle dels rosegadors, i aquestes observacions són d'importància inqüestionable (Parvinen, 1982). No és clar, però, que aquest fenomen tingui lloc en totes les espècies, ja que no s'ha observat en els testicles de primats.

El testicle humà està organitzat, semblantment, en associacions específiques de cèl·lules, i tret de la secció transversal en un túbul

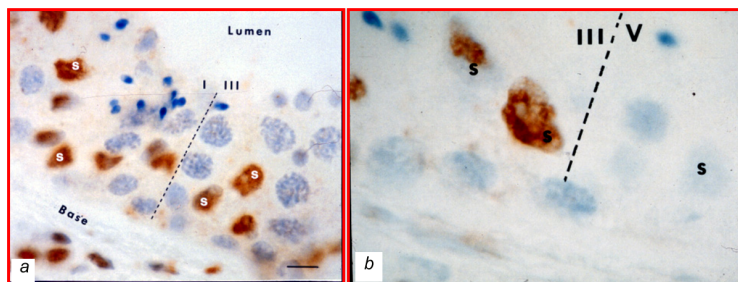


FIGURA 5. Localització immunohistoquímica de l'AR en el testicle humà. Utilitzant una alta concentració d'antisèrum, tots els nuclis de les cèl·lules de Sertoli es tenyeixen positivament per a AR (plafó a). A concentracions antisèriques limitants, la tinció AR del nucli de les cèl·lules de Sertoli apareix en funció del cicle de l'epiteli seminífer. (Figura basada en Suarez-Quian *et al.*, 1999.)

únic, es detecten diferents associacions cel·lulars. Mitjançant una aproximació immunohistoquímica, vam investigar si l'expressió de l'AR en testicles adults depenia del cicle de l'epiteli seminífer. Quan s'utilitzaven concentracions saturants d'anticòs per a detectar l'AR, tal com es veu a la figura 4a, cada nucli de les cèl·lules de Sertoli que es trobava en una secció particular del teixit esdevenia positiu per a AR, cosa que suggeria que, al contrari que en els rosegadors, no hi havia especificitat d'estadi en l'expressió de l'AR. En contrast amb això, quan s'utilitzava el mètode IHC d'amplificació amb biotina, estenent les concentracions funcionals de l'antisèrum, es podia determinar que en la mateixa secció, fins i tot dins els mateixos túbuls, la tinció per l'AR era diferencial en les cèl·lules de Sertoli humanes, en paral·lisme estret amb la intensitat de tinció d'AR observada en rosegadors. Per a coneixença nostra, aquesta era la primera vegada que s'informava de l'existència d'especificitat d'estadi per a una proteïna coneguda en l'epiteli seminífer humà. Així, el nostre estudi confirma que la ruta de senyalització indispensable que es necessita per a una espermatogènesi normal s'expressa de manera semblant, específica d'estadi, en el testicle humà, tal com té lloc en tots els testicles de rosegadors estudiats fins al moment (Suarez-Quian *et al.*, 1999).

AR EN EL TESTICLE HUMÀ CRIPTÒRQUID

La incidència del criptorquidisme en humans és un fenomen progressivament creixent. La seva etiologia encara és molt desconeguda, encara que s'ha associat a la interrupció de les rutes androgèniques normals durant els estadis fetals provocades per tòxics ambientals (Skakkebaek *et al.*, 2001). En contrast amb això, en rosegadors, un informe recent proporciona evidències que la disrupció del gen *Insl-3* condueix al criptorquidisme bilateral (Nef i Parada, 1999). Utilitzant una col·lecció única d'arxiu de testicles criptòrquids solts de trenta-set pacients, vam examinar la distribució de l'AR en cèl·lules de Sertoli humanes (Regadera *et al.*, 2001). Els resultats eren clars pel fet que la intensitat de la tinció per a AR en les cèl·lules de Sertoli era funció de la intensitat de la disgegèsi de les cèl·lules de Sertoli (vegeu la figura 6). Era poc probable que les cèl·lules de Sertoli que mostraven més disgegèsi fossin positives per a AR (vegeu la figura 6d). Més interessant encara era el fet que la immunotinció d'AR per a les cèl·lules de Sertoli coincidia amb la maduració de les cèl·lules germinals en els túbuls positius per a AR. És a dir, en general, els espermatòcits en fase de paquítes es detectaven clarament en els túbuls que mostraven immunotinció per a AR, però eren absents en

