



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Tumor testicular de células germinales: identificación de nuevos factores de riesgo

DANIEL MORENO MENDOZA

Año 2020



Universitat Autònoma de Barcelona

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA

AÑO 2020

TESIS DOCTORAL

Tumor testicular de células germinales: identificación de nuevos factores de riesgo

Doctorando

DANIEL MORENO MENDOZA

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TESIS

PROF.^a CSILLA G. KRAUSZ

TUTOR DEL TRABAJO DE TESIS

PROF. MANUEL PUIG DOMINGO

Los profesores Csilla G. Krausz y Manuel Puig Domingo, como directora y tutor de tesis certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada: “Tumor testicular de células germinales: identificación de nuevos factores de riesgo”, ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión.

Una vez redactada la presente tesis, la consideramos apta para ser presentada y defendida ante el Tribunal que en su día se designe, por lo que firmamos para que conste a efectos oportunos:

Prof.^a Csilla G. Krausz

Prof. Manuel Puig Domingo

Doctorando Daniel Moreno Mendoza

A mi familia,

"Un viaje de mil millas comienza con un primer paso"

Lao-Tse

Agradecimientos

Esta tesis es un esfuerzo en el cual han participado muchas personas de una u otra forma, acompañándome y ayudándome para hacer posible mi sueño.

Antes de nada quisiera agradecer a mi directora de tesis la **Prof.^a C. Krausz** por sus consejos, por ayudarme tanto en lo personal como en lo profesional, por su estímulo constante con el fin de poder sacar lo mejor de uno mismo. Gracias por haberme transmitido tu entusiasmo en cada momento y en cada cosa que hacemos, gracias por haberme enseñado todo lo que sé, ¡Gracias de corazón!

Agradezco al **Prof. Puig Domingo** por su apoyo como tutor de esta tesis, por su importante ayuda y sus grandes consejos para llevar a cabo este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a la dirección de la **Fundació Puigvert**, representada por la **Sra. Esperança Martí, Sra. Helena Ris** y el **Sr. Ramón Massaguer**, por haber creído en el valor de nuestra investigación y haber hecho que fuera posible. Un especial agradecimiento por su gran apoyo al **Dr. Lluís Gausa**, director médico, quien gracias a su profesionalidad todo resulta más fácil.

Quisiera agradecer a todos y cada uno de mis compañeros del Servicio de Andrología de la Fundació Puigvert, en especial al **Dr. Ruiz Castañé**, mi jefe, por el apoyo incondicional en este y otros tantos proyectos. Al **Dr. Rajmil**, por meterme en la cabeza la idea de realizar una tesis doctoral, gracias por confiar en mí desde el primer día. A mis compañeras “las tres brujas” que son más que compañeras y son prácticamente mi familia putativa catalana, gracias **Mafe, Mónica** y **Vicky**, por las galletas, por los momentos de risa y por estar siempre ahí cuando se necesita una cara amiga. Nos queda pendiente una excursión a “Castellfullit de la Roca”.

Deseo dar las gracias a todo el personal del laboratorio de Biología Molecular de la Fundació Puigvert, principalmente al **Dr. Oliver** y a la **Dra. Ars** por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir uno más del grupo. A **Patricia** y **Laura** por ayudarme en todo momento cuando hacía mis 70 PCR, gracias a vosotras aún tengo pesadillas con el microondas y la agarosa explotándome en la cara! A **Luz** y **Elena** por su simpatía y su sonrisa, por sus consejos, por ayudarme en cuanto les era posible. A **Chiara**, mi gran heroína, la primera persona que conocí cuando empezó este viaje, aún recuerdo tus primeras palabras: “ma sei sicuro?, ma chi te lo fa fa” y las que siempre me decías “ma ancora non hai capito dove si buttano i guanti, io non voglio sapere nulla, vedrai La Patricia”, gracias por enseñarme todo lo que era necesario para no destrozarse el laboratorio. Y como olvidar a **Toni**, la persona que me ha soportado, me ha aguantado mis cambios de humor, mis momentos tristes, de desesperación, de ya no puedo más y también de alegría cuando los proyectos iban bien, gracias por esas horas y horas y horas y horas y más horas fenotipando pacientes, gracias Toni por todo eso y más, eres una gran persona.

Un agradecimiento muy especial al Laboratorio de Seminología y Embriología, al **Dr. Bassas** por su consejos y sus enseñanzas, a las embriólogas “más mejores” del mundo, **Olga Martínez**, **Ana Mata**, **Aurora García** y **Olga López**, por permitirme entrar en vuestro laboratorio y hacerme sentir como en casa, siempre con simpatía y educación, enseñándome donde está la crema para las quemaduras por nitrógeno líquido, sois un gran equipo humano. A las técnicas **Rosalía** y **Begoña**, por llamarme siempre que había un paciente oncológico.

Gracias a la Dra. **Silvia Mateu** por la comprensión y su disponibilidad para ayudarme en todo momento, y a las **chicas de secretaria**, por estar siempre disponibles.

I miei più sinceri ringraziamenti ai nostri colleghi dall'altra parte del Mediterraneo, ai nostri cari amici di **Roma** ed ai nostri fratelli di **Firenze**, in particolare a **Elena Casamonti**, grazie

mille per avermi aiutato così tanto nei giorni in cui ero a Firenze, e molto di più per avermi aiutato nella lontananza, sempre collegati su Skype per farmi capire la statistica e farmi capire le “maledette” curve ROC. Grazie mille!

Un agradecimiento especial a **todos los pacientes**, por su comprensión en un momento tan delicado de su vida, sin ellos nada sería posible, ¡muchas gracias chicos! Y gracias a la financiación del Ministerio de Salud (FIS) y la Fundación Merck Salud por haber garantizado con sus ayudas los proyectos de investigación.

Un agradecimiento a las personas más importantes de mi vida, a mi familia, gracias a ellos todo es posible, gracias a mi **Madre** y mi **Padre** por enseñarme que todo es posible y nadie debe de decidir por mí, a mis hermanos **Juan** y **Manuel** porque aunque estemos en la distancia siempre nos tenemos los unos a los otros y a mis **sobrinos Juan, Javi e Irene**, por hacerme sonreír siempre que los veo y estoy con ellos. Y a **Mauricio**, apoyándome literalmente desde el minuto cero de mi doctorado, y aún lo haces a día de hoy, gracias por soportarme en mis peores momentos, gracias a ti no fueron tan malos ni tan peores, gracias porque en tantas ocasiones me has hecho razonar y entrar en razón, ¡¡GRACIAS!!

¡Mi más profundo agradecimiento a todos!

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AR: Receptor de andrógenos

ARN: Ácido ribonucleico

AZF: Factor de azoospermia

CI: Intervalo de confianza

CIS: Carcioma in situ

Cm: centímetros

DAG: Distancia anogenital

DAGap: Distancia anopeneana

DAGas: Distancia anoescrotal

DBD: Dominio de unión al ADN del receptor de andrógenos

DHT: 5 α -dihidrotestosterona

EDC: Disruptores endocrinos ambientales

g: Familia de amplicones verdes de la región AZFc del cromosoma Y

GWAS: *Genome-Wide Association Study*

GCNIS: Neoplasia de células germinales in situ

Hab: Habitantes

IMC: Índice de masa corporal

INSL-3: Péptido Insuli-like 3

LBD: Dominio de unión ligando C-terminal del receptor de andrógenos

ml: Mililitro

mLOY: Mosaicismo relativo a la pérdida del cromosoma Y

mm: milímetros

MPW: *Masculinization programming window*

MSY: Región *male-specific Y*

NAHR: Recombinación homóloga no alélica

ng/dl: nanogramos por decilitro

Nsm: No seminoma

NTD: Dominio N-terminal del receptor de andrógenos

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odd ratio

PAR: Región pseudoautosómica

PRS: *Polygenic risk scores*

r: familia de amplicones rojos de la región AZFc del cromosoma Y

ROC: Característica Operativa del Receptor

RR: Riesgo relativo

SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales

SDT: Síndrome de disgenesia testicular

Sm: Seminoma

SMD: Standardized mean difference

SNP: Polimorfismos de nucleótido único

TTCG: Tumor testicular de células germinales

vs: Versus

WES: *Whole Exome Sequencing*

INDICE

	Páginas
Resumen	1
Summary	5
1. Introducción	9
1.1 Tumor testicular	10
1.1.1 Epidemiología	10
1.1.2 Alteración en el correcto desarrollo testicular y origen de la Neoplasia de células germinales <i>in situ</i>	11
1.1.3 Factores de riesgo del tumor testicular	12
1.1.4 Factores genéticos involucrados en el desarrollo del tumor testicular de células germinales	16
1.1.5 Alteraciones en el cromosoma Y como factores de riesgo del tumor testicular de células germinales	21
1.2 Síndrome de disgenesia testicular y su relación con el tumor testicular de células germinales	26
1.2.1 Definición del Síndrome de disgenesia testicular	26
1.2.2 Etiopatogénesis del Síndrome de disgenesia testicular	28
1.2.3 Factores de riesgo ambientales del Síndrome de disgenesia testicular	29
1.3 Receptor androgénico	32
1.3.1 Estructura y mecanismo de acción	32
1.3.2 Polimorfismos genéticos en el gen <i>AR</i>	33
1.3.2.1 Infertilidad masculina y el polimorfismo (CAG) _n del gen <i>AR</i>	33
1.3.2.2 Tumor testicular y el polimorfismo (CAG) _n del gen <i>AR</i>	34
1.4 Distancia anogenital	36
1.4.1 Métodos de medida	37
1.4.2 Relación entre Distancia anogenital y malformaciones genitales	38
1.4.3 Distancia anogenital y disfunción testicular	39
1.4.4 Distancia anogenital y cáncer	41
1.4.5 Variaciones genéticas y distancia anogenital	42
2. Hipótesis	43
3. Objetivos	46

4. Compendio de publicaciones	49
4.1 Primer estudio	50
4.2 Segundo estudio	64
5. Resumen global de los resultados	75
6. Resumen global de la discusión	78
7. Conclusiones	91
8. Líneas de futuro que se desprenden de la investigación	94
9. Bibliografía	96

Resumen

La presente tesis aporta nuevos conocimientos a la etiopatogénesis del tumor testicular de células germinales (TTCG) a través de la descripción de nuevos factores de riesgo. El TTCG es la neoplasia más frecuente en hombres con una edad comprendida entre los 15-40 años. La etiología de esta neoplasia es multifactorial y atribuible a un retraso en la diferenciación de los gonocitos en pre-espermatogonias durante el periodo fetal. El TTCG es más frecuente en varones con una espermatogénesis alterada, lo que sugiere una posible etiopatogenia común. De hecho, la falta de diferenciación de los gonocitos puede dar lugar tanto a una espermatogénesis alterada como al desarrollo del TTCG. El cromosoma Y contiene genes esenciales para una correcta espermatogénesis, localizados en las regiones del factor de azoospermia (AZF). La región AZF más dinámica es la región AZFc que presenta en su interior sitios frágiles que conllevan a una mayor predisposición a reordenamientos (deleciones parciales, duplicaciones y deleciones seguidas de duplicaciones). Las deleciones completas de la región AZFc causan una alteración de la espermatogénesis, variando desde la azoospermia a una oligozoospermia severa (una concentración de espermatozoides inferior a 5 millones de espermatozoides por mililitro), por el contrario las deleciones parciales de esta región presentan una mayor variabilidad seminal incluso presentando normozoospermia. Entre los reordenamientos parciales de la región AZFc, la deleción más relevante desde el punto de vista clínico es la deleción *gr/gr* que predispone a la oligozoospermia. Se ha estudiado un posible vínculo entre los reordenamientos genéticos de la región AZFc y un mayor riesgo de TTCG. Un estudio multicéntrico relacionó la deleción *gr/gr* con un mayor riesgo de desarrollar un TTCG, pero la falta de información sobre los parámetros seminales de los pacientes en este estudio no permitió clarificar si la asociación observada estaba relacionada con la espermatogénesis alterada o si era un factor de riesgo independiente. Además, aún queda por establecer si otros tipos de deleciones y duplicaciones de la región AZFc presentan relación con el TTCG. La primera parte de esta tesis se ha enfocado en el estudio de los reordenamientos parciales de la región AZFc en el TTCG, definiendo la frecuencia de las: i) deleciones completas de la región AZFc, ii) deleciones parciales de la región AZFc, iii) duplicaciones parciales de la región AZFc y

iv) alteraciones de la dosis del gen *DAZ* (situado en la región AZFc y específicamente expresado a nivel testicular) y proporcionando una caracterización molecular y fenotípica de los portadores de estos reordenamientos cromosómicos. Se ha analizado 497 pacientes con TTCG y 2030 controles sin TTCG. Ningún paciente con TTCG presentó deleciones completas de la región AZF. Un 3.8% de los pacientes con TTCG presentaba algún tipo de deleción parcial de la región AZFc respecto al 2.5% del grupo control ($p= 0.078$). La deleción parcial más frecuente fue la deleción *gr/gr* (2.8% en pacientes con TTCG y 2.0% en controles), mientras que los otros tipos de deleciones parciales de la región AZFc (*b2/b3*, *b1/b3*, y deleciones atípicas) resultaron ser muy raras (1.0% en pacientes con TTCG y 0.5% en controles). Al realizar las comparaciones según el fenotipo seminal, el mayor riesgo de TTCG se observó en pacientes normozoospermicos portadores de deleciones parciales de la región AZFc (TTCG normozoospermicos *versus* controles normozoospermicos; OR= 4.1, 95%CI: 1.8–9.3, $p= 0.001$). Las duplicaciones parciales de la región AZFc se observaron en un 4.6% de los pacientes con TTCG y en un 3.7% del grupo control ($p=0.232$). El análisis de la dosis génica del *DAZ*, mostró que las alteraciones en la dosis del gen *DAZ* confieren un mayor riesgo de TTCG (OR = 1.8, 95%CI: 1.2–2.7; $p= 0.004$).

Estos resultados confirman que un déficit del contenido génico de la región AZFc juega un papel importante en la etiopatogénesis del TTCG. En particular, la deleción *gr/gr* es la de mayor importancia, confiriendo un riesgo significativo para el desarrollo del TTCG independientemente de los parámetros seminales.

Se hipotetiza que también los factores ambientales están involucrados en la etiopatogénesis del TTCG, si interfieren principalmente en un periodo específico del desarrollo testicular. El desarrollo genital masculino tiene lugar entre la 8-18 semana de gestación, en el denominado “*masculinization programming window*” (MPW), siendo este el periodo donde se produce la maduración de gonocitos a pre-espermatogonia. La acción de los andrógenos durante el MPW es fundamental para un correcto desarrollo del sistema urogenital masculino. Un desequilibrio hormonal en este periodo compromete la correcta función de las células fetales de Sertoli y Leydig. Este desequilibrio hormonal es el origen

del síndrome de disgenesia testicular (SDT) que incluye el TTCCG, la criptorquidia, la hipospadias, una alterada espermatogénesis y una corta distancia anogenital (DAG). La acción de los andrógenos está determinada por el correcto funcionamiento del receptor androgénico (AR), que está codificado por el gen *AR*. El gen *AR* contiene dos segmentos polimórficos de trinucleótidos repetidos, CAG y GCN. Ha sido demostrado que el número de repeticiones de trinucleótidos, especialmente el (CAG)_n, puede afectar a la actividad transcripcional del receptor androgénico.

La distancia anogenital es considerada un biomarcador de la acción de los andrógenos durante el MPW. En roedores, existe una asociación entre la disrupción androgénica fetal y una DAG más corta. En humanos, una DAG más corta ha sido relacionada con un desarrollo anormal de los genitales masculinos (criptorquidia, hipospadias) y con una alterada espermatogénesis. Mientras que, actualmente, no existe información sobre un posible vínculo entre una DAG corta y el TTCCG.

La segunda parte de esta tesis valora la asociación entre la DAG (biomarcador de la acción androgénica durante la vida fetal) y el TTCCG. Además, se evaluó el papel del polimorfismo CAG del gen *AR* en el desarrollo del TTCCG y en relación a la DAG. Para ello se analizaron a 156 pacientes con TTCCG y 110 controles normozoospermicos sin TTCCG, a los que se les midió la distancia anopeneana (DAGap) y la distancia anoescrotal (DAGas), además, se les realizó un análisis molecular para determinar el número de repeticiones CAG en el exón 1 del gen *AR*. Se observó una DAGap y una DAGas significativamente más corta en los pacientes con TTCCG respecto al grupo control ($p < 0.001$). Mediante un análisis de la curva de característica operativa del receptor (ROC) se definieron unos punto de corte tanto para la DAGap (130mm) como para la DAGas (53mm) que indican un mayor riesgo de desarrollar un TTCCG en aquellos individuos que se encuentren por debajo de estos valores (OR= 4.97, 95%CI: 2.01-12.33, $p=0.001$ y OR= 4.11, 95%CI: 1.89-8.92, $p < 0.001$, respectivamente). Respecto al polimorfismo CAG, no se encontraron diferencias significativas entre los valores medianos del número de tripletes entre pacientes y controles, igualmente no se encontró ninguna relación entre el polimorfismo CAG y la longitud en la DAG.

En conclusión, los datos revelan que los pacientes con una DAG más corta presentan un mayor riesgo de desarrollar un TTCG, apoyando la teoría sobre la influencia del desequilibrio androgénico durante el desarrollo fetal en la etiopatogenia del TTCG. Los puntos de corte obtenidos mediante la curva ROC para las DAGs son útiles en el screening del TTCG en nuestro centro, por lo que individuos con un DAG por debajo de estos puntos de corte podrán beneficiarse de un seguimiento activo a largo plazo.

La prevención del TTCG se basa, principalmente, en el *follow-up* de pacientes que presentan algunos factores de riesgo clínicos, tales como: historia de familiaridad para el TTCG, infertilidad, hipospadia y criptorquidia. Esta tesis contribuye en la prevención del TTCG con la identificación de dos nuevos factores de riesgo: uno genético y uno antropométrico. En base a estos resultados se propone la evaluación de estos nuevos factores de riesgos, junto a los ya conocidos, en la práctica clínica habitual. La realización de un seguimiento a largo plazo en pacientes con un alto riesgo de desarrollar un TTCG, permitiría la posibilidad de ofrecerles un potencial diagnóstico precoz de la patología tumoral, además a los hijos varones y hermanos de los pacientes portadores de la delección gr/gr se les podrá ofrecer un adecuado consejo genético.

Summary

This thesis contributes to the understanding of the etiopathogenesis of testicular germ cell tumours (TTCG) through the identification of novel risk factors. TTCG is the most common malignant neoplasia in reproductive age. The aetiology of this tumour is multifactorial and it has been proposed that it is due to a delay in the normal foetal differentiation of the gonocytes in pre-spermatogonia. TTCG is more common in men with altered spermatogenesis, indicating the existence of a possible common etiopathogenesis. In fact, the lack of differentiation of gonocytes can cause both an altered spermatogenesis and the development of TTCG. The Y chromosome contains genes located in the azoospermia factor regions (AZF) which are essential for spermatogenesis. The most dynamic AZF region is the AZFc, which present a number of fragile sites leading to a higher predisposition to rearrangements inside this region (partial deletions, duplications and deletions followed by duplications). Complete deletions of the AZFc region cause an alteration in spermatogenesis, ranging from azoospermia to severe oligozoospermia (sperm concentration of less than 5 million sperm per ml), by contrast, the partial deletions of this region present a highly variable semen phenotype including normozoospermia. Among the partial rearrangements of the AZFc region, the clinically most relevant deletion is the *gr/gr* deletion that predisposes to oligozoospermia. Consequently, a possible link between genetic rearrangements of the AZFc region and TTCG has been hypothesized. A multicentre study demonstrated an association between the *gr/gr* deletion and an increased risk of TTCG, but the lack of information on the seminal parameters of the patients in this study has not allowed clarifying if the association is related to altered spermatogenesis or if it is an independent risk factor. Furthermore, it remains to be established whether other type of partial deletions and duplications of the AZFc region are associated to TTCG.

The first part of this thesis has been focused on the partial rearrangements of the AZFc region in relationship with TTCG. For this purpose we defined the frequency of: i) complete AZF deletions, ii) partial AZFc deletions, iii) partial duplications of AZFc and iv) alterations of *DAZ* gene dosage (*DAZ* is located in the AZFc region and specifically expressed at the testicular level); providing a molecular and phenotypic characterization of the carriers of these chromosomal rearrangements. We

evaluated 497 patients with TTCG and 2030 control subjects without TTCG. No patient with TTCG manifested complete deletions of the AZFc region. The frequency of all partial AZFc deletions carriers was higher in our TTCG cohort than in the control group (3.8% *versus* 2.5%), although without reaching statistical significance ($p=0.078$). The most frequent partial deletion was the *gr/gr* deletion (2.8% in TTCG patients and 2.0% in controls), while the other types of partial deletions of the AZFc region (*b2/b3*, *b1/b3*, and atypical deletions) was extremely rare (1.0% in TTCG patients and 0.5% in controls). When making comparisons according to the semen phenotype, the highest risk of TTCG was observed in normozoospermic patients carrying partial AZFc deletions (normozoospermic TTCG *versus* normozoospermic controls; OR = 4.1, 95% CI: 1.8–9.3, $p = 0.001$). Partial AZFc duplications were observed in 4.6% of TTCG patients and in 3.7% of controls ($p=0.232$). The *DAZ* gene dose analysis showed that alterations in the *DAZ* gene dose confer an increased risk of TTCG (OR = 1.8; 95% CI = 1.2–2.7; $p= 0.004$).

These results confirm that a deficit in the gene content of the AZFc region plays an important role in the etiopathogenesis of TTCG. In particular, the *gr/gr* deletion is the most important one, conferring a significant risk for the development of TTCG regardless of the seminal parameters. It has been postulated that also environmental factors are involved in the etiopathogenesis of TTCG, especially if they interfere with a specific period of testicular development. Male genital development takes place between 8-18 weeks of gestation, termed masculinization programming window (MPW), when the maturation of gonocytes to pre-spermatogonia occurs. Hormonal unbalance during MPW compromises the correct function of Sertoli and Leydig cells. This hormonal imbalance may lead to the testicular dysgenesis syndrome (SDT), which includes TTCG, cryptorchidism, hypospadias, altered spermatogenesis, and short anogenital distance (DAG). Androgen action is determined by the correct functioning of the androgen receptor (AR), which is encoded by the *AR* gene. The *AR* gene contains two polymorphic trinucleotide repeat segments, CAG and GCN. It has been shown that the number of trinucleotide repeats, especially (CAG) n , can affect the transcriptional activity of the androgen receptor.

The anogenital distance is considered a well-established and sensitive biomarker of androgens action within MPW hence it is a biomarker of androgenic action during foetal life. In rodents, there is an association between foetal androgen disruption and shorter DAG. In humans, a shorter DAG has been associated with abnormal development of the male genitalia such as cryptorchidism and hypospadias and with impaired spermatogenesis. Up to now, the potential link between short DAG and TTCG has not been explored in the literature.

The second part of this thesis assesses the association between DAG and TTCG. In addition, the role of (CAG)_n polymorphism of the *AR* gene in relationship with DAG and TTCG development has been also evaluated. For this purpose, 156 patients with TTCG and 110 normozoospermic fertile men were evaluated. Anopenile distance (DAGap) and anoscrotal distance (DAGas) were measured. Moreover a molecular analysis was carried out to determine the number of CAG repeats in exon 1 of *AR* gene. DAGap and DAGas resulted significantly shorter in the group of TGCT patients in respect to controls ($p < 0.001$). Threshold values were calculated for DAGs with the best sensibility and specificity. Subjects with DAGap and DAGas below threshold (130 mm and 53 mm, respectively) showed a significantly increased risk for TTCG (OR= 4.97, 95%CI: 2.01-12.33, $p = 0.001$ y OR= 4.11, 95%CI: 1.89-8.92, $p < 0.001$, respectively). Regarding the (CAG)_n polymorphism, no significant differences were found between the median values of the number of *triplets* between patients and controls. Similarly, no relationship was found between this polymorphism and the length in the DAG.

In conclusion, our data suggest that short anogenital distance confers a significant risk to develop TTCG, supporting the hypothesis about the influence of androgen imbalance during foetal development on the etiopathogenesis of TTCG. The threshold values of DAG are useful to select at risk subjects for long-term active follow-up. Currently, preventive measures of TTCG are based on the follow-up of patients who present some clinical risk factors, such as: family history of TTCG, infertility, hypospadias and cryptorchidism. This thesis contributes to the prevention of TTCG with the identification of two new risk factors: one genetic and one anthropometric. Based on these results,

we propose the evaluation of these new risk factors, together with those already known, in the routine clinical practice. Long-term follow-up of patients at high risk for TTCG would allow a potential early diagnosis of the tumour, in addition, a more appropriate genetic counselling can be offered to the male children or brothers of *gr/gr* deletion carriers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TUMOR TESTICULAR

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El tumor testicular de células germinales (TTCG) constituye entre el 1% y el 2% de todas las neoplasias en el varón y el 5% de las neoplasias genitourinarias (1). El TTCG es la neoplasia más frecuente en hombres con una edad comprendida entre los 15-40 años, teniendo una frecuencia del 9.7% de entre todos los tumores malignos a nivel mundial en esa franja de edad (2). Según datos publicados recientemente por el *Global Cancer Observatory* se han diagnosticado 71.105 nuevos casos de tumor testicular en todo el mundo durante el 2018, un 33% de los cuales han sido diagnosticados en Europa. La tasa de incidencia estandarizada por edad del tumor testicular varía según la región geográfica. La tasa más alta se encuentra en Europa Oriental con un 9.7/100.000 habitantes (hab), seguido de Europa del Norte con 7.4/100.000 hab. Por el contrario las regiones geográficas con menor incidencia se encuentran en Asia y África (0.78/100.000 hab. y 0.41/100.000 hab.) (3). En España se diagnosticaron un total de 1302 nuevos casos de tumor testicular en 2019, con una tasa ajustada a la población estándar mundial del 5.9/100.000 hab. (95%CI: 5.4-6.5) (fuente: Red Española de Registros de Cáncer).

Sin embargo, se pronostica un descenso en el diagnóstico del tumor testicular para el 2035 en España, estimándose una tasa estandarizada por edad de 4/100.000 hab., por el contrario, en el resto de Europa se estima un aumento en el diagnóstico de nuevos casos de tumor testicular, sobre todo en países que históricamente tenían un menor riesgo de tumor testicular (Islandia, Finlandia, Lituania, Malta) (4).

Como observamos, existe una gran variedad geográfica en la incidencia del tumor testicular, presentando una mayor incidencia en los países desarrollados respecto aquellos en vías de desarrollo. Esta observación plantea la posibilidad que los tumores testiculares estén relacionados con el estilo de vida, la raza y sobre todo por factores ambientales externos (5).

Valorando el tipo histopatológico de los tumores testiculares, los patrones de incidencia son similares en la mayoría de los países, siendo más frecuente el seminoma (Sm) respecto al no seminoma (Nsm) (6).

1.1.2. ALTERACIÓN EN EL CORRECTO DESARROLLO TESTICULAR Y ORIGEN DE LA NEOPLASIA DE CÉLULAS GERMINALES *IN SITU*.

Actualmente, no son claros los mecanismos por los cuales se origina la neoplasia de células germinales. Según la teoría más aceptada, el punto clave en el desarrollo de la patología tumoral es el retraso en la diferenciación de los gonocitos en pre-espermatogonias. Los gonocitos fetales indiferenciados representan la lesión primaria pretumoral que permanecerá latente durante la infancia y que posteriormente al desarrollo puberal originará el TTCG (7). La lesión primaria maligna pre-invasiva de las células germinales a nivel del túbulo seminífero, fué descrita por primera vez en el 1972 por Skakkebaek (8). Esta lesión precancerosa se denominó carcinoma in situ (CIS), por Skakkebaek en Europa, o neoplasia intratubular de células germinales no-clasificada o también conocida con las siglas IGNU, en los Estados Unidos de América. Este uso de diferentes nombres para indicar la misma lesión ha estado unificado, y en el 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a esta lesión inicial con el término de Neoplasia de células germinales in situ (GCNIS).

La hipótesis de mal-diferenciación de los gonocitos se basó inicialmente en la existencia de una similitud del perfil de expresión de genes tales como c-KIT, OCT4, AP-2 γ , NANOG y LIN28 (7,9,10), de una actividad telomerasica (11) y del *pattern* de *imprinting* genómico (12) entre las células que constituyen el GCNIS, el TTCG y los gonocitos fetales.

El desequilibrio en el microambiente celular puede conllevar a un efecto negativo sobre la función de las células de Sertoli o las células de Leydig, con el consiguiente efecto negativo sobre la producción de andrógenos (7). La secreción y la actividad hormonal pueden ser influenciadas de forma negativa por una serie de factores ambientales comúnmente llamados disruptores endocrinos.

Hay una serie de estudios que proponen los disruptores endocrinos ambientales como factores importantes en la etiopatogénesis del tumor testicular (13). Figura 1.

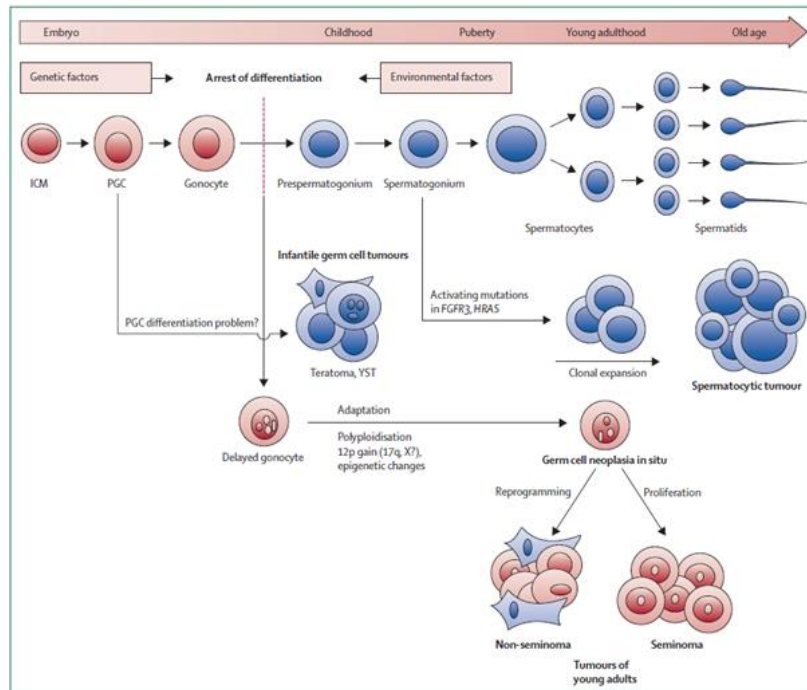


Figura 1. Etiopatogénesis del TTCG derivado del GCNIS. (14)

El tumor testicular presenta un origen multifactorial y en su etiopatogénesis está involucrada una combinación de factores (micro)ambientales y factores (epi)genéticos (se tratarán en mayor detalle en el apartado 1.1.5). Debido a que ambos factores contribuyen en el origen del tumor testicular, actualmente se ha determinado la hipótesis “*genvironmental*” como la explicación más plausible para el desarrollo del tumor testicular (15).

1.1.3. FACTORES DE RIESGO DEL TUMOR TESTICULAR

Actualmente han sido descritos numerosos factores que pueden aumentar la susceptibilidad de desarrollar un TTCG. A continuación se enumerarán los principales factores de riesgo, con la excepción de los factores de riesgo que hacen parte del Síndrome de Disgenesia Testicular (SDT), que serán tratados de forma individual en el apartado 1.2 de esta tesis doctoral.

- **Familiaridad:** Entre un 1.7% y un 5.5% de los pacientes afectados de TTCG presentan un familiar de primer grado afecto de tumor testicular (16–20). El riesgo de desarrollar un tumor testicular es

entre 4-6 veces mayor respecto a la población general en caso de tener un padre afecto de tumor testicular y entre 8-10 veces mayor en caso que el miembro familiar afectado sea un hermano (17,18,21,22). El hecho que exista un riesgo mayor en el caso de tener un hermano afectado que en el caso de la relación padre-hijo puede ser debido a un efecto combinado de factores ambientales y genéticos compartidos en ambos casos, o por un efecto ligado a elementos recesivos autosómicos o *X-linked* que han sido heredados (23,24). Esta evidencia se pudo confirmar con un estudio llevado a cabo por Swerdlow y colaboradores en 1997, donde se mostró un mayor riesgo de cáncer testicular en gemelos dicigóticos respecto a los gemelos monocigóticos (OR=1.5, 95%CI: 1.1-2.0) (25).

En un reciente estudio de cohortes llevado a cabo en aproximadamente dos millones de hombres nacidos entre 1951-2015 en Noruega se encontró una asociación familiar no solo en parientes de primer grado (padre/hermanos), sino que el riesgo de padecer un tumor testicular era mayor que en la población general cuando existía un tío paterno o materno afecto del tumor (con un doble riesgo de desarrollar un TTCG respecto a la población general en ambos casos) (26).

Hay que destacar que los padres que tienen hijos con tumor testicular padecen con mayor frecuencia la presencia de algún otro tipo tumoral (cáncer colorrectal, páncreas, pulmón, mama o tumores linfoproliferativos) (21).

Es oportuno precisar que los antecedentes familiares son uno de los factores de riesgo conocidos más importantes para el TTCG y son relativamente altos en comparación con otros tipos de cáncer. Un estudio nórdico de cohortes de gemelos determinó un efecto hereditario estimado del 37%, superior incluso al cáncer de mama (27). Además de este 37% de efecto hereditario, el efecto familiar del TTCG incluye un 24% atribuible al entorno compartido, siendo este tan alto como en el caso del cáncer de pulmón (27). La heredabilidad del TTCG se estima en i) aproximadamente en un 48% utilizando la base de datos de cáncer familiar de la población sueca y ii) alrededor de un 38% utilizando estimaciones genómicas extraídas en más de mil pacientes del Reino Unido (28).

- **Microlitiasis testicular:** No se ha evidenciado una clara relación entre la presencia de microcalcificaciones testiculares y la GCNIS. La mayoría de los estudios publicados informan de una asociación entre microcalcificación y tumor testicular homolateral (29), mientras que otros no

han demostrado una mayor incidencia de microlitiasis en pacientes con TTCG respecto a controles sin TTCG (30–36). Debido a la presencia de microcalcificaciones en otras patologías testiculares, se llegó a la afirmación de que si realmente existiera una fuerte asociación entre microcalcificaciones y TTCG, se debería de diagnosticar un mayor número de tumores testiculares en varones con microcalcificaciones sin otros factores de riesgo asociados (37). Por tales motivos, recientemente se ha propuesto que la presencia de microcalcificaciones testiculares determina un aumento de la susceptibilidad al desarrollo del TTCG no como factor independiente pero si como factor asociado a otras condiciones patológicas, como por ejemplo, infertilidad, criptorquidia o predisposición familiar (38).

- **Edad y etnia:** Como ha sido comentado anteriormente en el apartado de epidemiología, el tumor testicular tiene una mayor incidencia en la edad adulta joven, disminuyendo su incidencia a partir de la cuarta década de la vida (1). El tumor testicular afecta principalmente a jóvenes entre 25-35 año, aunque puede desarrollarse en cualquier momento de la vida. En lo particular, el Sm tiene un pico de incidencia en edades más tardías respecto al Nsm. En edades prepuberales el tumor testicular más frecuente es el tumor a células germinales no derivados de CGNIS, es decir, tumores del saco vitelino y teratomas (5,39).

La incidencia del cáncer testicular presenta una gran variación dependiendo de la etnia (40). Estudios llevados a cabo en Estados Unidos, un país multirracial, confirman esta variación étnica en paridad de exposición ambiental. La incidencia más baja se encontró en los hombres negros (0.3-1.4 por 100,000 personas), seguida de asiáticos/isleños del Pacífico e indios americanos o nativos de Alaska donde presentan una incidencia media del tumor testicular entre el 0.7-2.9 por cada 100.000 personas. Las tasas más altas se encuentran en los caucásicos blancos, con una incidencia de 3.2-6.3 por cada 100.000 personas (41). Por lo tanto el componente de *background* genético (especialmente polimorfismos comunes que varían entre etnias) debe de tener un papel relevante.

- **Tumor testicular contralateral:** En 1975 un estudio desarrollado en Noruega, y demostró que el haber padecido previamente un TTCG confería un riesgo relativo de desarrollar un segundo TTCG de 27.6 (95% CI: 21.1-35.6) (42). La posibilidad de desarrollar un segundo TTCG es mayor

en aquellos pacientes en los que la histología del primer tumor fue Nsm respecto aquellos cuya histología fue de Sm (riesgo relativo (RR)= 32.8, 95%CI: 19.7-51.2 vs RR= 18.8, 95%CI: 13.0-31.4, respectivamente), del mismo modo, en aquellos pacientes con una edad inferior a los 30 años (del debut del tumor testicular primario) tienen un mayor riesgo respecto aquellos pacientes con una edad superior a los 30 años (RR= 35.6, 95%CI: 25.1-49.0 vs RR= 20.5, 95%CI: 13.0-31.4).

- **Factores ambientales:** Diferentes estudios han analizado la influencia de diferentes factores ambientales durante la vida del individuo y su posible asociación a un mayor riesgo de TTCG. Se ha analizado la asociación entre la exposición a sustancias de origen industrial (industria del papel, industrias relacionadas con el plástico o industrias metalúrgicas) y el riesgo de desarrollo de TTCG, mostrando resultados contradictorios y con asociaciones poco claras (43–49). Otras influencias ambientales que han sido valoradas son la exposición a los campos magnéticos (45,50) o la exposición a organoclorados (51–53), pero ninguno de ellos ha demostrado tener una clara asociación con el TTCG.

Una clara indicación de la influencia de los factores ambientales en la etiología del TTCG origina desde los estudios epidemiológicos sobre los movimientos migratorios y su relación con el riesgo de tumor testicular. Un estudio danés llevado a cabo en 2007 (54), observó que los inmigrantes en Dinamarca de primera generación presentaban un riesgo de desarrollar un tumor testicular similar al de sus países de origen, independientemente de la edad de inmigración y la duración de la residencia en Dinamarca. Por lo que el riesgo de TTCG en la primera generación de inmigrantes no se vio influenciado por los factores ambientales en su nuevo país anfitrión. Por el contrario el riesgo de TTCG en los inmigrantes de segunda generación fué más del doble que los inmigrantes de primera generación. Un posterior estudio sueco ha llegado a la misma conclusión demostrando diferencias de incidencia del TTCG entre la primera y segunda generación de emigrantes (55). Estos datos sugieren en primer lugar la importancia de los factores ambientales y en segundo lugar indican que la influencia de los factores ambientales en el desarrollo de este tipo de cáncer es limitado a un periodo temprano en la vida, precisamente en la vida intrauterina. A pesar de que estos resultados demuestran la importancia de los factores ambientales en la etiología del TTCG, es importante tener en cuenta

que los factores ambientales actúan sobre un *background* genético diferente entre diferentes individuos y hay diferencias establecidas entre las diversas étnicas. De hecho, se ha demostrado que los varones de ascendencia asiática o africana mantienen un bajo riesgo de desarrollar un TTCG a pesar de haber nacido en países con un alto nivel de incidencia (56).

1.1.4. FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES.

En literatura, a pesar de no encontrarse claras evidencias de factores genéticos involucrados en la etiopatogénesis del TTCG, es posible hallar cada vez más información sobre alteraciones genómicas que no son una causa directa pero que aumentan el riesgo de desarrollo del TTCG. Los estudios iniciales sobre genes candidatos no han identificado factores genéticos de interés diagnóstico para el TTCG (23). El gen *AR* que codifica el receptor androgénico y en lo específico el microsatelite polimórfico CAG ha sido analizado en relación a su participación en el desarrollo del TTCG (57–59), esta relación será tratada más extensamente en el apartado específico del receptor androgénico. El avance en la identificación de nuevos factores genéticos de susceptibilidad para el desarrollo del TTCG ha sido posible con el advenimiento de nuevas plataformas tecnológicas, como el SNP-array. Estas nuevas tecnologías permitieron la difusión de un nuevo enfoque, definido como genome-wide, a través del cual ha sido posible la realización de un análisis completo de las variaciones de secuencia del entero genoma en poblaciones de estudio extremadamente amplias (*Genome Wide Association Study*, GWAS) (23,60,69–71,61–68). Estudios GWAS sobre el TTCG han identificado, hasta el momento, más de 50 *loci* independientes con alelos específicos asociados con el TTCG (72).

La mayor parte de las evidencias apoyan la hipótesis de que la predisposición al TTCG está constituida principalmente por el efecto concertado de varios *loci* de riesgo comunes, que alteran procesos biológicos fundamentales para el desarrollo de las células germinales masculinas. Cada variante individual hace una modesta contribución al riesgo genético general de desarrollar el TTCG, pero sumadas conllevan a una, relativamente, mayor tasa de riesgo, proponiéndose un modelo poligénico para el TTCG (73).