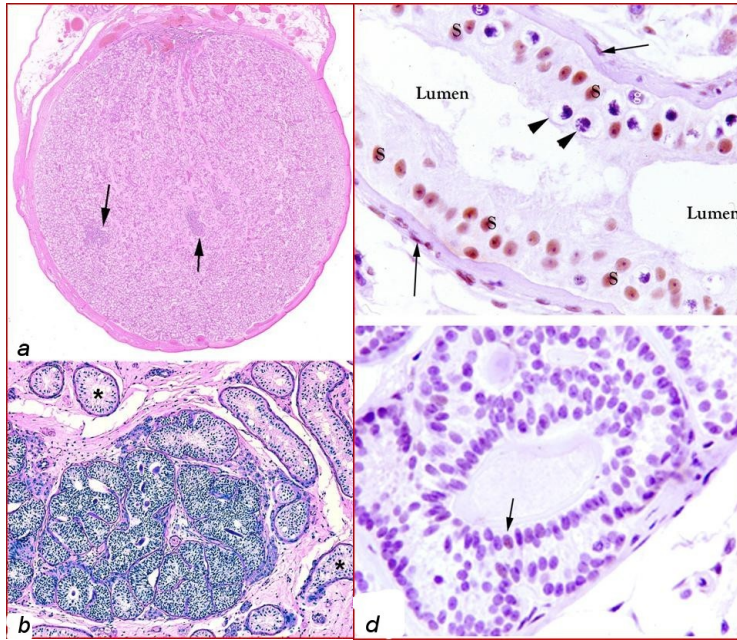


FIGURA 6. Localització immunohistoquímica en testicles humans criptòrquids. Es van recollir diversos testicles criptòrquids solts i es van examinar mitjançant immunotinció per a l'AR. Dins el mateix testicle es podien distingir àrees focals amb gran disgenèsia de les cèl·lules de Sertoli (plafons *a* i *b*). La tinció nuclear d'AR en les cèl·lules de Sertoli en els testicles criptòrquids era una funció del desenvolupament de la cèl·lula; els túbuls que mostraven cèl·lules de Sertoli positives a l'AR contenien cèl·lules germinals, algunes tan madures com els espermatòcits en fase de paquitè (caps de fletxa). En contrast amb això, l'absència de tinció d'AR coincidí significativament amb l'absència de cèl·lules germinals (plafó *d*). (Figura adaptada de Regadera *et al.*, 2001.)

els túbuls negatius per a AR. Encara que el procés espermatogènic no s'assolia completament en els testicles criptòrquids, la presència d'AR podia permetre el desenvolupament almenys fins a l'estadi de paquitè. Aquest va ser el nostre primer indicatiu d'un paper potencial per a una homeòstasi androgènica apropiada en el testicle; és a dir, era necessari perquè les cèl·lules germinals poguessin assolir la primera divisió meiótica.

Aquests resultats ens van fer concloure que el criptorquidisme humà, almenys en el cas dels testicles criptòrquids únics, no és probable que sigui ocasionat per la pèrdua d'un sol gen, tal com ocorre en el ratolí genoanulat per al gen *Insl3*. A més, aquests resultats

suggereixen que el criptorquidisme humà és probablement un esdeveniment multifactorial i que, des d'un punt de vista pràctic, aquestes observacions poden justificar l'existència d'una infecunditat major en el testicle descendent de l'individu criptòrquid per a un testicle (Skakkebaek *et al.*, 2001). Tanmateix, aquest requisit multifactorial per a l'espermatogènesi normal també pot destacar un altre punt rellevant pel que fa a la ruta androgènica en l'espermatogènesi. És a dir, que la ruta androgènica normal també pot estar deteriorada i, fins i tot si es duu a terme l'orquidopèxia, l'espermatogènesi normal no s'esdevindrà.

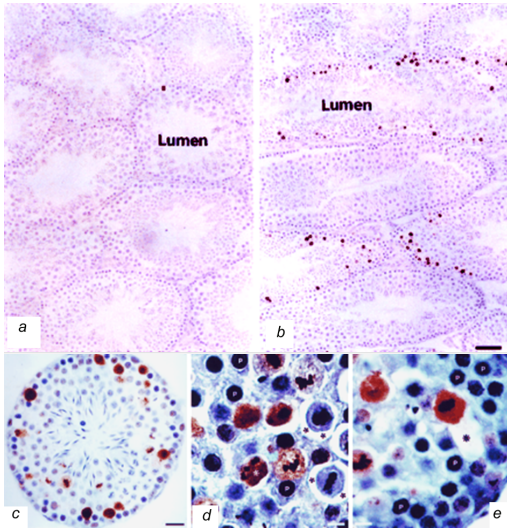


FIGURA 7. Assaig de TUNEL en el testicle del ratolí transgènic per a l'ABP. Les cèl·lules germinals que moren per apoptosi s'evidencien amb la tècnica de TUNEL en el testicle del ratolí control (a) i del transgènic (b). L'increment de l'apoptosi és evident en el plafló b. La identitat de les cèl·lules que moren per apoptosi es correspon a espermatòcits primaris en fase de paquitè en els plafons d i e. (Figura adaptada de Selva *et al.*, 2000.)