En estos estudios GWAS sobre el TTCG, se han destacado múltiples variantes centinela, muchas de las cuales son localizadas en intrones, o muy cerca, de genes que podrían estar asociados con el TTCG.

El primer locus de riesgo identificado para el TTCG mediante un estudio GWAS, fue el 12q21, que alberga el gen *KITLG*. Este locus sigue siendo el factor de riesgo genético más fuerte para el TTCG (OR mayor de 2.5). *KITLG* codifica una molécula que interacciona con el receptor de membrana tirosinoquinasa (KIT), siendo definida por sus funciones como “factor de las células estaminales”. *KITLG* constituye, junto a su propio receptor, el complejo c-KIT-KITLG que tiene un papel central en la regularización de múltiples aspectos de las células germinales primordiales como la supervivencia, la proliferación y la migración (62,63). Experimentos en roedores han demostrado que los topos homocigóticos y heterocigóticos para la delección germinal de los genes *KITLG* y *c-KIT* resultaron ser infértiles y con una alta probabilidad de desarrollar un TTCG (74,75). Estudios funcionales en líneas celulares humanas han demostrado que la señal de unión de este locus se encuentra mediada por un efecto de unión específico del alelo al *p53* y a un consecuente aumento de la expresión de *KITLG*, que probablemente aumenta la señalización de la vía de KIT, y por lo tanto la proliferación de las células germinales (76). Otros *loci* que contienen genes relacionados con *KIT* son el 5q31 (*SPRY4*), 6p21 (*BAK1*) y el 11q14.1 (*GAB2*) (62,63,68). *SRPY4* es un gen localizado en el cromosoma 5 y codifica un miembro de una familia compuesta por 4 genes, implicados en la regularización negativa del RAS-ERKMAPK en respuesta a factores de crecimiento. Este *loci* comporta un riesgo de más de 1.5 veces de desarrollar un TTCG (63). El gen *BAK1* (*BCL2-Antagonist/Killer1*) con un OR de 1.5 de desarrollar un TTCG(63), está situado en el cromosoma 6, codifica una proteína que promueve la apoptosis ligándose y antagonizando la actividad del receptor apoptótico BCL2 y de otras proteínas apoptóticas. *GAB2* (OR=1.26 para el TTCG, (68)), codifica una proteína de acoplamiento que pertenece a la familia de proteínas GRB2. Bajo una estimulación por moléculas extracelulares tales como factores de crecimiento o citoquinas, el *GAB2* se fosforila y activa una serie de vías como PI3K/Akt y RAS/MAPK (77). Por lo que *GAB2* interviene en la regulación de numerosos procesos biológicos (proliferación, supervivencia, migración y

diferenciación celular). Alteraciones en el funcionamiento de *GAB2* han sido asociadas a diferentes tumores, tales como el cáncer de mama, leucemia, melanoma u ovario (78). Todos estos estudios han establecido que la vía de señalización KIT juega un papel central en la etiopatogénesis del TTCG; además de estar implicada en el desarrollo de otras neoplasias (mama, colorectal, etc).

Otros *loci* relacionados con el TTCG contienen genes involucrados en diferentes *pathways*, algunos de los cuales ya se han asociado con otros tipos tumorales, como por ejemplo, genes que intervienen en la respuesta al daño del ácido desoxirribonucleico (ADN) (*MCM3AP*, *TIPIN*, *RAD51C/PPM1E*, *RFWD3*), genes implicados en la mitosis (*MAD1L1*) o genes involucrados en el mantenimiento de los telómeros (*TERT*, *ATF7IP*, *PITX1*). Por el contrario, existen genes involucrados en *pathways* típicos de los TTCG, como por ejemplo, la determinación del sexo, refiriéndose en particular al locus 9p24, que contiene el gen *DMRT1* (66,79). Su expresión es necesaria en muchas especies para la diferenciación de la línea celular masculina, además, en el ratón “*knockout*” *DMRT1* se caracteriza por el desarrollo de tumores testiculares. En humanos este *loci* presenta un doble riesgo de desarrollar el TTCG. Otro *pathway* específico del TTCG es el implicado en el desarrollo de las células germinales, tales como el locus 3p24.2 que contiene el gen *DAZL* (OR=1.24) y el 8q13.3 que contiene el gen *PRDM14* (OR=1.21) (65). *DAZL* codifica una proteína de unión al ácido ribonucleico (ARN), que ha demostrado tener un papel central en las primeras etapas de la diferenciación de las células germinales primordiales humanas. El ratón nulo para *DAZL* (*Dazl* *-/-*) es estéril, con una detención de la diferenciación de las células germinales primordiales en la fase de espermatogonia tipo A. *PRMD14* codifica un factor de transcripción, que modula la expresión de genes de pluripotencia en las células germinales primordiales, como son el *POU5F1* (también conocido como *OCT4*) y *SOX2* (76).

Gracias a los *loci* de riesgo actualmente conocidos para el TTCG se logra explicar el 37% del mayor riesgo de desarrollar este tipo de tumor entre hermanos afectados (61). En comparación con otros tipos tumorales, se ha contabilizado una alta proporción de heredabilidad *loci*-específica. El mayor conocimiento de *loci* de riesgo para el TTCG nos permite una mayor comprensión de la arquitectura

genética subyacente del TTCG. Para poder examinar el valor predictivo de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) relacionados con el TTCG se han realizado modelos de “*Polygenic risk scores*” (PRS) para así capturar el impacto colectivo de estas variantes en el TTCG (80). Por ejemplo Litchfield en 2015 (80), usó una combinación de PRS con los 19 SNP conocidos hasta ese momento, y los valores seminales. Gracias a una simulación que prevee un *screening* de población con esta combinación de SNPs logró un valor predictivo positivo de casi un 60%. Los PRS podrían ser útiles como modelos predictivos de enfermedad permitiendo un diagnóstico precoz del tumor con la consiguiente reducción de tumores invasivos, del número de ciclos o de la dosis de quimioterapia y sobretodo aumentando la supervivencia del paciente. Se prevé, que en el futuro debido a un mayor conocimiento de *loci* implicados en el TTCG y la asociación de otros factores de riesgo clínicos a estos modelos de PRS se podrá aumentar su valor predictivo.

Otra técnica de análisis diferente al GWAS es el análisis de la porción del genoma que codifica proteínas (*whole exome sequencin*: WES). El WES es una técnica que permite capturar y secuenciar selectivamente las regiones codificantes de todos los genes señalados como codificadores de proteínas, considerando que el 85% de las mutaciones causantes de enfermedades están localizadas en regiones codificantes y funcionales del genoma (81). Inicialmente, la introducción de WES ha sido propuesta para identificar unas causas monogénicas de transmisión mendeliana del TTCG. A pesar de que el componente genético debe ser muy importante en la etiología del TTCG, los estudios WES no han identificado causas monogénicas. En particular, Litchfield y colaboradores (73) llevaron a cabo un estudio para analizar la presencia de uno o más genes que predispongan al desarrollo del TTCG. Realizando WES en 919 casos de TTCG comparándolos con 1609 controles sanos. Los investigadores examinaron variantes no-sinónimas individuales raras (<1%) y de baja frecuencia (1-5%) para su asociación con el TTCG. En general, se detectaron 966,695 variantes raras y 4,994 variantes de baja frecuencia; sin embargo, ninguna variante mostró una asociación con el TTCG por encima de un umbral de significación. El análisis de variantes raras no sinónimas se analizó a nivel de gen y se organizó en tres grupos (T1: variantes disruptivas; T2, predichas como deletéreas; y T3, todas las no-sinónimas) y mostró que ningún gen dentro de ningún grupo de variantes tenía una

asociación significativa con el TTCG. Las pruebas de carga genética de 114 genes establecidos de susceptibilidad al cáncer de penetrancia alta o penetrancia moderada no mostraron asociaciones con el TTCG. Además ningún gen identificado mediante GWAS mostró una asociación con TTCG después del análisis de la carga génica en los 59 genes asociados a los 60 *loci* establecidos. Por lo que no se encontró evidencia estadística que apoye la existencia de un gen de susceptibilidad para el TGCT 'importante', es decir, un gen para el cual las mutaciones confieren un riesgo relativo de más de diez veces con una frecuencia de mutación en la población de $> 0.01\%$. Ciertamente podrían existir genes de menor tamaño de efecto de la mutación y/o frecuencia.

Un posterior estudio (82) realizado en 19 familias españolas afectadas de TTCG, cada una de las cuales con al menos dos individuos afectados, describieron tres variantes raras, catalogadas como patogénicas, en tres genes candidatos: *PLEC* (p.Arg433Gln con OR=6.28), *EXO5* (p.Arg344AlafsTer10 con OR=3.37) y *DNAH7* (p.Tyr2054Cys con OR=1,64). Uno solo de ellos, la variante p.Arg433Gln en el gen *PLEC* segrega completamente con la enfermedad en dos familias mientras los otros dos sólo con penetrancia incompleta. Estos genes están involucrados en procesos y funciones del desarrollo y diferenciación de las células germinales primordiales, en particular, *DNAH7* codifica una ATPasa implicada en la espermatogénesis. *EXO5*, en cambio, codifica una exonucleasa bidireccional específica para el ADN monocatenario, involucrado en la reparación del ADN. Finalmente, *PLEC*, codifica una plectina, expresada en la superficie nuclear de las células de Sertoli y a nivel de los puntos de unión de las espermátidas alargadas. Aunque estas mutaciones han sido reportados también en controles con una frecuencia significativamente más baja que en los pacientes, su utilidad clínica es muy baja. De hecho no se trata de la identificación de una etiología monogénica con causa-efecto si no de nuevos factores de riesgo para el TTCG.

Es importante destacar que las OR son mayores en los estudios WES respecto a GWAS debido a que son basados en estudios familiares y en una sola población de estudio.

Gracias a los estudios de secuenciación genómica cada vez más económicos y accesibles, se están describiendo constantemente nuevos *loci* relacionados con el TTCG, permitiéndonos un mayor conocimiento de la etiopatogenia de este tumor.

1.1.5. ALTERACIONES EN EL CROMOSOMA Y COMO FACTORES DE RIESGO DEL TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES

Debido a la estrecha relación entre el TTTCG e infertilidad y la importancia del cromosoma Y en esta última condición patológica, se han realizado diferentes estudios valorando algunas alteraciones estructurales a cargo de este cromosoma sexual con el fin de individuar una eventual relación con un mayor riesgo de desarrollar un TTTCG.

El cromosoma Y humano difiere notablemente del resto de cromosomas en términos de su tamaño, estructura genómica, contenido y trayectoria evolutiva (83). El cromosoma Y es un cromosoma acrocéntrico formado por dos regiones pseudoautosómicas (PAR1 y PAR2) y la MSY (*male-specific Y region*), que representa el 95% de la entera longitud del cromosoma Y. Las regiones pseudoautosómicas (PAR) corresponden a un bloque homólogo entre el cromosoma X y el cromosoma Y, y contiene una serie de genes involucrados en diversas funciones biológicas. La región MSY no se recombina con el cromosoma X, esta región contiene 156 unidades de transcripción que incluyen 78 unidades de codificación de proteínas (27 genes), aunque el número de genes puede variar entre diferentes cromosomas Y (84). La mayoría de los genes que están involucrados en la espermatogénesis se mapean en secuencias amplicónicas. Estas secuencias amplicónicas se caracterizan por ser pares de secuencias casi idénticas y repetidas entre una o más regiones dentro del MSY, estando organizadas en ocho grandes palíndromos. Esta disposición de secuencias repetidas predispone a la delección/duplicación de material genético entre las secuencias repetidas mediante recombinación homóloga no alélica (NAHR) con un potencial efecto sobre la espermatogénesis (85).

Las regiones con una gran importancia y relacionadas con la espermatogénesis son las regiones azoospermia factor (AZF) que están localizadas en el brazo largo del cromosoma Y, formando parte de la región MSY(86). Las regiones AZF (AZFa, AZFb y AZFc), contienen genes de gran importancia para una correcta producción espermática. La región AZFa abarca aproximadamente 1100 Kb de longitud y engloba los genes de copia única *USP9Y* (ex *DFFRY*) y *DDX3Y* (ex *DBY*). Las regiones AZFb y AZFc comprenden ambas 24 genes, la mayoría de los cuales están presentes

en múltiples copias, presentando un total de 46 copias. La deleción completa de la región AZFb (6.2 Mb) incluye la eliminación de 32 copias de genes y unidades de transcripción y es debida a la recombinación homóloga entre los palíndromos proximales P5/P1, esta deleción completa de las región AZFb incluye parte de la región AZFc pertenecientes a P1 (87,88). La región AZFc contiene 12 genes y unidades de transcripción. La deleción completa de la región AZFc consiste en la deleción de 3.5 MB, se produce debido a la recombinación homóloga entre los amplicones b2 y b4 en palíndromos P3 y P1, respectivamente, dando lugar a una deleción de 21 copias de genes y unidades de transcripción (87,89). Las deleciones juntas de AZFb y AZFc ocurren por una recombinación homóloga entre P5/P1 distal o entre P4/P1 distal (88). Figura 2

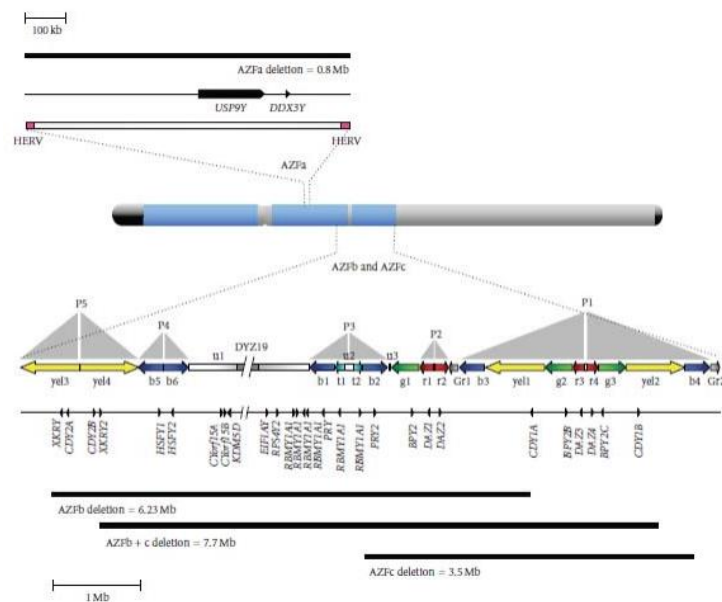


Figura 2. Representación esquemática del cromosoma Y. (90)

Entre las deleciones anteriormente descritas la más frecuente es la de la región AZFc (80%), seguidas de la AZFa (0.5-4%), AZFb (1-5%) y AZFbc (1-3%). Las deleciones/microdeleciones de las regiones AZF son una causa genética confirmada de alterada espermatogénesis, siendo presentes en el 5-10% de las azoospermias y en el 2-5% de los hombres con oligozoospermia severa (85,87).

Existe la deleción de todas las regiones AZF (AZFa, AZFb, AZFc), pero este tipo de deleción es más frecuente en alteraciones en el cariotipo, tales como 46, XX male o en el iso(Y) (87).

La región AZFc es particularmente susceptible a eventos NAHR que pueden provocar deleciones o duplicaciones parciales (91). A pesar de que se han descrito diferentes deleciones parciales de la región AZFc (*gr/gr*, *b1/b3*, *b2/b4*), sólo la deleción *gr/gr* ha tenido un gran interés clínico. La deleción *gr/gr* se describió por primera vez en 2003 por Repping *et al.* y debe su nombre a la fluorescencia de las sondas utilizadas (“*green*” y “*red*”) (92). La frecuencia y el efecto fenotípico de la deleción *gr/gr* presenta variaciones entre los diferentes grupos étnicos, por ejemplo, el riesgo de oligozoospermia en los portadores de la deleción *gr/gr* es mayor en el área mediterránea, siendo del 5.8 (CI 2.0–16.9) y 2.9 (1.0–8.0) en la población italiana y española, respectivamente (85).

Se ha estudiado una posible relación entre las otras deleciones parciales de la región AZFc (*b2/b3* y *b1/b3*) y una alterada espermatogénesis. La deleción *b2/b3* consiste en la deleción de 1.8 Mb mientras que la deleción *b1/b3* es de 1.6 Mb. Ambas deleciones dan como resultado la deleción de 12 copias génicas y unidad trascricional (pero con una diferencia en cuanto a las copias genicas de *CDY1* y *DAZ*: una copia *CDY1* y dos copias *DAZ* para la deleción *b2/b3* y ninguna copia de *CDY1* y dos copias *DAZ* para la deleción *b1/b3*). Aunque parece que estas deleciones no tengan un efecto significativo sobre la espermatogénesis en las poblaciones europeas (92–94), la deleción *b2/b3* muestra una fuerte asociación con la infertilidad masculina (95–98) en poblaciones chinas, marroquíes e del sur de la India. Poco es conocido sobre el efecto de la deleción *b1/b3* a causa de su baja frecuencia. Sin embargo, el análisis de 20.000 cromosomas Y reveló que los portadores de tal deleción parcial, presentaban un riesgo de desarrollar una severa alteración de la espermatogénesis de 2.5 veces mayor que los sujetos no portadores (94).

Por otro lado, se ha estudiado la relación entre las duplicaciones parciales de la región AZFc (perdida de material genético a nivel de una de las dos cromatides y la sucesiva adquisición del mismo material genético delecionado por parte de la otra cromatide hermana) y la infertilidad masculina con resultados contradictorios. Estudios llevados a cabo en población china han reportado una asociación entre el incremento de la dosis génica de la región AZFc y la infertilidad masculina (99–101). Igualmente, un estudio holandés realizado sobre una cohorte multiétnica ha sugerido que una dosis más alta de *DAZ* podría ser perjudicial para una correcta espermatogénesis (102). Esta asociación no

ha sido encontrada en población italiana y española, donde la frecuencia de las duplicaciones en pacientes con una alterada espermatogénesis y controles normozoospermicos eran similares (103,104),

Como se ha comentado, el cromosoma Y tiene un importante papel en la espermatogénesis debido a que alberga genes esenciales para una correcta producción espermática. El TTCG es más frecuente en varones con una espermatogénesis alterada, lo que indica la existencia de una posible etiopatogenia común. De hecho, la indiferenciación de los gonocitos puede dar lugar tanto a una espermatogénesis alterada como al desarrollo del TTCG. Por este motivo, se han realizado varios estudios para valorar una posible asociación entre las aberraciones del cromosoma Y y un mayor riesgo de desarrollar un TTCG.

El primer estudio que analizó la asociación entre deleciones de la región AZF y el riesgo de TTCG se llevó a cabo por Frydelun-Larsen y colaboradores en el 2003. En este estudio no se pudo evaluar las deleciones parciales y sólo se utilizaron marcadores de las deleciones AZF clásicas, se analizaron a 160 daneses afectados de TTCG, utilizando como grupo control a 100 personas sanas. El estudio no identificó ningún tipo de deleción de la región AZF en ninguno de los 160 pacientes con tumor testicular, por lo que concluyeron que las deleciones de la región AZF no son frecuentes en pacientes con TTCG en Dinamarca (105). Dos posteriores estudios llevados a cabo en 112 pacientes holandeses con TTCG (106) y 185 pacientes daneses afectos de TTCG (107) confirmaron la ausencia de relación entre deleciones de AZF y el riesgo a desarrollar un TTCG. Pero estos estudios no descartaban que posibles deleciones constitucionales de menor tamaño u otro tipo de mutaciones en genes mapeados en la región AZF pudieran estar relacionados con el mayor riesgo de desarrollar un TTCG.

Del mismo modo los estudios que intentaron relacionar un mayor riesgo de TTCG con los diferentes haplogrupos del cromosoma Y no lograron encontrar ningún tipo de asociación entre ambos conceptos (108–110).