LA PROTEÏNA D'UNIÓ ALS ANDRÒGENS

Tal com es va comentar a la figura 1, la marca distintiva de l'espermatogènesi normal és el fet que el procés només pot avançar si es manté l'adequada homeòstasi androgènica. Aquest procés comporta el funcionament apropiat de la testosterona de les cèl·lules de Leydig amb l'AR de les cèl·lules de Sertoli. La concentració de testosterona local, tanmateix, és regulada probablement en part per l'ABP de les cèl·lules de Sertoli. Qualsevol pertorbació en l'homeòstasi androgènica posa en perill la fertilitat. Amb aquesta finalitat, es va desenvolupar un model animal de ratolí en què el gen ABP de la rata s'incorporava específicament dins les cèl·lules de Sertoli, i es va utilitzar per a avaluar-ne els efectes en cèl·lules espermatogèniques (Selva *et al.*, 2000, 2004). En aquest model, el transgèn ABP de la rata fa que el nivell de testosterona lliure disminu-

eixi. El més aparent en aquest ratolí transgènic era que la terminació de la primera divisió meiótica es veia significativament perjudicada, tal com es demostrava amb l'increment de la tinció per l'assaig de TUNEL en el testicle del ratolí transgènic (vegeu la figura 7). A més augment, es veia clarament que la tinció per TUNEL marcava preferentment espermatòcits que no havien pogut completar la primera divisió meiótica. Això ens va fer especular que la sobreexpressió del gen ABP en els testicles de ratolí comportava canvis en la concentració local de testosterona lliure i s'associava amb una terminació defectuosa de la primera divisió meiótica dels espermatòcits en fase de paquitè (Selva *et al.*, 2000).

Hi ha proves addicionals que demostren que l'homeòstasi androgènica té un paper important en l'assoliment de la primera divisió meiótica, com és la distribució de la immunotinció d'AR en cèl·lules de Sertoli postnats (vegeu la figura 8). Tal com s'illustra en aquesta figura, l'AR no s'expressa en les cèl·lules de Sertoli fins aproximadament els dies 15 a 20 postnats, precisament el temps en què la barrera hematotesticular permet l'escomesa meiótica. Més recentment, i de manera consistent amb aquesta hipòtesi, dos grups han mostrat, fent servir un model de ratolí genòanulat condicional per l'AR en les cèl·lules de Sertoli, que l'espermatogènesi es bloqueja a l'acabament de la primera divisió meiótica (De Gendt *et al.*, 2004; Holdcraft i Braun, 2004).

Tanmateix, agafades conjuntament, aquestes quatre línies d'evidència —a) la tinció positiva d'AR en testicles criptòrquids s'associa a la maduració de les cèl·lules germinals fins a la primera divisió meiótica, b) els animals transgènics per a l'ABP mostren una apoptosi incrementada en cèl·lules germinals i també un acabament malmès de la primera divisió meiótica, c) els estudis d'immunolocalització de l'AR en testicle postnatal demostren que no apareix en cèl·lules de Sertoli fins que no comença la meiosi i d) el ratolí genòanulat condicional de l'AR en cèl·lules de Sertoli

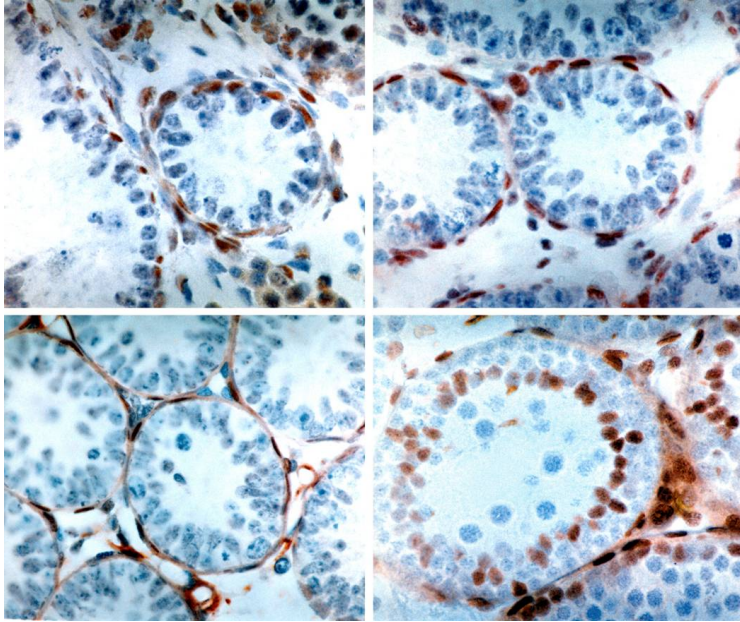


FIGURA 8. Immunotinció d'AR en testicles postnats. Es mostra la distribució d'AR durant el desenvolupament dels túbuls seminífers en els dies 5, 10, 15 i 20 postnats. Noteu que l'AR és present en les cèl·lules peritubulars en totes les edats, però no apareix en les cèl·lules de Sertoli fins aproximadament el dia 15, i no és prominent fins el dia 20. En aquesta darrera edat, la barrera hematotesticular és present i es pot completar la meiosi.

mostra una incapacitat per a completar la primera divisió meiótica— porten a la conclusió que una de les accions de la ruta androgènica normal és ajudar a l'acabament de la primera divisió meiótica.

Concloure que l'AR de les cèl·lules de Sertoli és necessari per a l'acabament de la meiosi, tanmateix, no ens ha de portar a extrapolar que la presència d'AR en altres cèl·lules somàtiques del testicle no és igual d'important. De fet, es pot especular que la presència d'AR en aquests altres tipus cel·lulars, en particular les cèl·lules mioides peritubulars, pot ser necessari per a la seva formació i diferenciació. L'AR, per exemple, és present en cèl·lules mioides peritubulars des del moment en què es formen a l'úter, i els nivells sembla que es mantenen constants durant la vida adulta (vegeu la figura 8). A més, sembla que no hi ha cap variació en els nivells d'AR en funció del cicle semi-

nífer (compareu les figures 3, 4 i 8). De fet, és clar que fins i tot si arribéssim a entendre completament com funciona l'AR en les cèl·lules de Sertoli, la comprensió completa de com regula l'AR l'espermatogènesi hauria d'esperar fins que l'activitat d'altres cèl·lules intratesticulars que responen a l'AR fos més coneguda. En relació a aquest punt, hem començat a utilitzar recentment models animals per tractar de desxifrar els papers addicionals de l'homeòstasi androgènica en el testicle.

DISRUPCIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE L'AR AMB ÀCID METOXIACÈTIC

L'àcid metoxiacètic és el metabòlit tòxic principal del metoxietanol (ME), un èter glicol molt usat en pintures, tints tèxtils, tintes d'impressió, líquid de frens i, més recentment, en la

L'MAA altera l'expressió de l'mRNA d'AR i ABP de manera específica segons l'estadi

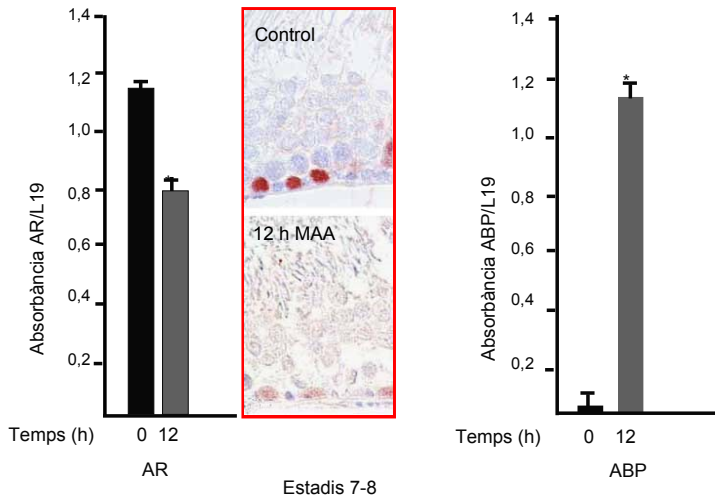


FIGURA 9. *Disrupció de l'expressió normal d'AR i ABP a causa d'un tòxic ambiental.* Es van aïllar túbul·lus seminífers en estadi 8 mitjançant microdissecció i captura amb làser; els nivells de mRNA d'AR i ABP es van analitzar en animals control i tractats amb MAA. La disminució de l'mRNA de l'AR és paral·lela a la de la proteïna analitzada per immunohistoquímica. L'mRNA d'ABP augmenta en resposta a l'MAA, mentre que el de l'AR disminueix. (Figura adaptada de Tirado *et al.*, 2002.)