Con respecto a las deleciones parciales de AZFc, la deleción *gr/gr* es, actualmente, la única alteración del cromosoma Y a la que se ha relacionado un potencial papel en el desarrollo del TTCG. El primer estudio llevado a cabo por Nathanson y colaboradores en 2005 (111) analizó 1842 pacientes afectos

de TTCG esporádico y 2599 controles. El 2% de los pacientes con TTCG eran portadores de la deleción *gr/gr*, mientras que la frecuencia de esta deleción en el grupo control fue significativamente más baja, 1.3%. Por lo que ser portador de la deleción *gr/gr* comportan un doble riesgo de desarrollar un TTCG respecto aquellos que no son portadores de esta deleción (OR= 2.1; 95% CI: 1.3-3.6). Sin embargo, cuando se subdividió el grupo de pacientes con TTCG según el histotipo testicular, se observó un riesgo aún mayor en el histotipo Sm respecto al Nsm. En este mismo trabajo notificaron que el riesgo de desarrollar un TTCG en pacientes con familiaridad para el TTCG es de 3 veces mayor en varones portadores de la deleción *gr/gr* respecto a los que no presentan la deleción (OR= 3.2, 95%CI: 1.5-6.7). La deleción *gr/gr* se asocia a un fenotipo seminal variable (desde azoospermia a normozoospermia), por lo que los sujetos portadores de la deleción y que no sean azoospermicos pueden transmitir a sus hijos varones este tipo de deleción y por lo tanto un mayor riesgo de desarrollar un TTCG.

Dos posteriores estudios llevado a cabo en dos pequeñas poblaciones inglesas e italianas no encontraron ningún tipo de asociación entre la deleción *gr/gr* y el TTCG (110,112). De los tres estudios mencionados, solamente en uno de ellos mostraba información sobre el fenotipo seminal de los pacientes analizados (110), este estudio se basaba sobre una pequeña cohorte italiana de 118 pacientes afectos de TTCG y en la que no se encontró ningún tipo de asociación entre la deleción *gr/gr* y el TTCG, tampoco se observaron diferencias al comparar pacientes dependiendo de su histotipo (Sm y Nsm), ni al comparar pacientes con TTCG con normozoospermia y azoo/oligozoospermia. Por lo tanto, queda por clarificar si la asociación entre la deleción *gr/gr* y el TTCG está relacionada con la espermatogénesis alterada o es un factor independiente.

Respecto a las otras microdeleciones b2/b3, b1/b3 o duplicaciones de la región AZFc no existen artículos que hayan estudiado su potencial relación con el TTCG.

Por otra parte, la presencia de mosaicismo relativo a la pérdida del cromosoma Y (mLOY) en sangre periférica, ha sido asociado con un mayor riesgo de desarrollar un proceso tumoral, pero sin estudiar su relación con en el TTCG (113). Sólo un reciente estudio en 2017 estudió la posible asociación entre mLOY y el TTCG, sugiriendo que los pacientes con TTCG familiar tenían tasas elevadas de

mLOY, mientras que esto no ocurre en los casos de TTCG esporádicos, donde no se encontró asociación (OR= 0.34, 95%CI= 0.10–1.17, $p= 0.09$) (114).

1.2. SÍNDROME DE DISGENESIA TESTICULAR Y SU RELACIÓN CON EL TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES

1.2.1. Definición del Síndrome de disgenesia testicular

En el 2001, Skakkebaek y colaboradores avanzaron la hipótesis del SDT según la cual cuatro condiciones patológicas, criptorquidia, hipospadias, infertilidad y TTCG, estaban interrelacionadas entre ellas (115). Posteriormente en 2016, se añadió un nuevo parámetro antropométrico (distancia anogenital (DAG) más corta) como el quinto componente del SDT (116). La hipótesis del SDT se origina a raíz de estudios epidemiológicos donde informaron de un aumento a nivel global y en paralelo de las diferentes condiciones patológicas, previamente nombradas, en los últimos cincuenta años. Contemporáneamente al aumento de la frecuencia en el diagnóstico del TTCG y una reducción en la calidad seminal en los adultos jóvenes, se ha encontrado un aumento en la incidencia de malformaciones congénitas tales como criptorquidia e hipospadias en los recién nacidos (117). Estos datos son soportados sea de la evidencia según la cual tener una de estas condiciones patológicas comporta un mayor riesgo de desarrollar alguna de las otras condiciones patológicas o de una tendencia en aumento y en paralelo, de las cuatro condiciones patológicas. Por lo tanto se ha hipotetizado que ambas condiciones patológicas (criptorquidia, TTCG, hipospadias y una alterada espermatogénesis) forman parte de una misma entidad subyacente con un origen etiológico en común (115).

Un estudio llevado a cabo sobre 32.442 hombres daneses infértiles demostró que existía una asociación entre tener un seminograma alterado y el riesgo de desarrollar un TTCG. Se definió un riesgo de 1.6 veces mayor respecto a la población general de desarrollar un TTCG en caso de presentar alteraciones en el seminograma (118). En consonancia con estos datos, otro estudio

evidenció que había un mayor riesgo de desarrollar un TTTCG en aquellos pacientes con un menor número de hijos, determinando que los hombres que habían engendrado un hijo o que habían embarazado a una mujer tenían un riesgo significativamente menor de desarrollar un TTTCG. Incluso el riesgo disminuía aún más según aumentaba el número de hijos (119).

En los últimos años, varios estudios han señalado que el TTTCG y la infertilidad masculina están correlacionados con la criptorquidia. Un importante estudio llevado a cabo sobre 350.835 jóvenes, de los cuales 7499 había sido diagnosticados de criptorquidia testicular, demostró que los jóvenes que presentaban un testículo no descendido tenían el doble de probabilidad de desarrollar un TTTCG respecto a varones sin criptorquidia (OR= 2.43, 95%CI: 1.65-3.58), incluso afirmaron que el aplazamiento de la cirugía de orquidopexis aumentaba el riesgo de desarrollar un TTTCG (por cada 6 meses que se retrase la cirugía correctora de criptorquidia, el riesgo de desarrollar un TTTCG aumentaba en un 6%). Este mismo estudio confirmó la asociación entre criptorquidia e infertilidad, mostrando que existe un doble riesgo de presentar infertilidad en caso de haber sufrido criptorquidia previa respecto a aquellos sujetos que no presentaban tal malformación genital (OR= 2.26, 95%CI: 1.58-3.25) (120).

Del mismo modo que se ha estudiado la correlación entre criptorquidia, TTTCG e infertilidad, también se ha llevado a cabo con el cuarto componente del SDT; el hipospadias. Se describió que aquellos pacientes con hipospadias presentaban un 21% menos de probabilidad de paternidad respecto a los nacidos sanos, con una reducción similar para aquellos que se sometieron a una cirugía de reparación de hipospadias (0.84 95%CI: 0.74-0.95) (120). Nacer con hipospadias se asoció con un mayor riesgo de desarrollar un TTTCG (riesgo relativo= 2.13, 95%CI: 1.26-3.61) (121).

1.2.2. Etiopatogénesis del Síndrome de disgenesia testicular

Hasta la fecha, se sabe que las cinco patologías que forman parte del SDT tienen un origen fetal común y son debidas a errores o alteraciones en la diferenciación o funcionalidad de las células de Leydig y/o de las células de Sertoli (115).

Las células de Sertoli son necesarias para crear un ambiente adecuado con el objetivo de facilitar los procesos necesarios para la diferenciación de las células germinales tanto durante la vida fetal como

en la edad adulta (122). Durante la edad fetal, las células de Sertoli sirven de apoyo para las células germinales primordiales durante la proliferación y maduración de los gonocitos. Por lo tanto es comprensible que un mal funcionamiento de las células de Sertoli produzca una reducción en el número y en la calidad de las células germinales maduras y al mismo tiempo un bloqueo madurativo de los gonocitos. En el primer de los casos nos encontraremos con una alterada espermatogénesis y en el segundo de los casos con el desarrollo de una GCNIS (123).

Es importante precisar que la actividad de las células de Sertoli está sometida a una regulación hormonal, principalmente por la testosterona. La importancia de las células de Leydig recae en la producción de andrógenos fetales y la producción de Péptido Insuli-like 3 (INSL-3). Por lo que una disfunción de las células de Leydig produce una alteración en la producción de testosterona e INSL-3, conllevando a un desarrollo anormal de los genitales masculinos; hipospadias y criptorquidia y una DAG corta. Figura 3.

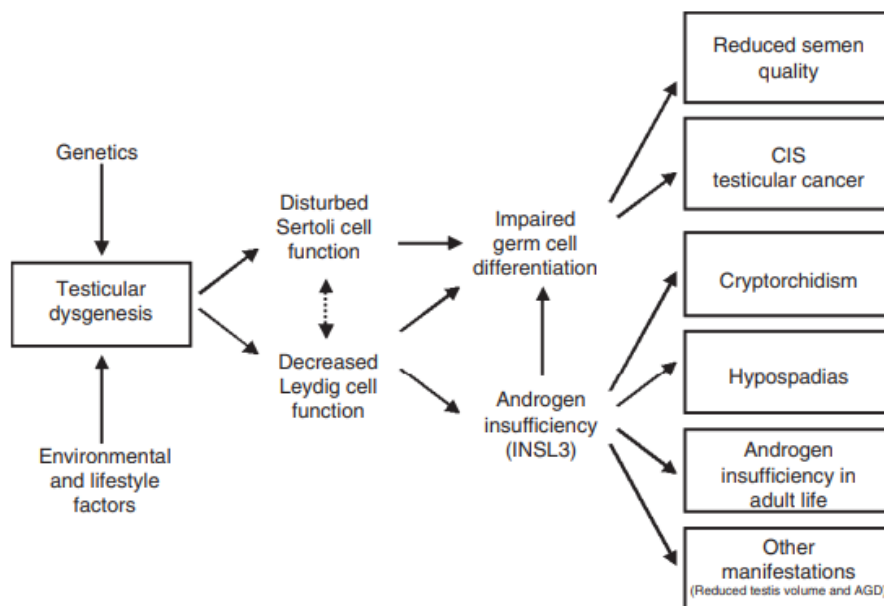


Figura 3. Representación esquemática de las relaciones patológicas entre los componentes y las manifestaciones clínicas del SDT.(115)

Modelos animales llevados a cabo en ratones permitieron realizar un importante hallazgo, relacionando los trastornos del SDT con la acción androgénica durante un periodo fetal concreto, denominando este periodo “*masculinization programming window*” (MPW) (124). El MPW en el hombre tiene lugar durante la 8-14 semana fetal (125), siendo este un momento crucial para el

desarrollo del tracto genital masculino y los fenómenos de masculinización, tales como la distancia anogenital. El MPW está altamente regulado a través de las hormonas sexuales, por lo que un efecto antiandrógeno o estrogénico en este periodo (como por el ejemplo la acción de los disruptores endocrinos ambientales (EDC)) podría provocar un desequilibrio hormonal importante en el MPW (126).

1.2.3. Factores de riesgo ambientales del Síndrome de disgenesia testicular

La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de América define los EDC como “agentes exógenos que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de las hormonas producidas naturalmente al interior del organismo y responsables del mantenimiento de la homeostasis y de la regulación de los procesos de desarrollo”.

Los EDC producen enzimas con efecto estrogénico, antiandrógeno y esteroideogénico, y su efecto dependerá de la dosis de la sustancia química, así como de la duración a la exposición y la susceptibilidad genética al mismo o del momento del desarrollo del individuo expuesto al compuesto. Por lo que una exposición intrauterina a determinados EDC pueden producir un efecto sobre el desarrollo del sistema genitourinario en el feto.

Los EDC actúan principalmente a través de una actividad estrogénica (como por ejemplo el dietilestilbestrol, etinilestradiol y el bisfenol A) o antiandrógena (como los ftalatos; dibutil ftalato, dietilhexil ftalato, diisononil ftalato, bencilbutil ftalato), pudiendo activar (acción agonista) o inhibir (acción antagonista) los receptores tanto estrogénicos como los androgénicos mediante una interacción directa. Esto produciría un desequilibrio en la acción de las hormonas sexuales, constituyendo el origen de las cuatro condiciones patológicas del SDT (127).

La lista de posibles EDC candidatos con actividad antiandrogénica y estrogénica está en continua actualización: i) productos químicos sintéticos y sus derivados; ii) plastificantes; iii) pesticidas; iv) fungicidas; v) drogas o estrógenos sintéticos; vi) sustancias químicas naturales; vii) metales pesados. Cabe destacar la amplia gama de pesticidas utilizados en agricultura, que hace que la identificación

de una sustancia química única como posible EDC sea muy laboriosa, y se piense que el efecto sobre el hombre sea más probable a una mezcla de pesticidas que a la actuación de un único compuesto.

Varias evidencias han demostrado que la principal categoría de EDC responsable de un aumento en el riesgo de criptorquidia sean los pesticidas. Durante el embarazo, estas sustancias pueden ser transferidas desde la madre al feto a través de la placenta y acumularse en la leche materna (128). Los niños nacidos de madres que trabajaban en invernaderos agrícolas, y por lo tanto, que tenían una mayor exposición a pesticidas, presentaban un riesgo multiplicado por tres de criptorquidia respecto a los hijos de madres que no desempeñaban esa labor (129).

Los EDC con actividad antiandrogénica junto con un agonista del receptor de estrógenos (dietilestilbestrol) son de gran importancia en el desarrollo de hipospadias y de criptorquidia. Esto está en línea con el hecho de que la exposición materna a los estrógenos reduce la expresión de INSL3 en las células de Leydig fetales, provocando una localización intra-abdominal de los testículos en ratones (130). Un estudio llevado a cabo en Holanda informó de una prevalencia de hipospadias del 2% en niños nacidos de madres expuestas a dietilestilbestrol durante el embarazo en comparación con el 0.09% de prevalencia de hipospadias en los hijos de madres que no habían estado en contacto con este compuesto químico (131). Un posterior estudio llevado a cabo en Francia informó que la exposición durante el embarazo a dietilestilbestrol aumentaba la prevalencia de hipospadias en las dos generaciones sucesivas, por lo que sugiere que existe un mecanismo biológico epigenético en los EDC (132).

Respecto a las alteraciones de la espermatogénesis por efecto de los EDC, un estudio comparó la calidad seminal de los hombres que trabajaban en un área agrícola de Missouri, donde había un gran uso de pesticidas, con los valores seminales de varones que vivían en un entorno urbano de Minnesota, donde teóricamente no había una exposición a estos compuestos químicos. El estudio demostró que los varones de áreas agrícolas presentaban peores parámetros seminales, con una reducción en la concentración y movilidad espermática respecto a los varones que habitaban en zonas urbanas (133). De igual modo, otros EDC como el bisfenol A aumenta los niveles de prolactina,

estradiol y de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), por lo que contribuye a un deterioro en la calidad espermática (134).

Varios productos químicos, como el diclorodifenildicloroetileno, el polibromodifenil étere, el hexaclorobenceno, el bifenilo policlorado u otros compuestos orgánicos están relacionados con un mayor riesgo de desarrollar TTCG. Se han encontrado mayores concentraciones de organoclorados en la sangre de madres con hijos afectados de TTCG que en la sangre de madres de hijos sin TTCG (135). Posteriores estudios relacionaron la exposición a EDC durante la pubertad como un posible factor de riesgo para el desarrollo del TTCG, y sobre todo en relación con el Sm (136).

Un grupo de EDC de gran importancia son aquellos que presentan actividad antiandrógena, en especial los ftalatos. Estudios animales han demostrado que una exposición a estos compuestos durante el embarazo altera la función de las células de Leydig fetales (137). Posteriores estudios, también llevado a cabo en animales, han relacionado la exposición a diferentes tipos de ftalatos con un mayor riesgo de malformaciones en el tracto urogenital masculino (138,139). El efecto nocivo del bis (2-etilhexil) ftalato sobre la salud reproductiva es ampliamente conocido desde los años ochenta. Estudios en roedores expuestos a esta sustancia mostraron alteraciones fenotípicas similares a las del SDT en el hombre (140), del mismo modo otros compuestos como el ftalato de diisononilo produce una alteración en la expresión de genes esteroideogénicos en las células de Leydig fetales provocando un SDT en ratones (141).

1.3. RECEPTOR ANDROGÉNICO

1.3.1. Estructura y mecanismo de acción

El AR pertenece al grupo de los receptores de hormonas esteroideas, al igual que el receptor de estrógenos, el receptor de glucocorticoides, el receptor de progesterona y el receptor de mineralocorticoides (142). El AR funciona como un factor de transcripción ligando-dependiente. La unión del AR a sus ligandos como la 5 α -dihidrotestosterona (DHT) o la testosterona contribuye al

desarrollo y la diferenciación sexual en el varón. El AR está expresado en todos los tejidos humanos, pero en próstata, testículos, huesos, riñón, laringe, células hematopoyéticas, folículos pilíferos o cerebro se encuentra sobreexpresado.

El AR está codificado por el gen *AR*. El gen *AR* está representado en una única copia, y está situado en la región pericentrométrica del brazo largo del cromosoma X (Xq11.12). La región codificante de *AR* está constituida por 8 exones (143). Al igual que otros miembros de la familia de receptores nucleares, el *AR* consta de tres dominios funcionales principales; i) el dominio N-terminal (NTD) (residuos 1-555), seguido del (ii) dominio de unión al ADN (DBD) (residuos 555-623), y (iii) el dominio de unión ligando C-terminal (LBD) (residuos 665-919), que a su vez está conectado al DBD por una región bisagra flexible (residuos 623-665) (144).

1.3.2. Polimorfismos genéticos en el gen *AR*

En el exón 1 del gen *AR*, en la región de transactivación, se individualizan tres regiones repetidas, de las cuales dos son polimórficas (145):

- Una región repetida *poly (Gln)*, formada por un número inestable de tripletes CAG, polimórfica y codificante para una secuencia poliglutamínica.
- Una región formada de ocho repeticiones CCG, no polimórfica, codificante para ocho prolina.
- Una región repetida *poly (Gly)*, formada por un número variable de tripletes GGT, polimórfica y codificante para una cadena de poliglicina.

La secuencia polimórfica de repetición de CAG presenta una variación numérica, variando entre las 10 a las 39 repeticiones en la población sana, y codifica tramos de polyglutamina del dominio de transactivación del *AR*. La longitud del número de repeticiones CAG varía según las diferentes etnias. El número de repeticiones CAG en la población americana blanca sana varía entre 8-30, entre 8-39 en la población europea, y entre 11-31 repeticiones en la población asiática (146). Queda por definir

un intervalo de normalidad absoluta sin el cual no se puede aplicar este polimorfismo en la práctica clínica.

Se ha descrito una correlación inversa entre la longitud de la secuencia poliglutamínica y la función del AR, una mayor extensión del CAG causa una disminución linear de la capacidad transactivante del receptor, al contrario, regiones más cortas de repeticiones CAG están asociadas a una mayor actividad del receptor (147).

1.3.2.1. Infertilidad masculina y el polimorfismo (CAG)_n del AR

Numerosos estudios en los últimos años han intentado establecer una relación entre el número de repeticiones CAG y la infertilidad masculina. Aunque los andrógenos y el gen *AR* contribuyen a una correcta diferenciación y desarrollo sexual así como a la espermatogénesis, los resultados sobre el efecto del polimorfismo del gen *AR* sobre la espermatogénesis son discordantes. En poblaciones australianas, norteamericanas y japoneses se ha informado de una relación entre infertilidad y el número de repeticiones CAG (148–150), pero por el contrario esta asociación no está tan clara en la población caucásica europea (151,152). Los resultados contradictorios en la literatura pueden derivar principalmente del escaso número de pacientes involucrados en los estudios, de las diferencias étnicas o de los criterios de inclusión en los diferentes estudios.

Debido a esta variabilidad étnica, se comentará a continuación los estudios llevados a cabo sobre población caucásica en la zona Mediterránea, adecuándose a su semejanza genotípica con la población de estudio de esta tesis. El estudio más amplio en la zona Mediterránea fue llevado a cabo en el 2004 por Ferlin y colaboradores (153), analizando a 163 hombres infértiles y 115 hombres fértiles normozoospermicos. El estudio no encontró diferencias significativas entre el número medio de repeticiones CAG entre ambos grupos. Del mismo modo, cuando subdividieron a los pacientes infértiles según su fenotipo seminal (45 pacientes con azoospermia, 87 pacientes con oligozoospermia severa y 31 pacientes con oligozoospermia moderada) siguieron sin encontrar diferencias significativas entre el número de repeticiones CAG y los diferentes grupos seminales. Por el contrario encontraron una diferencia significativa entre casos y controles cuando analizaron la

combinación del polimorfismo CAG y el GGC, poniendo de manifiesto que un efecto combinado entre el número de repeticiones de CAG y GGC tendría un efecto sobre la función del AR y particularmente sobre la espermatogénesis.

Sólo existe un único estudio que ha analizado la asociación entre el número de repeticiones CAG con la infertilidad en una población española. Se realizó en 2003 por Mengual y colaboradores, y analizaron a 102 pacientes azoospermicos y a 96 controles fértiles. La media de repeticiones CAG fue mayor en los pacientes azoospermicos (23.25 ± 2.7) respecto al grupo fértil (22.42 ± 2.8), con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p= 0.033$) (154).