fabricació de xips per a ordinadors personals. Els estudis en animals mostren una toxicitat reproductiva considerable per a l'ME i l'MEE en mascles, que comporta atròfia testicular i alteració de la fertilitat. A causa del seu efecte tan profund sobre la fertilitat masculina, i de la creença que els tòxics que afecten tan marcadament la fertilitat masculina han de perjudicar la ruta androgènica d'alguna manera, ens vam centrar en l'anàlisi de la possible alteració de l'expressió d'AR en rates adultes mascles tractades de manera aguda amb MAA.

En els testicles adults, una dosi única de MAA provoca la mort per apoptosi dels espermatoïcits en fase paquíten en determinats estadis del cicle seminífer, un resultat que es pot interpretar com una indicació que l'MAA és tòxic per als paquíten en certs estadis del cicle. Per identificar altres mecanismes potencials d'acció de l'MAA en l'espermatogènesi vam començar a treballar amb el mètode re-

lativament nou de microdissecció per captura amb làser (Suarez-Quian *et al.*, 2000, 2002), dissecant túbul·lus seminífers en diferents estadis del cicle, per tal d'analitzar l'expressió de l'mRNA de l'AR i l'ABP. Es van recollir cinquanta seccions transversals de túbul·lus dels estadis més representatius i es va examinar els efectes de l'MAA en els nivells de mRNA d'AR i d'ABP en cada estadi i en funció del temps transcorregut després de l'administració del tòxic. Els resultats van indicar que en estadis control caracteritzats per nivells alts de mRNA d'AR i baixos d'ABP, l'MAA disminuïa els nivells de mRNA d'AR però augmentava els d'ABP, respectivament (vegeu la figura 9). El nivell de proteïna d'AR, analitzat per immunohistoquímica, va mostrar canvis paral·lels als de mRNA d'AR. (No es poden fer experiments semblants per a l'ABP perquè no hi ha cap anticòs disponible per a examinar si els nivells de proteïna ABP canvien de

L'MAA altera l'expressió de l'mRNA d'AR i ABP de manera específica segons l'estadi

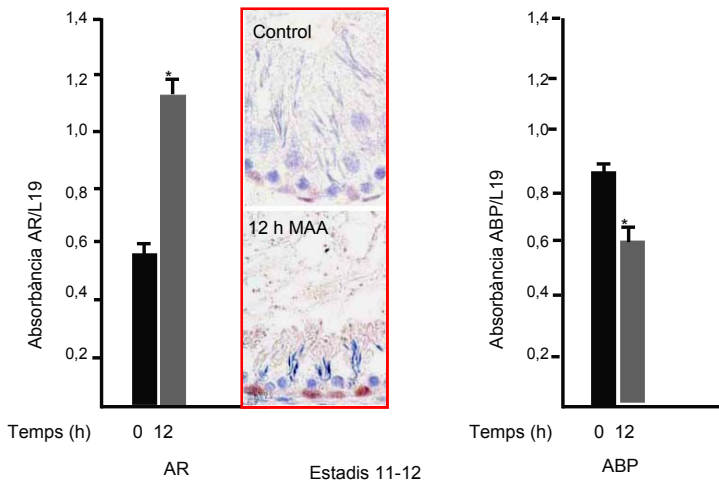


FIGURA 10. *Disrupció de l'expressió normal d'AR i ABP mitjançant un tòxic ambiental.* Es van aïllar túbuls seminífers corresponents als estadis 11 i 12 mitjançant microdissecció i captura amb làser i es van analitzar els nivells de mRNA d'AR i d'ABP en animals control i tractats amb MAA. L'augment en l'mRNA de l'AR era paral·lel al de proteïna analitzada per immunohistoquímica. En teixits control, en els estadis 11 i 12, les cèl·lules de Sertoli no eren mai positives per a AR. L'mRNA d'ABP disminuïa en resposta a MAA, mentre que el d'AR augmentava. (Figura adaptada de Tirado *et al.*, 2002.)

manera paral·lela amb els de mRNA). Inversament, en els estadis control caracteritzats per un nivell baix de mRNA d'AR i un nivell alt d'ABP, l'MAA va incrementar els nivells de mRNA d'AR i va disminuir els d'ABP. De manera semblant, el nivell de proteïna d'AR detectat en nuclis de cèl·lules de Sertoli canviava de manera paral·lela a l'mRNA (vegeu la figura 10).