1.3.2.2. Tumor testicular y el polimorfismo (CAG)_n del AR

También en relación al TTCG y por el mismo motivo que han estimulado los estudios en los otros componentes del SDT, se ha analizado la eventual correlación entre el TTCG y la longitud de la secuencia CAG. Dado que la insensibilidad a los andrógenos es un factor de riesgo para el TTCG, se ha postulado que un incremento de la señal androgénica durante el desarrollo fetal podría reducir el riesgo de TTCG (155). Como se ha comentado previamente, variaciones en la longitud de las repeticiones CAG del gen *AR* influyen en la capacidad transactivante del AR. Por lo que variaciones en la longitud de las repeticiones CAG pueden estar involucradas en el desarrollo del TTCG. Estudios epidemiológicos han corroborado esta hipótesis demostrando que los varones de origen africano tienen un menor número de repeticiones CAG y ésta población presenta una menor incidencia de TTCG en comparación con la raza caucásica que tiene un número medio de de tripletes mayor y un mayor riesgo de desarrollar este tipo de tumor.

El primer estudio que analizó la asociación entre TTCG y el número de repeticiones CAG en el gen *AR* no encontró diferencias significativas entre pacientes con TTCG y controles normozoospermicos fértiles sin TTCG ($p= 0.85$). Por lo que los autores concluyeron que el número de repeticiones CAG no estaba asociado con un mayor riesgo de desarrollo de TTCG (59).

Un posterior estudio sueco concluyó que no había asociación entre el número de repeticiones y el riesgo a desarrollar un TTCG, pero si correlacionaron el mayor número de repeticiones CAG con un mal pronóstico tumoral indicando un impacto de las gonadotrofinas o los esteroides sexuales en el desarrollo y capacidad metastásica del TTCG (58).

Otros estudios realizados en poblaciones nórdicas tampoco encontraron una asociación entre el polimorfismo (CAG)_n y el riesgo de TTCG, ni con el riesgo de metástasis tumoral (156,157).

Sólo dos estudios han estudiado la asociación entre en número de repeticiones de CAG y el riesgo de TTCG en una población sur-europea. El primer estudio se realizó en 2005, analizando a 123 pacientes italianos con TTCG y a 300 controles fértiles (normozoospermicos). No se encontraron diferencias significativas al comparar ambos grupos. Pero un hallazgo importante de este estudio fue cuando analizaron la combinación del polimorfismo CAG y el GGC, descubriendo que el haplotipo más frecuentemente asociado al TTCG fue el CAG=20/GGC=17, presentando un mayor riesgo de desarrollar un TTCG respecto al grupo control en aquellas personas que presentaban dicho haplotipo (OR= 4.7, 95%CI: 1.04–20.9) (57). El segundo estudio también basado en una población italiana se realizó diez años más tarde. Este estudio evidenció dos aspectos particularmente significativos: i) un número de CAG mayor de 25 puede ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de un TTCG debido a su mayor frecuencia en pacientes (26.2%) respecto a los controles (18.6%) ($p=0.027$); ii) los varones con un número de repeticiones CAG inferiores a 21 y superiores a 24 presentaban un riesgo de desarrollar un proceso tumoral en el testículo del 50% y del 76%, respectivamente, respecto a aquellos con un numero de repeticiones comprendido entre 21 y 24 (158).

Los estudios existentes en la actualidad, como se ha detallado, no arrojan una claridad sobre la posible relación entre el número de repeticiones CAG y el riesgo a desarrollar un TTCG. Del mismo modo, estos datos contradictorios son incluso presentes en dos metanálisis diferentes que valoraron la relación entre el número de CAG y el riesgo de TTCG (159,160).

1.4. DISTANCIA ANOGENITAL

La distancia anogenital (DAG) es el espacio comprendido entre el ano y los genitales externos. La largueza de la DAG en hombres es aproximadamente el doble respecto a las mujeres en el momento del nacimiento y esta diferencia de longitud se mantiene en la edad adulta (161,162), debido a un complejo muscular presente en el sexo masculino. En estudios animales la DAG es utilizada como un biomarcador de la acción de los andrógenos durante el embarazo (163).

En roedores, el crecimiento perineal es dependiente de los andrógenos, siendo un momento crítico en su desarrollo el *Masculinization programming window* (MPW). Como ya se comentó en el apartado del SDT, el MPW es un momento importante para el desarrollo del tracto genital masculino y los fenómenos de masculinización. El MPW está altamente regulado a través de las hormonas sexuales, por lo que un efecto antiandrógeno o estrogénico puede provocar un desequilibrio hormonal y por consiguiente, una reducción de la DAG (125). Una DAG más corta se considera un marcador de acción androgénica interrumpida. Se ha sugerido que la DAG se masculiniza durante el MPW, cuando una activación del AR a través de los esteroides sexuales estimulan el crecimiento de los músculos perineales tales como el músculo elevador del ano o el bulbocavernoso. En el sexo masculino, la activación del AR en estas células musculares provoca un mayor crecimiento del complejo muscular perineal y por lo tanto esto influye directamente sobre la DAG (164).

Se ha postulado que modificaciones sutiles en los niveles de andrógenos fetales, como por ejemplo, la exposición a antiandrógenos, pueden afectar en la DAG. Esta teoría ha sido respaldada mediante estudios de toxicidad en roedores donde una DAG más corta se ha correlacionado con un complejo muscular perineal más delgado (165). De todas formas son necesarios más estudios para entender completamente como una disrupción endocrina fetal influye en la DAG.

En consecuencia a estas afirmaciones, la DAG se ha utilizado para estudiar los efectos de la exposición prenatal a una variedad de productos químicos con una potencial actividad disruptora endocrina. Varios estudios epidemiológicos han demostrado una DAG reducida en asociación a una

exposición a flatatos (166–169), dioxinas (170), bisfenol A (171,172) e incluso en una dieta rica en grasas (173).

1.4.1. Métodos de medida.

Los investigadores han utilizado diferentes puntos de referencia para medir la DAG en humanos. En el varón, la DAG puede ser medida desde el ano hasta la unión perineo-escrotal, la denominada distancia anoscrotal (DAGas) o desde el ano hasta la base posterior o anterior del pene, la denominada distancia anopeneana (DAGap). La DAG puede ser medida en dos formas diferentes, una de ellas es en posición litotómica, con el varón acostado boca arriba con los muslos formando un ángulo de 45 grados con la camilla o al mismo nivel con las caderas y el perineo posicionado en el borde de la camilla (174), otra posible forma de medir la DAG es con el varón en posición supina, con las piernas en abducción máxima permitiendo que las plantas de los pies se encuentre y toquen, manteniendo las plantas de los pies a unos 30/45 cm de las nalgas (175). Figura 4. Ambos métodos de medición (litotomía o posición con las piernas flexionadas) son adecuados para evaluar y medir la DAG en hombres adultos (176). La DAG más comúnmente utilizada es la DAGas, debido a que es más confiable y no se ve afectada por el índice de masa corporal (IMC)/adiposidad o la edad (177) y además presenta una menor variabilidad entre observadores (173,178). Queda aún pendiente de entender el significado biológico de las diferentes distancias y de consecuencia, si existen diferencias entre las diferentes mediciones. Aunque la DAG se ha utilizado ampliamente como un biomarcador de una posible alteración endocrina intrauterina, sus limitaciones incluyen una falta de estandarización en la metodología de medición y una falta de información para su reproducibilidad, así como una insuficiente información sobre las posibles diferencias étnicas de la misma (178).

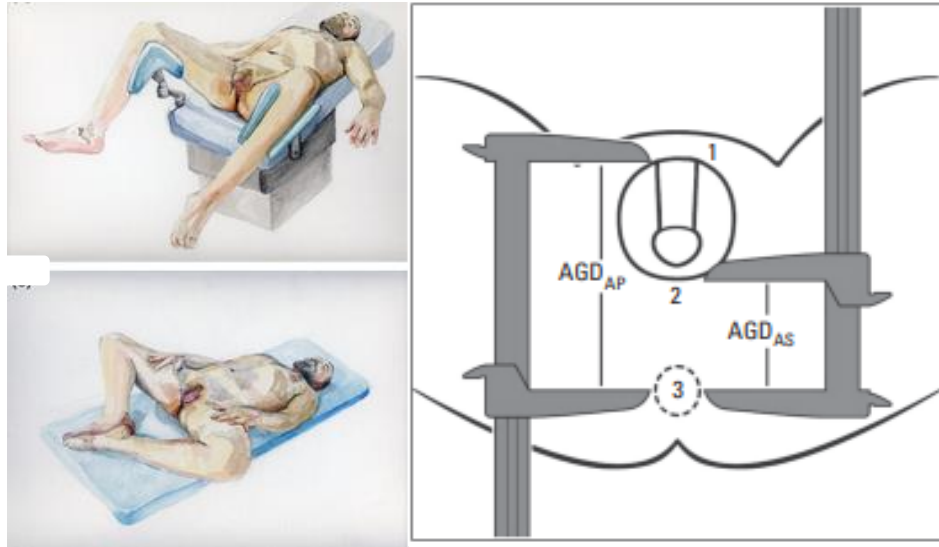


Figura 4. Medición de distancias anogenitales en el varón. (176)

1.4.2. Relación entre Distancia anogenital y malformaciones genitales

Estudios en humanos han relacionado una DAG más corta con un mayor riesgo de presentar criptorquidia (179–182). Un estudio poblacional transversal informó que los niños con criptorquidia presentaban un índice anogenital (DAGas/peso al nacer) más corto debido a una mayor exposición a disruptores endocrinológicos (169).

El estudio con la cohorte más grande en Europa se realizó en Cambridge (Inglaterra) (179), donde analizaron a 71 niños menores de dos años con criptorquidia y a 487 niños menores de dos años totalmente sanos. El estudio mostró, al igual que los estudios anteriores (180–182), que los niños con criptorquidia presentaban una DAGas inferior respecto a los niños sanos (29.09 ± 6.78 vs 29.75 ± 6.97 , respectivamente), encontrando una diferencia significativa al analizar las puntuaciones medias de las desviaciones estándar específicas por edad entre ambos grupos respecto a la longitud de la DAGas ($p < 0.001$). No encontraron diferencias en la DAGas cuando compararon entre criptorquidia bilateral o unilateral. Un reciente meta-análisis confirmó que los pacientes con criptorquidia presentan una DAG más corta respecto a aquellos varones que presentan un correcto descenso testicular (SMD: -0.69 ; 95%CI: -1.36 a -0.02) (183).

Al igual que en la criptorquidia, diferentes estudios han analizado la posible relación entre la DAG y la presencia de hipospadias(179,180,184–186).

Análogamente a la criptorquidia, todos los estudios concuerdan sobre la asociación entre la DAG corta y el hipospadia, así como su relación con la gravedad de la malformación.

1.4.3. Distancia anogenital y disfunción testicular

Se ha individualizado una correlación positiva entre la DAG y la espermatogénesis, y de consecuencia se ha determinado que una progresiva reducción de la DAG está relacionada con un aumento en las alteraciones de los parámetros seminales. En 2011, Eisenberg *et al.* estudiaron, por primera vez, la asociación entre DAG e infertilidad (175). Para ello, midieron, solamente, la DAGas, encontrando una diferencia significativa entre pacientes infértiles y controles fértiles (31.8 ± 11.3 vs 44.6 ± 14.1 , $p < 0.01$, respectivamente). Un dato importante que evidenció este estudio fue que por cada un centímetro de incremento en la DAGas se correspondía con un incremento de 4.3 millones de espermatozoides por mililitro (95%CI: 0.53-8.09, $p = 0.03$) y con un incremento en el número total de espermatozoides móviles de 6 millones (95%CI: 1.34-10.58, $p = 0.01$).

Mendiola y colaboradores (174) pusieron de manifiesto una posible variabilidad inter-examinador durante la medición de las DAG, siendo las diferencias (según las medias absolutas) entre examinadores de 1.39 mm para la medición de las DAGas y de 2.62 mm para la DAGap. Ellos determinaron que ni el volumen testicular ni el origen étnico estaban relacionados con la DAG, pero si el IMC, influyendo en la variabilidad de la DAGap, mientras que su influencia en la DAGas era mínima. Cuando examinaron la correlación entre la DAG y la concentración espermática relataron que sólo la DAGas presentaba significancia estadística, presentando un mayor riesgo de subfertilidad (OR= 7.3, 95%CI: 2.5–21.6) cuando se tenía una DAGas por debajo de la mediana (51.7 mm) con respecto a tener una DAGas por encima de la mediana. Por el contrario no encontraron ningún tipo de correlación entre la concentración espermática y la DAGap.

Un importante estudio realizado en 2012 (187) determinó la importancia de la DAG para distinguir entre azoospermia obstructiva y azoospermia no obstructiva. Se demostró que los varones que presentaban una azoospermia no obstructiva tenían una DAGas más corta en comparación con los

varones que presentaban azoospermia obstructiva (36.3 vs 41.9 mm, $p=0.01$), proponiendo la DAGas como un biomarcador del correcto desarrollo de la espermatogénesis.

Existen dos estudios realizados en España que analizan la relación entre la DAG y los parámetros seminales. Uno de ellos analizó a 91 pacientes infértiles que vivían en la región de Murcia y donde mediante un análisis multivariante determinaron la presencia de una asociación positiva y significativa entre la DAGas y la concentración de espermatozoides ($\beta=0.071$; 95%CI: 0.011-0.131), el número total de espermatozoides ($\beta=0.109$; 95%CI: 0.001-0.217) y el número total de espermatozoides móviles ($\beta=0.861$; 95%CI: 0.001-0.171), por el contrario la DAGap no se encontró asociada con ningún parámetro seminal. También calcularon el cambio esperado en la concentración espermática asociado a un aumento del intercuartil en la DAGas, determinando que por cada aumento en el intercuartil de la DAGas se asocia un aumento en la concentración espermática de un 37.6% (188). El otro estudio español también realizado en la región de Murcia pero sobre una población general (estudiantes universitarios) contradice el anterior estudio, ya que no mostraron ningún tipo de relación entre ambas DAG y los parámetros seminales o con los valores de las hormonas reproductivas (189).

Recientemente se han publicado un estudios con una gran cohorte de pacientes (190). Se analizó a un total de 1106 jóvenes daneses, reportando una asociación positiva entre la DAGas y los parámetros seminales, por lo que los hombres con una DAGas más corta (< percentil 10) tenían casi el doble de riesgo de presentar oligozoospermia en comparación con aquellos hombres con una DAGas por encima de la mediana (OR= 1.905; 95%CI: 1.137-3.19). Por el contrario, la DAGap no se asoció con los parámetros seminales.

Existe una correlación lineal entre DAG y los niveles de las hormonas reproductivas en el varón adulto. Un estudio realizado en una clínica andrológica de Houston determinó las correlaciones entre las medidas de los genitales y los niveles hormonales, mostrando que la DAAs ($r=0.2$, $p=0.03$) y la longitud del pene ($r=0.2$, $p=0.03$) presentan un correlación con los niveles séricos de testosterona,

mientras que no se encontró dicha correlación con el volumen testicular ($r= 0.17, p= 0.07$)(191).

1.4.4. Distancia anogenital y cáncer

La relación entre el cáncer de próstata y la DAG fue estudiada a raíz de la hipótesis que sugiere que una alterada exposición hormonal durante el desarrollo fetal puede afectar a un correcto desarrollo y una normal actividad prostática. La próstata necesita de una correcta concentración de andrógenos y estrógenos para su correcto desarrollo y una alteración de los niveles hormonales puede contribuir a una mayor probabilidad de desarrollar un carcinoma prostático (192).

Castaño-Vnyals y colaboradores (193) realizaron una comparación de la DAG, tanto DAGas como DAGap, entre pacientes a los que se les había diagnosticado un carcinoma prostático y aquellos que presentaban una diagnosis de hiperplasia prostática benigna. Ambas distancias fueron más cortas en el grupo con cáncer respecto al grupo sin cáncer (DAGap: 119.4 vs 124.9; DAGas: 34.8 vs 35.6, respectivamente), pero sólo se encontró significancia estadística en la DAGap y no en la DAGas ($p= 0.03$ y $p= 0.71$, respectivamente). Otro estudio, recientemente publicado, realizado sobre una población turca (194) mostró datos totalmente contradictorios al estudio español, evidenciando que los pacientes con carcinoma prostático presentaban una DAGap más larga que aquellos pacientes sin carcinoma, resultando esta diferencia estadísticamente significativa (139 ± 13.1 vs 125.8 ± 17.3 , $p < 0.001$, respectivamente). Debido a los datos tan contradictorios se necesitan de más estudios para verificar estos datos.

Actualmente no hay disponible en literatura ningún estudio que correlacione la DAG con el riesgo de desarrollar un TTCG, siendo este el único componente del SDT que no se ha sido relacionado con la DAG.

1.4.5. Variaciones genéticas y distancia anogenital.

Eisenberg evaluó el polimorfismo CAG en un total de 195 varones y su posible relación con la DAG. No se demostró una relación lineal entre la DAG y el número de repeticiones CAG, pero después de realizar un modelo estratificado según el número de repeticiones CAG se determinó que aquellos

sujetos con un número de repeticiones CAG mayor de 26 presentaban una DAG más corta respecto a los varones con un número de repeticiones CAG menor de 26 (32.4 vs 41.9 mm, $p= 0.01$, respectivamente). Del mismo modo cuando la estratificación se realizó según la DAG, se encontró que los pacientes con una DAG menor que la mediana (40mm), presentaban un número mayor de repeticiones CAG en comparación con los pacientes con una DAG mayor a la mediana (22.3 vs 21.1 mm; $p= 0.02$) (195).

2. HIPÓTESIS

El TTCG es la neoplasia más frecuente entre los hombres en edad reproductiva. El tumor testicular es considerado un enfermedad multifactorial, donde tanto factores (epi)genéticos como ambientales contribuyen en su etiología.

Diferentes anomalías genéticas relacionadas con la infertilidad han sido estudiadas como posibles factores predisponentes al desarrollo del TTCG. El cromosoma Y tiene un papel fundamental para un correcto desarrollo testicular. En el cromosoma Y residen las regiones AZF que participan en la espermatogénesis, por este motivo ha sido uno de los principales cromosomas candidatos en relacionarlo con una mayor predisposición al TTCG. Diferentes estudios han analizado una posible relación entre las deleciones completas de la región AZF del cromosoma Y y el riesgo de TTCG, pero sin encontrar una asociación.

Entre las deleciones parciales de las regiones AZF, la región AZFc es aquella con un mayor interés clínico, debido a que su estructura predispone a varios reordenamientos parciales (deleciones/duplicaciones). Entre los reordenamientos de la región AZFc, la deleción *gr/gr* es la que presenta una mayor aplicabilidad clínica, dado que la deleción de esta microrregión representa un factor de riesgo significativo en el deterioro de la espermatogénesis. La deleción de la región *gr/gr* y su relación con el TTCG está aún en debate, debido a los resultados contradictorios de los estudios previos. Cabe destacar que a excepción de un estudio, con un tamaño muestral limitado, donde se tenía información sobre los valores seminales tanto de los controles como de los pacientes con TTCG, los otros estudios carecían de información sobre estos valores.

La ausencia de una caracterización completa de los reordenamientos parciales de la región AZFc en los pacientes afectos de TTCG y la falta de información sobre el fenotipo seminal de los pacientes con TTCG portadores de la deleción *gr/gr*, han servido de estímulo para la realización de esta tesis doctoral. Esta tesis proporciona una caracterización integral de los reordenamientos parciales de la región AZFc en el TTCG, así como de disponer de información adicional para

poder determinar si el efecto de la delección *gr/gr* representa un vínculo genético común entre el TTCG y una alterada espermatogénesis.

Por otra parte, los factores ambientales en combinación a factores genéticos pueden provocar una disfunción de las células de Sertoli y las células de Leydig fetales, mediante un desequilibrio hormonal. Principalmente la actividad antiandrógena de los disruptores ambientales son los responsables de un desarrollo anormal del sistema genitourinario en el varón y, por lo tanto, han sido propuestos como factores cruciales en la etiopatogenesis del SDT.

La DAG es un parámetro antropométrico, considerado como un biomarcador de la acción androgénica fetal. La feminización (acortamiento) de la DAG se ha considerado como parte del SDT y en consecuencia se ha relacionado el acortamiento de la DAG con los diferentes componentes del SDT. No existen estudios disponibles en literatura que hayan analizado un posible vínculo entre el TTCG y la DAG.