El que és clau en aquesta informació és que l'MAA va mostrar la capacitat d'actuar a les cèl·lules de Sertoli i alterar dràsticament, de manera específica per a cada estadi, el balanç homeostàtic de les dues proteïnes, AR i ABP, el nivell normal d'expressió de les quals és imprescindible per a l'espermatogènesi. Així, en l'adult, es demostra que un mecanisme d'acció de l'MAA és malmetre l'homeòstasi del receptor d'andrògens i això proporciona una base per a entendre com l'exposició a MAA afecta la fertilitat. De nou, el trencament de

l'homeòstasi per a l'AR és incompatible amb la viabilitat dels espermatòcits paquits.

Quins altres efectes té l'MAA? De fet, volíem veure si l'MAA actuava com un anti-androgen o com un estrogen (Tirado *et al.*, 2003, 2004). La raó per a això era clara: qual-sevol compost que altera l'activitat androgènica altera l'homeòstasi i porta a una fertilitat malmesa. Per assolir aquest objectiu, vam preparar un assaig de transcripció en el qual una construcció que contenia el promotor del receptor d'andrògens o estrògens juntament a la seqüència reportadora luciferasa es transfectava establenent a una línia cel·lular. Vam observar que l'MAA no tenia activitat androgènica per si mateix, però que tenia activitat tant sobre ER α com sobre ER β . Potser el més interessant de tot era el fet que l'MMA mostrava la capacitat de potenciar l'activació de l'AR per DHT i també potenciava la d'ER α i ER β . És a dir, aquest compost, introduït dins la ruta

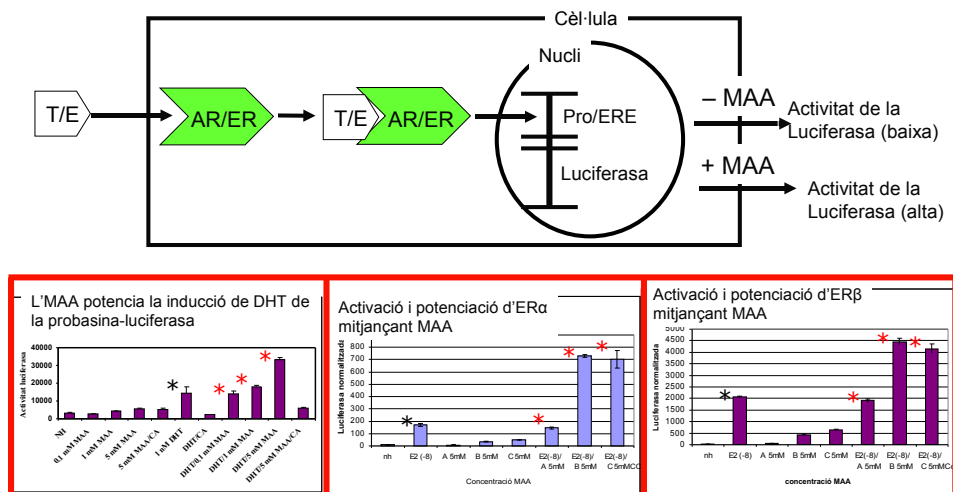


FIGURA 11. Interrupció de l'activitat transcripcional d'AR mitjançant un tòxic ambiental. Es va analitzar la capacitat de l'MAA de modular l'activitat transcripcional d'AR, ER α i ER β unides a molècules *reportadores* (luciferasa), en presència dels corresponents lligands o de MAA. L'MAA no mostrà efectes androgènics, però va potenciar significativament la inducció per DHT. L'MAA tampoc no va mostrar activitat ER α específica, però sí activitat de transcripció per a ER β i capacitat de potenciar significativament les activitats tant d'ER α com d'ER β . (Figura adaptada de Tirado *et al.*, 2002, 2004).

androgènica, malmeta de manera significativa l'homeòstasi androgènica. Estudis posteriors han demostrat que el mecanisme d'acció de l'MAA sembla ser la inhibició de l'activitat desacetilasa responsable d'inhibir la transcripció dels receptors d'esteroides (Jansen *et al.*, 2004). Aquestes molècules tan simples poden representar una classe de compostos que afecten de manera molt profunda la reproducció masculina mitjançant l'alteració de la ruta homeostàtica androgènica durant el desenvolupament.