Como se ha comentado anteriormente, la hipótesis más probable es que los factores ambientales actúan a través de unos antecedentes genéticos de cada individuo. Por lo que diferentes polimorfismos genéticos pueden aumentar la susceptibilidad individual a los factores ambientales. El polimorfismo (CAG)_n de *AR* ha sido estudiado como un factor genético que interacciona con los factores ambientales en el desarrollo del SDT. Existe una relación inversa entre la longitud de las repeticiones CAG y la eficiencia de la transactivación del *AR*. Los estudios sobre el papel del polimorfismo CAG en el desarrollo de los componentes del SDT y en relación con la DAG son escasos e inconcluyentes.

Por todo lo expuesto, este trabajo doctoral se basa en los objetivos que a continuación se exponen.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

El objetivo principal de la presente tesis es proporcionar el conocimiento de nuevos factores de riesgo para el tumor testicular, para poder ofrecer un *follow-up* más estrecho en aquellos pacientes con una mayor predisposición a desarrollar un TTCG y poder así realizar un diagnóstico precoz del tumor. Dicho propósito general puede desglosarse en los siguientes objetivos específicos.

Objetivos secundarios

1. Proporcionar una caracterización integral de los reordenamientos parciales de la región AZFc en pacientes con TTCG y controles sin TTCG en dos poblaciones del sur de Europa (España/Italia).
2. Evaluar el papel de los reordenamientos de la región AZFc (deleciones/duplicaciones parciales) en el TTCG.
 - 2.1 Dilucidar el papel de la deleción *gr/gr* como factor de riesgo genético para el TTCG en pacientes con una caracterización andrológica completa y en una población de estudio donde se conocen los parámetros seminales.
 - 2.2 Evaluar las variaciones en el dosaje del gen *DAZ* (como consecuencia de deleciones parciales de la región AZFc, o duplicaciones o duplicaciones aisladas del gen *DAZ*) en los pacientes con TTCG.
3. Evaluar la asociación entre la DAG (biomarcador de la acción androgénica durante la vida fetal) y el TTCG.

4. Evaluar el papel del polimorfismo CAG del gen *AR* en relación con la DAG y con el desarrollo del TTCG.

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4.1 Primer trabajo

Daniel Moreno-Mendoza, Elena Casamonti, Donatella Paoli, Chiara Chianese, Antoni Riera-Escamilla, Claudia Giachini, Maria Grazia Fino, Francesca Cioppi, Francesco Lotti, Serena Vinci, Angela Magini, Elisabet Ars, Josvany Sanchez-Curbelo, Eduard Ruiz-Castane, Andrea Lenzi, Francesco Lombardo, Csilla Krausz. “*gr/gr* deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study”. *Eur J Hum Genet.* 2019 Oct;27(10):1578-1588. PMID: 31053779

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. *gr/gr* deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. *gr/gr* deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. *gr/gr* deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Paoli D, Chianese C, Riera-Escamilla A, Giachini C, Fino MG, Cioppi F, Lotti F, Vinci S, Magini A. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *European Journal of Human Genetics*. 2019;3:1. doi: 10.1038/s41431-019-0420-7.

4.2 Segundo trabajo

Daniel Moreno-Mendoza, Elenea Casamonti, Aantoni Riera-Escamilla, Sara Pietroforte, Giovanni Corona, Eduardo Ruiz-Castañe, Csilla Krausz. “Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development”. *Andrology*, 2020 Jul 19.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

Moreno-Mendoza D, Casamonti E, Riera-Escamilla A, et al. Short anogenital distance is associated with testicular germ cell tumour development. *Andrology*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12863>.

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

Se realizó un análisis de los reordenamientos parciales de la región AZF en 497 pacientes con TTCG y 2030 controles de dos poblaciones mediterráneas (italiana y española). En esta cohorte se estudio la frecuencia de las: i) deleciones completas de la región AZFc, ii) deleciones parciales de la región AZFc, iii) duplicaciones parciales de la región AZFc y iv) alteraciones de la dosis del gen *DAZ*, además se proporcionó una caracterización molecular y fenotípica de los portadores de estos reordenamientos cromosómicos.

Un 3.8% de los pacientes con TTCG presentaba algún tipo de deleción parcial de la región AZFc respecto al 2.5% del grupo control ($p=0.078$). La deleción parcial más frecuente fue la deleción *gr/gr* (2.8% en pacientes con TTCG y 2.0% en controles), mientras que los otros tipos de deleciones parciales de la región AZFc (*b2/b3*, *b1/b3*, y deleciones atípicas) resultaron ser muy raras (1.0% en pacientes con TTCG y 0.5% en controles). Al realizar las comparaciones según el fenotipo seminal, el mayor riesgo de TTCG se observó en pacientes normozoospermicos portadores de deleciones parciales de la región AZFc (TTCG normozoospermicos *versus* controles normozoospermicos; OR= 4.1, 95%CI: 1.8–9.3, $p=0.001$). Las duplicaciones parciales de la región AZFc se observaron en un 4.6% de los pacientes con TTCG y en un 3.7% del grupo control ($p=0.232$). El análisis de la dosis génica del *DAZ*, mostró que las alteraciones en la dosis del gen *DAZ* confieren un mayor riesgo de TTCG (OR = 1.8, 95%CI: 1.2–2.7; $p=0.004$).

Para valorar la asociación entre la DAG y el TTCG se analizaron 156 pacientes con TTCG y 110 controles normozoospermicos sin TTCG, a los que se les midió la DAGap y la DAGas, además, se les realizó un análisis molecular para determinar el número de repeticiones CAG en el exón 1 del gen *AR*.

Se observó una DAGas y DAGap significativamente más corta entre los pacientes con TTCG respecto al grupo control ($p<0.001$ en ambas mediciones) independientemente del

conteo de espermatozoides y la histología testicular. Se obtuvieron unos valores de corte, sólo aplicables a nuestra cohorte, con una buena especificidad y sensibilidad para las DAGs. Los individuos con DAGap < 130 mm y una DAGas < 53 mm (valores de corte) mostraron un mayor riesgo de desarrollar un TTCG (OR= 4.97, 95IC%: 2.01-12.33, $p=0.001$ y OR= 4.11, 95%IC: 1.89-8.92, $p <0.001$, respectivamente).

La longitud del pene fue similar entre ambos grupos, sin encontrar diferencias significativas.

No se observó una correlación significativa entre el número de repeticiones de CAG y ninguna de las dos DAG (DAGap y DAGas) ($r= 0.068$, $p= 0.283$ y $r= 0.022$, $p= 0.724$, respectivamente). La mediana del número de CAG no fue diferente entre los casos y controles ($p= 0.063$).

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

El TTCG es la neoplasia más frecuente en varones de edad reproductiva (2). Presenta una incidencia variable dependiendo de factores como la distribución geográfica, la etnia o la familiaridad. Tanto los factores (micro)ambientales como los (epi)genéticos tienen una importante relevancia en su etiología (15). Los TTCG derivan de una lesión precursora preinvasiva denominada neoplasia de células germinales in situ. Estudios epidemiológicos apoyan la hipótesis de que el TTCG tiene un origen fetal y su desarrollo se debe a un fracaso durante la diferenciación de las células germinales primordiales a gonocito, tal diferenciación tiene lugar durante las primeras fases del desarrollo fetal (7). El proceso de diferenciación de las células germinales primordiales a gonocitos está regulado a través de varios genes específicos, algunos de ellos ligados al cromosoma Y. Una alteración en la diferenciación de las células germinales a nivel fetal podría ser la base tanto para el desarrollo del tumor testicular como para una alterada espermatogénesis.

En relación al estudio de los factores genéticos relacionados con la infertilidad y que son posibles candidatos a la predisposición del TTCG, es de gran importancia, la región AZFc, localizada en el brazo largo del cromosoma Y. En esta región AZFc hay localizados genes que están involucrados en la regulación de la espermatogénesis, del mismo modo, algunos genes de la región AZFc se encuentran expresados específicamente en las células germinales masculinas. La causa de origen genético más frecuente, y de la que se tenga un mayor conocimiento en la actualidad, de oligo/azoospermia son las microdeleciones de la región AZF (delección de la región AZFa, AZFb y AZFc) (87). Pero la relación entre estas microdeleciones y el desarrollo del TTCG ha sido descartado en previos estudios (105–107,110). Por el contrario, el papel de la delección *gr/gr* (que consiste en la delección de parte de la región AZFc) en el desarrollo del TTCG sigue estando en debate y existe actualmente resultados contradictorios respecto a su asociación (110–112). Un gran estudio multiétnico realizado por Nathanson y colaboradores (111) analizó la delección *gr/gr* en 1842 pacientes con TTCG y 2599 controles sanos. Los portadores de la delección *gr/gr* eran más numerosos en el grupo de los pacientes con TTCG respecto al grupo

control, resultando tal diferencia estadísticamente significativa (OR= 2.1, 95%CI: 1.3-3.6, $p=0.005$), siendo aún más fuerte esta asociación en el subgrupo de pacientes afectados de Sm respecto aquellos afectados por el histotipo Nsm. En un estudio posterior (112), se evaluó a 263 pacientes con TTCG (197 con antecedentes de TTCG en familia y 96 casos esporádicos), los autores no pudieron demostrar una asociación significativa para la delección *gr/gr* ni para otras raras deleciones parciales de la región AZFc entre ambos grupos. En estos dos estudios, comentados anteriormente, no se disponía de información sobre la fertilidad de los pacientes ni sobre los valores de los parámetros seminales de los individuos. El único estudio que presentaba información sobre los valores del seminograma se basó en una pequeña cohorte italiana ($n=118$) (110). Este estudio no encontró diferencias significativas respecto a los portadores de la delección *gr/gr* entre el grupo de pacientes con TTCG y el grupo control. Por lo tanto, queda por establecer si la asociación entre la delección *gr/gr* y el TTCG es restringida a un específico subgrupo seminal (sujetos con una baja concentración de espermatozoides).

Esta tesis ha sido diseñada para evaluar el papel de las deleciones/duplicaciones parciales de la región AZFc y específicamente en la variación de la dosis del gen *DAZ* en el TTCG, realizándose en la mayor población de estudio europea disponible hasta la fecha.

El primer objetivo era el de dilucidar el papel de la delección *gr/gr* como factor de riesgo génico para el TTCG en dos poblaciones mediterráneas con una caracterización andrológica completa y un perfecto conocimiento de los parámetros seminales de los pacientes. Cuando se ponen de manifiesto factores de riesgo relacionados con el cromosoma Y siempre se tiene que tener en cuenta el origen étnico y geográfico para evitar el sesgo de estratificación poblacional (196). Un potencial bias en el estudio multicéntrico de Nathanson *et al.* (111) era la falta de *matching* étnico entre casos y controles. En consecuencia de ello, se ha tenido mucha atención con el origen étnico y geográfico de los sujetos de la cohorte de estudio de esta tesis.

Otra limitación de los estudios anteriores era la carencia de información sobre el fenotipo seminal de los pacientes. Los parámetros seminales tanto del grupo control como del grupo de pacientes afectados de TTCG en esta tesis eran conocidos, permitiendo evaluar el papel de la delección *gr/gr* no sólo en relación al TTCG sino en combinación con la espermatogénesis.

Se ha encontrado una frecuencia similar de portadores de la delección *gr/gr* entre el grupo de pacientes con TTCG (2.8%) y el grupo control (2.0%). Este hallazgo se debe a la relativamente alta frecuencia de la delección *gr/gr* en pacientes con oligo/azoospermia idiopática (3.1%). De hecho en estudios anteriores se ha demostrado que la delección *gr/gr* es significativamente asociada a la oligozoospermia en pacientes españoles e italianos (85,103,104). Cuando las comparaciones se realizan entre el TTCG y los controles normozoospermicos se encontró un riesgo significativo (OR: 3.1, 95%CI: 1.4–7.0, $p=0.006$). Sorprendentemente, el hallazgo más importante está relacionado con el grupo de pacientes Nz, donde en el grupo de pacientes con TTCG fue de 9/268 (3.4%) mientras los portadores de la delección *gr/gr* en el grupo control fue de 10/1068 (0.9%).

Estos datos sugieren que la delección *gr/gr* confiere un riesgo significativo de desarrollar un TTCG independientemente del cuadro seminal, presentando la entidad de riesgo más alto en sujetos con TTCG normozoospermicos (OR: 3.7, 95CI: 1.5-9.1, $p= 0.006$).

Un potencial factor de modulación asociado al fenotipo seminal en la delección *gr/gr* se corresponde al tipo de gen delecionado en esta microregión genética (85). Se han examinado como posibles predictores de patogenicidad las copias *DAZ* y *CDY1* que se encuentran localizadas dentro de la región AZFc. La pérdida de *DAZ1/DAZ2* y *CDY1A* se han propuesto como más perjudiciales que la delección de *DAZ3/DAZ4* y *CDY1B* (197–199). Sin embargo esta afirmación no fue ratificada en un posterior estudio multicéntrico (200). Con respecto a las copias del gen *DAZ*, los diferentes miembros de la familia de genes *DAZ* tienen un número diferente de motivo de reconocimiento de ARN (RRM) y repeticiones *DAZ*, lo que puede

conferirle una actividad funcional diferente a las cuatro copias de *DAZ* (200). Por este motivo, se analizó la delección de los diferentes “haplotipos” (basándose en las diferentes combinaciones de copias de *DAZ* y *CDY1*) en los pacientes con TTCG con y sin una alteración de la espermatogénesis y entre las diferentes histologías tumorales. Además, se cuestionó si la delección de los diferentes haplotipos en los pacientes con TTCG eran diferentes a los controles y especialmente en relación con el tipo de copias *DAZ* Y *CDY1* eliminadas. Once pacientes con TTCG (78.6%) presentaron una delección de *CDY1A*, siendo esta delección la más frecuente en cualquier subgrupo (según sea el fenotipo seminal o el tipo histológico tumoral). Igualmente se encontró que la delección *CDY1A* era la más frecuente en el grupo control de pacientes sanos (77.8%). Con respecto a los diferentes tipos de deleciones en función del tipo de copias del gen *DAZ*, no hubo ningún tipo de delección predominante en el grupo de pacientes con TTCG, de igual forma no se encontró ningún tipo de delección predominante basándonos en el fenotipo seminal o el tipo histológico tumoral, lo mismo ocurrió en el grupo control de pacientes sanos. Estos datos indican que en los portadores de la delección *gr/gr* el tipo de copias delecionadas de los genes *CDY1* o *DAZ* es irrelevante desde el punto de vista de la producción espermática o el tipo histológico. Del mismo modo, el tipo de “haplotipo” delecionado, que es definido por el tipo de copia *DAZ* o *CDY*, no fue diferente entre el grupo de pacientes afectados de TTCG y el grupo de individuos sin TTCG.

Además de las deleciones *gr/gr* se identificaron otros tres tipos de deleciones en la cohorte de pacientes afectados de TTCG (*b2/b3*, *b1/b3* y deleciones atípicas). La frecuencia de estas deleciones fue extremadamente rara tanto en el grupo de pacientes con TTCG como en el grupo de sujetos sin TTCG (0.6% vs. 0.4%, 0.2% vs 0.0%, 0.2% vs. 0.2%, respectivamente), por lo que aún queda por establecer su papel en el desarrollo del TTCG, si es que tienen algún tipo de implicación.

Aunque los estudios de asociación casos/controles precedentes no pudieron llegar a una conclusión unívoca de la hipotética dosis génica “óptima” de AZFc necesaria para una espermatogénesis normal (99,103,104,200), se hipotiza que la dosis génica “óptima” es la dosis que se encuentra en más del 90% de los hombres de la población general (constituida por cuatro copias de *DAZ* y dos copias de *CDY1*) (201). Las duplicaciones parciales en la región AZFc comportan un aumento en el número de copias del gen *DAZ* o *CDY1* (más de 4 copias para *DAZ* y más de 2 copias para *CDY1*, respectivamente). Por lo tanto, la hipótesis de trabajo fue un posible efecto predisponente al desarrollo del TTCG según las variaciones de dosis génica (no sólo en el déficit sino también considerando un exceso). La frecuencia de duplicaciones parciales de la región AZFc fue de un 4.6% de los pacientes con TTCG, mientras que la frecuencia en el grupo control fue de un 3.7%. Por lo tanto, al contrario que en la delección *gr/gr*, no se pudo detectar un vínculo estadísticamente significativo entre las duplicaciones parciales de la región AZFc y el riesgo de desarrollar un TTCG.

Evaluando por separado la dosis génica del gen *DAZ* (delecciones parciales, duplicaciones de la región AZFc o duplicaciones aisladas del gen *DAZ*), se encontró que los pacientes con TTCG presentan una mayor frecuencia de alteraciones de la dosis génica del gen *DAZ* (un número diferente de 4 copias del gen) respecto al grupo control (10.3% vs. 7.8%). Esta diferencia resulta significativa si se comparaba todo el grupo de pacientes con TTCG *versus* el grupo de sujetos control Nz (10.3% vs. 6.0%, $p = 0.004$). Estos datos indican que las alteraciones en la dosis del gen *DAZ* en pacientes Nz confiere un doble riesgo de desarrollar un TTCG (OR= 1.8, 95% CI; 1.2 – 2.7).

El vínculo biológico entre las variaciones de la dosis génica de la región AZFc (especialmente su reducción debido a las delecciones) y la tumorigénesis testicular sigue siendo desconocido. Una hipótesis podría ser que la dosis del gen *DAZ* pueda influir en la

diferenciación de los gonocitos. De hecho, se ha demostrado que el gen *DAZ* está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de los gonocitos fetales y en el núcleo de las espermatogonias (202). Por lo tanto, variaciones en la dosis del gen *DAZ* pueden desempeñar un papel importante en la etiología del TTCG. Otra posible explicación, es que la “fragilidad”, expresada a través de la presencia de deleciones/duplicaciones en el cromosoma Y, sea considerada como un marcador de una “inestabilidad genómica” general, provocando un potencial riesgo para un desarrollo tumoral, incluyendo al TTCG.

En relación a los factores ambientales vinculados en la etiopatogénesis del TTCG, se ha evidenciado que en los últimos cincuenta años se ha producido un incremento en la incidencia de cuatro diferentes condiciones patológicas tales como criptorquidia, hipospadias, TTCG y reducción de la calidad seminal. Del mismo modo se determinó que estas condiciones patológicas estaban interrelacionadas entre ellas, comportando un mayor riesgo de desarrollar alguna de las condiciones patológicas o de una tendencia en aumento y en paralelo, de las cuatro condiciones patológicas. Las evidencias de una etiopatogénesis común entre criptorquidia, hipospadias, TTCG y reducción de la calidad seminal impulsaron a la postulación en 2001 de un único síndrome denominado SDT (115).

La etiopatogénesis del SDT es debida a una alteración de la acción androgénica durante el periodo fetal, específicamente durante el periodo llamado *Masculinization programming window* (MPW). Durante este periodo, una alteración de la acción androgénica compromete el desarrollo y la función de las células de Leydig y las células de Sertoli. Este mal funcionamiento celular provocaría un desarrollo anormal del sistema reproductivo masculino, expresándose así las diferentes manifestaciones clínicas del SDT en el nacimiento o durante la infancia o durante la edad adulta (115). Estudios en humanos determinaron que la exposición a algunos disruptores endocrinológicos durante el desarrollo

fetal estaban relacionados con algunos componentes del SDT (especialmente aquellos que eran diagnosticados al nacimiento), incluso se ha demostrado altos niveles de algunos de estos compuestos químicos en individuos afectados por el SDT o en sus madres (126). Sin embargo, el vínculo directo entre la exposición a EDC durante el desarrollo fetal y el desarrollo de los componentes del SDT de aparición tardía (espermatogénesis alterada y TTCG) aún no están claros.

La DAG ha sido propuesta como un parámetro antropométrico capaz de reflejar una correcta acción androgénica durante el periodo crítico fetal del desarrollo testicular (203). La DAG es dos veces más larga en varones respecto a las mujeres, esta afirmación apoyaría que la DAG presenta una dependencia a los andrógenos durante su desarrollo (169,186). En roedores, la DAG es un marcador bien establecido y sensible a la exposición fetal de los disruptores endocrinos, asociándose a una DAG más corta a aquellos ratones con una mayor exposición a estos disruptores (125,204,205). Son pocos los estudios realizados en humanos, pero se ha informado de una asociación similar a la encontrada en los modelos animales, donde una exposición fetal a los disruptores se corresponde con una longitud menor en la DAG (161,166–171,173,178). Por estas razones la DAG corta ha sido reconocida como parte del SDT (116). Se ha demostrado una clara asociación entre la criptorquidia y el hipospadias con una longitud más corta de la DAG (183), mientras que hay resultados discordantes en relación con los valores seminales. El posible vínculo entre la DAG y el TTCG nunca ha sido abordado, hasta el momento.