AGRAÏMENTS

M'afalaga que m'hagin demanat d'escriure un article de revisió per honorar José Sáez d'ençà que la seva prematura mort privà la comunitat científica d'un mentor tan inspirador, collega i amic. Quan encara era a l'institut, vaig conèixer José en un *Testis Workshop* a Baltimore (EUA), i en els anys següents sempre provava de retrobar-lo, tant a Europa com als

EUA, en les nombroses trobades a què acudíem. Sempre estava disposat a oferir ajuda als investigadors joves i era molt obert discutint la seva recerca pròpia amb ells, encara que quan les àrees d'investigació coincidissin la informació que generosament oferia hagués pogut ser utilitzada per als seus avenços propis. José fou de la generació en què donar la mà o una paraula significaven quelcom entre amics: el trobarem a faltar.

BIBLIOGRAFIA

BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G. (1995). «Steroid receptors: many actors in search of a plot». *Cell*, 83: 851-857.

BREMNER, W. J.; MILLAR, M. R.; SHARPE, R. M.; SAUNDERS, P. T. (1994). «Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens». *Endocrinology*, 135(3): 1227-1234.

DE GENDT, K.; SWINNENE, J. V.; SAUNDERS, P. T.; SCHOONJANS, L.; DEWERCHIN, M.; DEVOS, A.; TAN, K.; ATANASSOVA, N.; CLAESSENS, F.; LECUREUIL, C.; HEYNS, W.; CARMELIET, P.; GUILLOU, F.; SHARPE, R. M.; VERHOEVEN, G. (2004). «A Sertoli cell-selective knockout

- of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 1327-1332.
- FRITZ, I. B. (1978). «Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule». *Biochem. Actions Horm.* 5: 249-281.
- HENRIKSEN, K.; HAKOVRTA, H.; PARVINEN, M. (1995). «Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate». *Endocrinology*, 136(8): 3285-3291.
- HOLDCRAFT, R. W.; BRAUN, R. E. (2004). «Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids». *Development*, 131: 459-416.
- JANSEN, M. S.; NAGEL, S. C.; MIRANDA, P. J.; LOBENHOFER, E. K.; AFSHARI, C. A.; MCDONNELL, D. P. (2004). «Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(18): 7199-7204.
- KASSIM, N. M.; MCDONALD, S. W.; REID, O.; BENNETT, N. K.; GILMORE, D. P. PAYNE, A. P. (1997). «The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat». *J. Anat.*, 190(4): 577-588.
- KIMURA, N.; MIZOKAMI, A.; OONUMA, T.; SASANO, H.; NAGURA, H. (1993). «Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues». *J. Histochem. Cytochem.*, 41: 671-678.
- LAMB, D. J. (1995). «Genes involved in testicular development and function». *World J. Urol.*, 13(5): 277-284.
- LAMB, D. J.; WEIGEL, N. L.; MARCELLI, M. (2001). «Androgen receptors and their biology». *Vitam. Horm.*, 62: 199-230.
- MEACHEM, S. J.; WREFORD, N. G.; ROBERTSON, D. M.; MCLACHLAN, R. I. (1997). «Androgen action on the restoration of spermatogenesis in adult rats: effects of human chorionic gonadotrophin, testosterone and flutamide administration on germ cell number». *Int. J. Androl.*, 20(2): 70-79.
- MIFSUD, A.; SIM, C. K.; BOETTGER-TONG, H.; MOREIRA, S.; LAMB, D. J.; LIPSHULTZ, L. I.; YONG, E. L. (2001). «Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility». *Fertil. Steril.*, 75(2): 275-281.
- MUNELL, F.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; SELVA, D. M.; TIRADO, O. M.; REVENTOS, J. (2002). «Androgen-binding protein and reproduction: where do we stand?». *J. Androl.*, 23(5): 598-609.
- NANDI, S.; BANERJEE, P. P.; ZIRKIN, B. R. (1999). «Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethane-sulfonate administration: relationship to Fas?». *Biol. Reprod.*, 61(1): 70-75.
- NEF, S.; PARADA, L. F. (1999). «Cryptorchidism in mice mutant for Ins13». *Nat. Genet.*, 22(3): 295-299.
- O'DONNELL, L.; PRATIS, K.; STANTON, P. G.; ROBERTSON, D. M.; MCLACHLAN, R. I. (1999). «Testosterone-dependent restoration of spermatogenesis in adult rats is impaired by a 5-alpha-reductase inhibitor». *J. Androl.*, 20(1): 109-117.
- PARVINEN, M. (1982). «Regulation of the seminiferous epithelium». *Endocr. Rev.*, 3(4): 404-417.
- PRINS, G. S.; BIRCH, L.; GREENE, G. L. (1991). «Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate». *Endocrinology*, 129: 3187-3199.
- PRINT, C. G.; LOVELAND, K. L. (2000). «Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis». *Bioessays*, 22(5): 423-430.
- REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, F.; GONZALEZ-PERMATO, P.; SERRANO, A.; NISTAL, M.; SUAREZ-QUIAN, C. A. (2001). «Androgen receptor expression in Sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human testis». *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 86: 413-421.
- SELVA, D. M.; TIRADO, O. M.; TORAN, N.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; REVENTOS, J.; MUNELL, F. (2000). «Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen-binding protein transgenic mice». *Endocrinology*, 141(3): 1168-1177.
- (2004). «Increased estrogen receptor- α expression in spermatocytes undergoing apoptosis in mice over-expressing a rat androgen-binding protein transgene». *Biol. Reprod.*, 71: 1461-1468.
- SHAN, L. X.; ZHU, L. J.; BARDIN, C. W.; HARDY, M. P. (1995). «Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization». *Endocrinology*, 136: 856-862.
- SHARPE, R. M.; MILLAR, M.; MCKINNELL, C. (1993). «Relative roles of testosterone and the germ cell complement in determining stage-dependent changes in protein secretion by isolated rat seminiferous tubules». *Int. J. Androl.*, 16(1): 71-81.
- SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K. M. (2001). «Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects». *Hum. Reprod.*, 16: 972-978.
- SUAREZ-QUIAN, C. A.; GOLDSTEIN, S.; BONNER, R. F. (2000). «Laser capture microdissection (LCM): a new tool for reproductive biology research». *J. Androl.*, 21: 601-608.
- SUAREZ-QUIAN, C. A.; MARTINEZ-GARCIA, F.; NISTAL, M.; REGADERA, J. (1999). «Androgen receptor distribution in adult human testis». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84(1): 350-358.
- SUAREZ-QUIAN, C. A.; TIRADO, O. M.; MUNELL, F.; REVENTÓS, J. (2002). «Laser capture microdissection to assess development». A: CONN, P. M. [ed.] *Methods in enzymology*. Vol. 356. San Diego: Academic Press, p. 145-156.
- TIRADO, O. M.; MARTÍNEZ, E.; RODRÍGUEZ, O. C.; DANIENSEN, M.; SELVA, D. M.; REVENTÓS, J.; MUNELL, F.; SUAREZ-QUIAN, C. A. (2003). «Short-term effects of

- methoxyacetic acid on androgen receptor and androgen-binding protein expression in adult rat Sertoli cells». *Biol. Reprod.*, 68: 1437-1446.
- TIRADO, O. M.; SELVA, D. M.; TORAN, N.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; JANSEN, M.; McDONNELL, D. P.; REVENTOS, J.; MUNELL, F. (2004). «Increased expression of estrogen receptor- β in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid (MAA) administration». *J. Androl.*, 25: 84-94.
- TURNER, K. J.; MORLEY, M.; MACPHERSON, S.; MILLAR, M. R.; WILSON, J. A.; SHARPE, R. M. SAUNDERS, P. T. (2001). «Modulation of gene expression by androgen and oestrogens in the testis and prostate of the adult rat following androgen withdrawal». *Mol. Cell. Endocrinol.*, 178(1-2): 73-87.
- VORNBERGER, W.; PRINS, G.; MUSTO, N. A.; SUAREZ-QUIAN, C. A. (1994). «Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis». *Endocrinology*, 134(5): 2307-2316.
- WILSON, J. D.; LEIHY, M. W.; SHAW, G.; RENFREE, M. B. (2002). «Androgen physiology: unsolved problems at the millennium». *Mol. Cell. Endo.*, 198: 1-5.
- WOOLVERIDGE, I.; DE BOER-BROUWER, M.; TAYLOR, M. F.; TEERDS, K. J.; WU, F. C.; MORRIS, I. D. (1999). «Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes». *Biol. Reprod.*, 60(2): 461-470.
- ZIRKIN, B. R. (1998). «Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH». *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 9(4): 417-421.
- ZHOU, X.; KUDO, A.; KAWAKAMI, H.; HIRANO, H. (1996). «Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development». *Anat. Rec.*, 245(3): 509-518.
- ZHOU, Q.; NIE, R.; PRINS, G. S.; SAUNDERS, P. T.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; HESS, R. A. (2002). «Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract». *J. Androl.*, 23: 870-881.
- ZHOU, Q.; SHIMA, J. E.; NIE, R.; FRIEL, P. J.; GRISWOLD, M. D. (2005). «Androgen-regulated transcripts in the neonatal mouse testis as determined through microarray analysis». *Biol. Reprod.*, 72: 1010-1019.