El segundo objetivo de esta tesis doctoral era proporcionar nuevos conocimientos sobre el TTCG dentro del contexto del SDT, para ello se valoró la existencia de una relación entre la DAG y el TTCG en varones adultos. Para tal propósito se midieron dos variantes de la DAG,

DAGas y DAGap, en 156 pacientes con TTCG y 110 controles sin TTCG, todos los sujetos del estudio proceden de un mismo origen étnico (españoles caucásicos).

Los resultados de esta tesis reportaron una asociación entre la DAG corta y el TTCG. Se identificaron valores medios significativamente más cortos de DAGap y de DAGas en los pacientes con TTCG respecto aquellos individuos sanos (DAGap en el grupo control fue de 140.9 mm vs 131.1 mm en el grupo de pacientes con TTCG, $p < 0.001$; DAGas en el grupo control fue de 55.5 mm vs 50.5 mm en el grupo de pacientes con TTCG, $p < 0.038$). Este fenómeno se observó independientemente de la histología tumoral, así como de la calidad seminal de los pacientes (valores seminales). De hecho, tanto en pacientes con TTCG Nz u oligo/azoospermicos presentaron DAG significativamente más bajas respecto a los controles sin TTCG Nz. Después de realizar un análisis ROC y mediante el cálculo del índice de Youden, se identificó unos valores de corte de las distancias anogenitales que proporciona una predicción del desarrollo del TTCG con la mejor especificidad y sensibilidad. En esta cohorte de estudio los valores de corte ideal para predecir un mayor riesgo para desarrollar un TTCG correspondieron a una DAGap inferior a 130 mm y una DAGas inferior a 53 mm. En esta población de estudio, los individuos por debajo de estos umbrales tienen 5 y 4 veces más riesgo de desarrollar un TTCG (DAGap: OR= 4.97, 95%CI: 2.01 - 12.33, $p = 0.001$ y DAGas: OR= 4.11, 95%CI: 1.89-8.92, $p < 0.001$). El riesgo de tumor testicular fue ligeramente mayor en pacientes normozoospermicos, alcanzando un riesgo de 4.7 veces mayor para una DAGap inferior a 130 mm y un aumento de 6 veces para una DAGas inferior a 53 mm. Estos OR relativamente altos podrían derivarse del hecho de que los controles son sujetos altamente seleccionados con ausencia total de cualquier componente del SDT. Sin embargo, el análisis de subcohortes muestra que incluso cuando los casos y los controles son comparables por edad, IMC y número total de espermatozoides, se mantiene significativamente menor la DAG en los pacientes respecto al grupo control.

Más del 50% de los pacientes con TTCG presentan valores por debajo del umbral de corte en la DAG, por lo que se supone que la disrupción androgénica durante el MPW puede ser un importante factor etiológico en una alta proporción de estos pacientes.

Curiosamente, una DAG corta no solo se observó en varones oligo/azoospermicos sino también en hombres con TTCG normozoospermicos. Por lo que se puede especular que diferentes EDC pueden actuar durante la vida fetal del paciente con TTCG con o sin alteración de la espermatogénesis. De hecho, se conoce mediante modelos animales que diferentes EDC no siempre conducen a los mismos componentes del SDT (206). Si bien los datos necesitan claramente una validación posterior en poblaciones de estudio independientes, se sugiere que la DAG, definida como un parámetro antropométrico para la acción androgénica durante el desarrollo testicular fetal, está significativamente relacionada con el TTCG.

Debido a que tenemos disponibles los parámetros seminales de los pacientes en estudio, se pudo evaluar no solo la asociación de la DAG y el TTCG, sino que también se analizó la relación entre la DAG y la espermatogénesis. Se reportó una asociación positiva entre ambas DAG y los parámetros seminales (número total de espermatozoides y el número total de espermatozoides móviles). Sin embargo solo se alcanzó la significación estadística para la DAGap ($p < 0.001$ en el caso del número total de espermatozoides móviles y una $p = 0.001$ para el número total de espermatozoides móviles), mientras que para la DAGas sólo se mostró una asociación cercana a la significación en relación con el número total de espermatozoides móviles ($p = 0.057$). En referencia a la DAGap, la mayoría de los estudios previos informaron de una asociación positiva respecto al número total de espermatozoides pero sin alcanzar una significancia estadística (174,189,190,207). Existen también datos respecto a la DAGas, en donde algunos estudios informaron de una asociación positiva, con

una significancia estadística, entre la DAGas y el número total de espermatozoides y con respecto al número total de espermatozoides móviles (174,190,208). Estos resultados tan controvertidos y discordantes, que existen actualmente en literatura, pueden derivarse del hecho de que los parámetros seminales pueden estar influenciados por varios factores, como son las alteraciones genéticas o factores ambientales/hormonales que actúan después de la vida fetal. Por lo tanto, no todos los casos de mala calidad seminal se deben a un SDT, ya que diferentes factores genéticos específicos o exposiciones ambientales en la edad adulta pueden afectar a una correcta espermatogénesis, confundiendo la asociación entre DAG y parámetros seminales (209).

En concordancia con un estudio chino (207), se identificó una correlación negativa entre la DAGap y los niveles de testosterona total. Debido a que los niveles de testosterona en suero se ven afectados negativamente por el IMC en nuestros datos ($r = -0.215$, $p = 0.001$) y en otros estudios (207,210,211), se realizó un análisis multivariado después de ajustarlo por el IMC. Análogamente, con el estudio de Zhou y colaboradores (207), se perdió la correlación entre la DAGap y los niveles de testosterona después del ajuste por el IMC ($\beta = -0.108$, $p = 0.060$). En lo que respecta a la DAGas, no se observó una correlación estadísticamente significativa entre la DAGas y los niveles de testosterona, confirmando lo observado en precedentes estudios realizados sobre población general (189,190,207).

Se conoce la capacidad de modulación que presenta el polimorfismo CAG del gen *AR* en la transactivación del receptor androgénico, por lo que varios estudios se han centrado en analizar la relación entre este polimorfismo y los diferentes componentes del SDT. El polimorfismo CAG representa un clásico ejemplo de como un factor genético puede modular el efecto de los factores ambientales. Por lo que el tercer objetivo de esta tesis doctoral consistió en analizar el papel del número de repeticiones (CAG)_n del receptor androgénico

(AR) en relación con la DAG y el TTCG. Los datos obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de los valores medios de repeticiones del (CAG)_n AR entre los pacientes con TTCG respecto a los controles sanos. Estos resultados se encuentran en la misma línea con los datos presentados en un reciente meta-análisis (160). Con respecto a la relación entre el número de repeticiones CAG y la longitud de la DAG tampoco se encontró ningún tipo de vínculo. En literatura, sólo existe un estudio que analizó la asociación entre el número de repeticiones CAG y las DAG. Los autores de este estudio no encontraron una relación lineal entre ambos parámetros pero observaron una mayor frecuencia de varones con una DAG más corta dentro del grupo de individuos con un número de repeticiones CAG mayor a 26 (195). Los datos de esta tesis no pueden confirmar dicha asociación, encontrándonos en discordancia con los datos proporcionados por Eisenberg y colaboradores (195).

La falta de un importante efecto del polimorfismo CAG del AR en relación al TTCG como a la DAG indica que es poco probable que la sensibilidad del AR sea el único factor involucrado en la etiopatogénesis de estas alteraciones. De hecho, es probable que existan otros factores genéticos involucrados en el correcto desarrollo genital fetal y que no estén mediados por la acción androgénica. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender mejor el papel del polimorfismo CAG del AR en el desarrollo de la DAG.

En conclusión, los datos de esta tesis proporcionan la evidencia de que la delección *gr/gr* es un factor de riesgo para el TTCG y que en caso de ser portador de la delección en normozoospermia el riesgo de desarrollar un TTCG es de casi cuatro veces mayor respecto a los no portadores de la delección. La asociación observada entre la delección *gr/gr* y el TTCG en pacientes Nz, sugiere que esta delección es un factor independiente de una espermatogénesis alterada. En línea con estas conclusiones, un reciente estudio

epidemiológico mostró un mayor riesgo de TTCG en familiares de primer grado con valores seminales normales (212). De igual forma, esta tesis evidencia por primera vez la asociación entre DAG y el TTCG. Se ha demostrado que una corta DAG confiere un riesgo significativo mayor de desarrollar un TTCG, que puede variar entre 4 y 5 veces más dependiendo de la DAG (DAGas y DAGap, respectivamente). Los datos apoyan la teoría del SDT e indican que el desequilibrio de las hormonas sexuales durante el desarrollo fetal juega un papel importante en el desarrollo del TTCG. Los datos también sugieren a la DAG como un nuevo y relevante biomarcador del TTCG.

La identificación de estos nuevos factores de riesgo tanto genéticos como antropométricos ligados a factores ambientales para el TTCG tiene una relevancia clínica, ya que aumenta el poder predictivo del riesgo junto a los factores clínicos ya conocidos como la infertilidad, microlitiasis testicular, atrofia testicular, criptorquidia, etc.... El *follow-up* estrecho de los pacientes con un alto riesgo de TTCG permite el diagnóstico precoz de la neoplasia en un estado inicial, con la consiguiente disminución de la dosis de quimioterapia, permitiendo una supervivencia del paciente sin efectos secundarios severos de la terapia citostática.

7. CONCLUSIONES

En la cohorte caucasica más amplia hasta ahora analizada en la literatura donde se ha analizado los reordenamientos de la región AZF del cromosoma Y y más detalladamente los reordenamientos parciales de la región AZFc se han observado las siguientes conclusiones:

1. Las deleciones completas AZF no representan un factor de riesgo para el TTCG, mientras que las deleciones parciales de la región AZFc confieren un riesgo significativo de TTCG (OR: 4.1, 95%CI: 1.8-9.3, $p=0.001$).
2. La deleción *gr/gr* confiere un riesgo de casi 4 veces mayor (OR: 3.7, 95%CI: 1.5-9.1, $p=0.006$) de desarrollar un TTCG. Siendo este riesgo independiente de los parámetros seminales.
3. No se ha encontrado asociación entre un mayor riesgo de desarrollar un TTCG y otras deleciones de la región AZFc (*b2/b3*, *b1/b3* o deleciones atípicas) o entre las duplicaciones parciales de la región AZFc.
4. El tipo de copias delecionadas de los genes *CDY1* o *DAZ* es irrelevante desde el punto de vista de la producción espermática o el tipo histológico tumoral. Alteraciones en la dosis génica del gen *DAZ* en pacientes Nz confiere un doble riesgo de desarrollar un TTCG.

Por la primera vez en la literatura se ha abordado el tema de la relacion entre DAG y TTCG, con el siguiente resultado:

5. Se ha evidenciado una asociación entre una corta DAG y un mayor riesgo de desarrollar un TTCG. Determinándose, para nuestra población de estudio, un valor de corte tanto en la DAGap y DAGas (<130 mm y < 53 mm, respectivamente) que confiere un riesgo significativamente mayor de desarrollar un TTCG (DAGap: OR:4.97, 95%IC: 2.01-12.33, $p=0.001$; DAGas: OR:4.11, 95%CI: 1.89-8.92, $p\leq 0.001$).

6. No se encontró diferencias entre el número de repeticiones del polimorfismo CAG del gen *AR* entre casos y controles. No se demostró ningún vínculo entre las DAG y el número de repeticiones CAG.

8. LÍNEAS DE FUTURO QUE SE DESPRENDEN DE LA
INVESTIGACIÓN

Esta tesis doctoral proporciona nuevos factores de riesgo para el Tumor Testicular de células germinales. Los pacientes portadores de la deleción *gr/gr* o con una distancia anogenital corta se verían beneficiados de un *follow-up* andrológico a largo plazo con el objetivo de realizar un diagnóstico precoz del tumor. Se plantea un estudio prospectivo con un seguimiento activo de los pacientes infértiles portadores de la deleción *gr/gr* y/o con una distancia anogenital corta, para determinar el eventual valor predictivo de estos nuevos factores de riesgo en el diagnóstico del tumor testicular.

Adicionalmente, estos dos factores de riesgo (deleción *gr/gr* y DAG corta) podrán convivirse junto con los SNPs actualmente validados y futuros relacionados con el TTCG y con otros factores de riesgo clínicos como la microlitiasis testicular, la hipospadias o la criptorquidia con el objetivo de crear una puntuación de riesgo (*risk score*) mejorado para el TTCG.

Un diagnóstico precoz basado en el *screening* de los citados factores de riesgo, permitiría limitar el número de ciclos y por consiguiente reducir las consecuencias sobre la salud general que generan los tratamientos citotóxicos a corto y a largo plazo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med*. 1997 Jul;337(4):242–53.
2. Park JS, Kim J, Elghiaty A, Ham WS. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Sep;97(37):e12390.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
4. Znaor A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Laversanne M, Kulis T, Gurney J, et al. Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010-2035: A rising burden despite population ageing. *Int J cancer*. 2019 Nov;Nov(26).
5. Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA, Moller H. Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. *Nat Clin Pract Urol*. 2006 Oct;3(10):532–43.
6. Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology*. 2015 Jan;3(1):4–12.
7. Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*. 2006;12(3):303–23.
8. Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: frequency and relationship to invasive germ cell tumours in infertile men. *Histopathology*. 1978 May;2(3):157–70.
9. Almstrup K, Høi-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansorge W, et al. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res*. 2004 Jul;64(14):4736–43.
10. Rajpert-De Meyts E, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Almstrup K. Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015;53(3):177–88.
11. Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, et al. Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug;91(15):1321–6.
12. van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH. Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Jul;86(14):1070–5.
13. Sonne SB, Høi-Hansen CE, Fisher JS, Leffers H, Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE. Do environmental factors play a role in the aetiology of carcinoma in situ testis and the testicular

- dysgenesis syndrome? *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2004;88:144–51.
14. Rajpert-De Meyts E, McGlynn KA, Okamoto K, Jewett MAS, Bokemeyer C. Testicular germ cell tumours. *Lancet (London, England).* 2016 Apr;387(10029):1762–74.
 15. Looijenga LHJ, Van Agthoven T, Biermann K. Development of malignant germ cells - the genenvironmental hypothesis. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2–4):241–53.
 16. Heimdal K, Olsson H, Tretli S, Flodgren P, Borresen AL, Fossa SD. Familial testicular cancer in Norway and southern Sweden. *Br J Cancer.* 1996 Apr;73(7):964–9.
 17. Westergaard T, Olsen JH, Frisch M, Kroman N, Nielsen JW, Melbye M. Cancer risk in fathers and brothers of testicular cancer patients in Denmark. A population-based study. *Int J cancer.* 1996 May;66(5):627–31.
 18. Dieckmann KP, Pichlmeier U. The prevalence of familial testicular cancer: an analysis of two patient populations and a review of the literature. *Cancer.* 1997 Nov;80(10):1954–60.
 19. Hemminki K, Czene K. Attributable risks of familial cancer from the Family-Cancer Database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Dec;11(12):1638–44.
 20. Hemminki K, Li X. Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. *Br J Cancer.* 2004 May;90(9):1765–70.
 21. Dong C, Lonnstedt I, Hemminki K. Familial testicular cancer and second primary cancers in testicular cancer patients by histological type. *Eur J Cancer.* 2001 Oct;37(15):1878–85.
 22. Heimdal K, Olsson H, Tretli S, Fossa SD, Borresen AL, Bishop DT. A segregation analysis of testicular cancer based on Norwegian and Swedish families. *Br J Cancer.* 1997;75(7):1084–7.
 23. Pyle LC, Nathanson KL. Genetic changes associated with testicular cancer susceptibility. *Semin Oncol.* 2016 Oct;43(5):575–81.
 24. Dong C, Hemminki K. Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *Int J cancer.* 2001 Apr;92(1):144–50.
 25. Swerdlow AJ, De Stavola BL, Swanwick MA, Maconochie NE. Risks of breast and testicular cancers in young adult twins in England and Wales: evidence on prenatal and genetic aetiology. *Lancet (London, England).* 1997 Dec;350(9093):1723–8.
 26. Del Risco Kollerud R, Ruud E, Haugnes HS, Cannon-Albright LA, Thoresen M, Nafstad P, et al. Family history of cancer and risk of paediatric and young adult’s testicular cancer: A Norwegian cohort study. *Br J Cancer.* 2019 May;120(10):1007–14.

27. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*. 2016 Jan;315(1):68–76.
28. Litchfield K, Thomsen H, Mitchell JS, Sundquist J, Houlston RS, Hemminki K, et al. Quantifying the heritability of testicular germ cell tumour using both population-based and genomic approaches. *Sci Rep*. 2015 Sep;5:13889.
29. Parra BL, Venable DD, Gonzalez E, Eastham JA. Testicular microlithiasis as a predictor of intratubular germ cell neoplasia. *Urology*. 1996 Nov;48(5):797–9.
30. Ikinger U, Wurster K, Terwey B, Mohring K. Microcalcifications in testicular malignancy: diagnostic tool in occult tumor? *Urology*. 1982 May;19(5):525–8.
31. Hobarth K, Susani M, Szabo N, Kratzik C. Incidence of testicular microlithiasis. *Urology*. 1992 Nov;40(5):464–7.
32. Bach AM, Hann LE, Hadar O, Shi W, Yoo HH, Giess CS, et al. Testicular microlithiasis: what is its association with testicular cancer? *Radiology*. 2001 Jul;220(1):70–5.
33. Renshaw AA. Testicular calcifications: incidence, histology and proposed pathological criteria for testicular microlithiasis. *J Urol*. 1998 Nov;160(5):1625–8.
34. Backus ML, Mack LA, Middleton WD, King BF, Winter TC 3rd, True LD. Testicular microlithiasis: imaging appearances and pathologic correlation. *Radiology*. 1994 Sep;192(3):781–5.
35. van Casteren NJ, Looijenga LHJ, Dohle GR. Testicular microlithiasis and carcinoma in situ overview and proposed clinical guideline. *Int J Androl*. 2009 Aug;32(4):279–87.
36. Rashid HH, Cos LR, Weinberg E, Messing EM. Testicular microlithiasis: a review and its association with testicular cancer. *Urol Oncol*. 2004;22(4):285–9.
37. Peterson AC, Bauman JM, Light DE, McMann LP, Costabile RA. The prevalence of testicular microlithiasis in an asymptomatic population of men 18 to 35 years old. *J Urol*. 2001 Dec;166(6):2061–4.
38. Pedersen MR, Rafaelsen SR, Moller H, Vedsted P, Osther PJ. Testicular microlithiasis and testicular cancer: review of the literature. *Int Urol Nephrol*. 2016 Jul;48(7):1079–86.
39. Weissbach L, Altwein JE, Stiens R. Germinal testicular tumors in childhood. Report of observations and literature review. *Eur Urol*. 1984;10(2):73–85.
40. Ross RK, McCurtis JW, Henderson BE, Menck HR, Mack TM, Martin SP. Descriptive epidemiology of testicular and prostatic cancer in Los Angeles. *Br J Cancer*. 1979 Mar;39(3):284–92.

41. Holmes LJ, Escalante C, Garrison O, Foldi BX, Ogungbade GO, Essien EJ, et al. Testicular cancer incidence trends in the USA (1975-2004): plateau or shifting racial paradigm? *Public Health*. 2008 Sep;122(9):862–72.
42. Lefevre RE, Levin HS, Banowsky LH, Straffon RA, Stewart BH, Hewitt CB. Bilateral testicular tumors of germ cell origin. *J Urol*. 1975 Oct;114(4):556–9.
43. Van den Eeden SK, Weiss NS, Strader CH, Daling JR. Occupation and the occurrence of testicular cancer. *Am J Ind Med*. 1991;19(3):327–37.
44. Hansen J. Risk for testicular cancer after occupational exposure to plastics. Vol. 82, *International journal of cancer*. United States; 1999. p. 911–2.
45. Walschaerts M, Muller A, Auger J, Bujan L, Guerin J-F, Le Lannou D, et al. Environmental, occupational and familial risks for testicular cancer: a hospital-based case-control study. *Int J Androl*. 2007 Aug;30(4):222–9.
46. Hardell L, Malmqvist N, Ohlson C-G, Westberg H, Eriksson M. Testicular cancer and occupational exposure to polyvinyl chloride plastics: a case-control study. *Int J cancer*. 2004 Apr;109(3):425–9.
47. Ohlson CG, Hardell L. Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics. *Chemosphere*. 2000;40(9–11):1277–82.
48. Pollan M, Gustavsson P, Cano MI. Incidence of testicular cancer and occupation among Swedish men gainfully employed in 1970. *Ann Epidemiol*. 2001 Nov;11(8):554–62.
49. Rhomberg W, Schmoll HJ, Schneider B. High frequency of metalworkers among patients with seminomatous tumors of the testis: a case-control study. *Am J Ind Med*. 1995 Jul;28(1):79–87.
50. Baumgardt-Elms C, Ahrens W, Broman K, Boikat U, Stang A, Jahn I, et al. Testicular cancer and electromagnetic fields (EMF) in the workplace: results of a population-based case-control study in Germany. *Cancer Causes Control*. 2002 Dec;13(10):895–902.
51. Giannandrea F, Gandini L, Paoli D, Turci R, Figa-Talamanca I. Pesticide exposure and serum organochlorine residuals among testicular cancer patients and healthy controls. *J Environ Sci Health B*. 2011;46(8):780–7.
52. McGlynn KA, Quraishi SM, Graubard BI, Weber J-P, Rubertone M V, Erickson RL. Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2008 May;100(9):663–71.
53. Purdue MP, Engel LS, Langseth H, Needham LL, Andersen A, Barr DB, et al. Prediagnostic serum

- concentrations of organochlorine compounds and risk of testicular germ cell tumors. *Environ Health Perspect*. 2009 Oct;117(10):1514–9.
54. Myrup C, Westergaard T, Schnack T, Oudin A, Ritz C, Wohlfahrt J, et al. Testicular cancer risk in first- and second-generation immigrants to Denmark. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Jan;100(1):41–7.
 55. Beiki O, Granath F, Allebeck P, Akre O, Moradi T. Subtype-specific risk of testicular tumors among immigrants and their descendants in Sweden, 1960 to 2007. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Apr;19(4):1053–65.
 56. Gajendran VK, Nguyen M, Ellison LM. Testicular cancer patterns in African-American men. *Urology*. 2005 Sep;66(3):602–5.
 57. Garolla A, Ferlin A, Vinanzi C, Roverato A, Sotti G, Artibani W, et al. Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Sep;12(3):645–55.
 58. Giwercman A, Lundin KB, Eberhard J, Stahl O, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, et al. Linkage between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular germ cell cancer histological type and clinical stage. *Eur J Cancer*. 2004 Sep;40(14):2152–8.
 59. Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Daugaard G, Andersen CB, Petersen PM, Hinrichsen J, et al. Analysis of the polymorphic CAG repeat length in the androgen receptor gene in patients with testicular germ cell cancer. *Int J cancer*. 2002 Nov;102(2):201–4.
 60. Chung CC, Kanetsky PA, Wang Z, Hildebrandt MAT, Koster R, Skotheim RI, et al. Meta-analysis identifies four new loci associated with testicular germ cell tumor. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):680–5.
 61. Wang Z, McGlynn KA, Rajpert-De Meyts E, Bishop DT, Chung CC, Dalgaard MD, et al. Meta-analysis of five genome-wide association studies identifies multiple new loci associated with testicular germ cell tumor. *Nat Genet*. 2017 Jul;49(7):1141–7.
 62. Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, Li M, Vaughn DJ, Letrero R, et al. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):811–5.
 63. Rapley EA, Turnbull C, Al Olama AA, Dermitzakis ET, Linger R, Huddart RA, et al. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):807–10.
 64. Turnbull C, Rapley EA, Seal S, Pernet D, Renwick A, Hughes D, et al. Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. *Nat Genet*. 2010 Jul;42(7):604–7.
 65. Ruark E, Seal S, McDonald H, Zhang F, Elliot A, Lau K, et al. Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14. *Nat Genet*.

- 2013 Jun;45(6):686–9.
66. Koster R, Mitra N, D’Andrea K, Vardhanabhuti S, Chung CC, Wang Z, et al. Pathway-based analysis of GWAs data identifies association of sex determination genes with susceptibility to testicular germ cell tumors. *Hum Mol Genet.* 2014 Nov;23(22):6061–8.
 67. Kristiansen W, Karlsson R, Rounge TB, Whittington T, Andreassen BK, Magnusson PK, et al. Two new loci and gene sets related to sex determination and cancer progression are associated with susceptibility to testicular germ cell tumor. *Hum Mol Genet.* 2015 Jul;24(14):4138–46.
 68. Litchfield K, Holroyd A, Lloyd A, Broderick P, Nsengimana J, Eeles R, et al. Identification of four new susceptibility loci for testicular germ cell tumour. *Nat Commun.* 2015 Oct;6:8690.
 69. Litchfield K, Sultana R, Renwick A, Dudakia D, Seal S, Ramsay E, et al. Multi-stage genome-wide association study identifies new susceptibility locus for testicular germ cell tumour on chromosome 3q25. *Hum Mol Genet.* 2015 Feb;24(4):1169–76.
 70. Litchfield K, Summersgill B, Yost S, Sultana R, Labreche K, Dudakia D, et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nat Commun.* 2015 Jan;6:5973.
 71. Litchfield K, Levy M, Orlando G, Loveday C, Law PJ, Migliorini G, et al. Identification of 19 new risk loci and potential regulatory mechanisms influencing susceptibility to testicular germ cell tumor. *Nat Genet.* 2017 Jul;49(7):1133–40.
 72. Loveday C, Sud A, Litchfield K, Levy M, Holroyd A, Broderick P, et al. Runs of homozygosity and testicular cancer risk. *Andrology.* 2019 Jul;7(4):555–64.
 73. Litchfield K, Loveday C, Levy M, Dudakia D, Rapley E, Nsengimana J, et al. Large-scale Sequencing of Testicular Germ Cell Tumour (TGCT) Cases Excludes Major TGCT Predisposition Gene. *Eur Urol.* 2018 Jun;73(6):828–31.
 74. Roskoski RJ. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Nov;337(1):1–13.
 75. Heaney JD, Lam M-YJ, Michelson M V, Nadeau JH. Loss of the transmembrane but not the soluble kit ligand isoform increases testicular germ cell tumor susceptibility in mice. *Cancer Res.* 2008 Jul;68(13):5193–7.
 76. Litchfield K, Levy M, Huddart RA, Shipley J, Turnbull C. The genomic landscape of testicular germ cell tumours: from susceptibility to treatment. *Nat Rev Urol.* 2016 Jul;13(7):409–19.

77. Wohrle FU, Daly RJ, Brummer T. Function, regulation and pathological roles of the Gab/DOS docking proteins. *Cell Commun Signal*. 2009 Sep;7:22.
78. Ding C-B, Yu W-N, Feng J-H, Luo J-M. Structure and function of Gab2 and its role in cancer (Review). *Mol Med Rep*. 2015 Sep;12(3):4007–14.
79. Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, Vaughn DJ, Li M, Ciosek SL, et al. A second independent locus within DMRT1 is associated with testicular germ cell tumor susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2011 Aug;20(15):3109–17.
80. Litchfield K, Mitchell JS, Shipley J, Huddart R, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, et al. Polygenic susceptibility to testicular cancer: implications for personalised health care. *Br J Cancer*. 2015 Nov;113(10):1512–8.
81. Goh G, Choi M. Application of Whole Exome Sequencing to Identify Disease-Causing Variants in Inherited Human Diseases. *Genomics Inform*. 2012 Dec;10(4):214–9.
82. Paumard-Hernandez B, Calvete O, Inglada Perez L, Tejero H, Al-Shahrour F, Pita G, et al. Whole exome sequencing identifies PLEC, EXO5 and DNAH7 as novel susceptibility genes in testicular cancer. *Int J cancer*. 2018 Oct;143(8):1954–62.
83. Navarro-Costa P. Sex, rebellion and decadence: the scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1822(12):1851–63.
84. Repping S, van Daalen SKM, Brown LG, Korver CM, Lange J, Marszalek JD, et al. High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat Genet*. 2006 Apr;38(4):463–7.
85. Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet*. 2017 May;136(5):637–55.
86. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. 1976 Oct;34(2):119–24.
87. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014 Jan;2(1):5–19.
88. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet*. 2002 Oct;71(4):906–22.
89. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. The

- AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):279–86.
90. Navarro-Costa P, Goncalves J, Plancha CE. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2010;16(5):525–42.
 91. Krausz C, Chianese C, Giachini C, Guarducci E, Laface I, Forti G. The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility. *J Endocrinol Invest.* 2011 May;34(5):376–82.
 92. Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SKM, Korver CM, Pyntikova T, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):247–51.
 93. Bansal SK, Jaiswal D, Gupta N, Singh K, Dada R, Sankhwar SN, et al. Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Sci Rep.* 2016 Feb;6:19798.
 94. Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, et al. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 2012 Nov;91(5):890–6.
 95. Wu B, Lu NX, Xia YK, Gu AH, Lu CC, Wang W, et al. A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population. *Hum Reprod.* 2007 Apr;22(4):1107–13.
 96. Lu C, Zhang J, Li Y, Xia Y, Zhang F, Wu B, et al. The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar;18(6):1122–30.
 97. Eloualid A, Rhaissi H, Reguig A, Bounaceur S, El Houate B, Abidi O, et al. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS One.* 2012;7(4):e34902.
 98. Vijesh VV, Nambiar V, Mohammed SIK, Sukumaran S, Suganthi R. Screening for AZFc partial deletions in Dravidian men with nonobstructive azoospermia and oligozoospermia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015 Mar;19(3):150–5.
 99. Lin Y-W, Hsu LC-L, Kuo P-L, Huang WJ, Chiang H-S, Yeh S-D, et al. Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. *Hum Mutat.* 2007 May;28(5):486–94.
 100. Ye J, Ma L, Yang L, Wang J, Wang Y, Guo H, et al. Partial AZFc duplications not deletions are

- associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013 Sep;14(9):807–15.
101. Yang B, Ma Y, Liu Y, Li L, Yang D, Tu W, et al. Common AZFc structure may possess the optimal spermatogenesis efficiency relative to the rearranged structures mediated by non-allele homologous recombination. *Sci Rep*. 2015 May;5:10551.
 102. Noordam MJ, Westerveld GH, Hovingh SE, van Daalen SKM, Korver CM, van der Veen F, et al. Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. *Hum Mol Genet*. 2011 Jun;20(12):2457–63.
 103. Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, Rajmil O, et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet*. 2014 Jun;22(6):754–61.
 104. Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet*. 2008 Nov;124(4):399–410.
 105. Frydelund-Larsen L, Vogt PH, Leffers H, Schadwinkel A, Daugaard G, Skakkebaek NE, et al. No AZF deletion in 160 patients with testicular germ cell neoplasia. *Mol Hum Reprod*. 2003 Sep;9(9):517–21.
 106. Lutke Holzik MF, Storm K, Sijmons RH, D'hollander M, Arts EGJM, Verstraaten ML, et al. Absence of constitutional Y chromosome AZF deletions in patients with testicular germ cell tumors. *Urology*. 2005 Jan;65(1):196–201.
 107. Bor P, Hindkjaer J, Kolvraa S, Rossen P, von der Maase H, Jorgensen TM, et al. Screening for Y microdeletions in men with testicular cancer and undescended testis. *J Assist Reprod Genet*. 2006 Jan;23(1):41–5.
 108. Quintana-Murci L, Weale ME, Thomas MG, Erdei E, Bradman N, Shanks JH, et al. Y chromosome haplotypes and testicular cancer in the English population. Vol. 40, *Journal of medical genetics*. England; 2003. p. e20.
 109. Ewis AA, Lee J, Naroda T, Kagawa S, Baba Y, Nakahori Y. Lack of association between the incidence of testicular germ cell tumors and Y-chromosome haplogroups in the Japanese population. *Int J Urol*. 2006 Sep;13(9):1212–7.
 110. Ferlin A, Speltra E, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Foresta C. Y chromosome haplogroups and susceptibility to testicular cancer. *Mol Hum Reprod*. 2007 Sep;13(9):615–9.

111. Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R, Vaughn DJ, Letrero R, Tucker K, et al. The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet.* 2005 Dec;77(6):1034–43.
112. Linger R, Dudakia D, Huddart R, Easton D, Bishop DT, Stratton MR, et al. A physical analysis of the Y chromosome shows no additional deletions, other than Gr/Gr, associated with testicular germ cell tumour. *Br J Cancer.* 2007 Jan;96(2):357–61.
113. Forsberg LA, Rasi C, Malmqvist N, Davies H, Pasupulati S, Pakalapati G, et al. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer. *Nat Genet.* 2014 Jun;46(6):624–8.
114. Machiela MJ, Dagnall CL, Pathak A, Loud JT, Chanock SJ, Greene MH, et al. Mosaic chromosome Y loss and testicular germ cell tumor risk. *J Hum Genet.* 2017 Jun;62(6):637–40.
115. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 2001 May;16(5):972–8.
116. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson A-M, Eisenberg ML, et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):55–97.
117. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Main KM, Leffers H, Andersson A-M, et al. Testicular cancer trends as “whistle blowers” of testicular developmental problems in populations. *Int J Androl.* 2007 Aug;30(4):195–8.
118. Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, Hansen J, Olsen JH, Skakkebaek NE, et al. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *BMJ.* 2000 Sep;321(7264):789–92.
119. Moller H, Skakkebaek NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ.* 1999 Feb;318(7183):559–62.
120. Schneuer FJ, Milne E, Jamieson SE, Pereira G, Hansen M, Barker A, et al. Association between male genital anomalies and adult male reproductive disorders: a population-based data linkage study spanning more than 40 years. *Lancet Child Adolesc Heal.* 2018 Oct;2(10):736–43.
121. Schnack TH, Poulsen G, Myrup C, Wohlfahrt J, Melbye M. Familial coaggregation of cryptorchidism, hypospadias, and testicular germ cell cancer: a nationwide cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Feb;102(3):187–92.
122. Shiratsuchi A, Osada Y, Nakanishi Y. Differences in the mode of phagocytosis of bacteria between macrophages and testicular Sertoli cells. *Drug Discov Ther.* 2013 Apr;7(2):73–7.

123. Xiong W, Wang H, Wu H, Chen Y, Han D. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction*. 2009 Mar;137(3):469–79.
124. Welsh M, Saunders PTK, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1479–90.
125. Welsh M, Suzuki H, Yamada G. The masculinization programming window. *Endocr Dev*. 2014;27:17–27.
126. Lympieri S, Giwercman A. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism*. 2018 Sep;86:79–90.
127. Xing J-S, Bai Z-M. Is testicular dysgenesis syndrome a genetic, endocrine, or environmental disease, or an unexplained reproductive disorder? *Life Sci*. 2018 Feb;194:120–9.
128. Damgaard IN, Skakkebak NE, Toppari J, Virtanen HE, Shen H, Schramm K-W, et al. Persistent Pesticides in Human Breast Milk and Cryptorchidism. *Environ Health Perspect*. 2006 Jul;114(7):1133–8.
129. Andersen HR, Schmidt IM, Grandjean P, Jensen TK, Budtz-Jorgensen E, Kjaerstad MB, et al. Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2008 Apr;116(4):566–72.
130. Emmen JM, McLuskey A, Adham IM, Engel W, Verhoef-Post M, Themmen AP, et al. Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology*. 2000 Feb;141(2):846–9.
131. Klip H, Verloop J, van Gool JD, Koster META, Burger CW, van Leeuwen FE. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet (London, England)*. 2002 Mar;359(9312):1102–7.
132. Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard M-O, Daures J-P, Sultan C. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil Steril*. 2011 Jun;95(8):2574–7.
133. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect*. 2003 Apr;111(4):414–20.
134. Liu X, Miao M, Zhou Z, Gao E, Chen J, Wang J, et al. Exposure to bisphenol-A and reproductive hormones among male adults. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 Mar;39(2):934–41.

135. Hardell L, van Bavel B, Lindström G, Carlberg M, Dreifaldt AC, Wijkström H, et al. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environ Health Perspect.* 2003 Jun;111(7):930–4.
136. Nori F, Carbone P, Giordano F, Osborn J, Figa-Talamanca I. Endocrine-disrupting chemicals and testicular cancer: a case-control study. *Arch Environ Occup Health.* 2006;61(2):87–95.
137. Hu Y, Dong C, Chen M, Lu J, Han X, Qiu L, et al. Low-dose monobutyl phthalate stimulates steroidogenesis through steroidogenic acute regulatory protein regulated by SF-1, GATA-4 and C/EBP-beta in mouse Leydig tumor cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Jul;11:72.
138. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM. Human “testicular dysgenesis syndrome”: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod.* 2003 Jul;18(7):1383–94.
139. Gray LEJ, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN, Parks L. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci.* 2000 Dec;58(2):350–65.
140. Andrade AJM, Grande SW, Talsness CE, Gericke C, Grote K, Golombiewski A, et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology.* 2006 Nov;228(1):85–97.
141. Li L, Bu T, Su H, Chen Z, Liang Y, Zhang G, et al. Inutero exposure to diisononyl phthalate caused testicular dysgenesis of rat fetal testis. *Toxicol Lett.* 2015 Jan;232(2):466–74.
142. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Vol. 97, *Cell.* United States; 1999. p. 161–3.
143. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* 2002 Jul;20(13):3001–15.
144. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995 Dec;83(6):835–9.
145. Yong EL, Ghadessy F, Wang Q, Mifsud A, Ng SC. Androgen receptor transactivation domain and control of spermatogenesis. *Rev Reprod.* 1998 Sep;3(3):141–4.
146. Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Petersen JH, Andersen AG, Carlsen E, Jorgensen N, et al. CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. Vol. 359, *Lancet (London, England).* England; 2002. p. 44–6.
147. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in

- the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug;22(15):3181–6.
148. Dowsing AT, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, de Kretser DM, Trounson AO. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet (London, England).* 1999 Aug;354(9179):640–3.
 149. Yoshida KI, Yano M, Chiba K, Honda M, Kitahara S. CAG repeat length in the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia. *Urology.* 1999 Dec;54(6):1078–81.
 150. Patrizio P, Leonard DG, Chen KL, Hernandez-Ayup S, Trounson AO. Larger trinucleotide repeat size in the androgen receptor gene of infertile men with extremely severe oligozoospermia. *J Androl.* 2001;22(3):444–8.
 151. Giwercman YL, Xu C, Arver S, Pousette A, Reneland R. No association between the androgen receptor gene CAG repeat and impaired sperm production in Swedish men. Vol. 54, *Clinical genetics.* Denmark; 1998. p. 435–6.
 152. von Eckardstein S, Syska A, Gromoll J, Kamischke A, Simoni M, Nieschlag E. Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2585–90.
 153. Ferlin A, Bartoloni L, Rizzo G, Roverato A, Garolla A, Foresta C. Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2004 Jun;10(6):417–21.
 154. Mengual L, Oriola J, Ascaso C, Ballesca JL, Oliva R. An increased CAG repeat length in the androgen receptor gene in azoospermic ICSI candidates. *J Androl.* 2003;24(2):279–84.
 155. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. The possible role of sex hormones in the development of testicular cancer. *Eur Urol.* 1993;23(1):51–4.
 156. Vastermark A, Giwercman YL, Hagstromer O, Rajpert De-Meyts E, Eberhard J, Stahl O, et al. Polymorphic variation in the androgen receptor gene: association with risk of testicular germ cell cancer and metastatic disease. *Eur J Cancer.* 2011 Feb;47(3):413–9.
 157. Kristiansen W, Aschim EL, Andersen JM, Witczak O, Fossa SD, Haugen TB. Variations in testosterone pathway genes and susceptibility to testicular cancer in Norwegian men. *Int J Androl.* 2012 Dec;35(6):819–27.
 158. Grassetti D, Giannandrea F, Paoli D, Masciandaro P, Figura V, Carlini T, et al. Androgen receptor polymorphisms and testicular cancer risk. *Andrology.* 2015 Jan;3(1):27–33.

159. Jiang W, Zhang J, Zhou Q, Liu S, Ni M, Zhu P, et al. Predictive value of GGN and CAG repeat polymorphisms of androgen receptors in testicular cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Mar;7(12):13754–64.
160. Qin J, Cui N, Hou R, Liu T, Sun H, Liu Y, et al. Association between androgen receptor gene polymorphisms and testicular germ cell tumor: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Ther*. 2019 Mar;15(Supplement):S60–8.
161. Salazar-Martinez E, Romano-Riquer P, Yanez-Marquez E, Longnecker MP, Hernandez-Avila M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health*. 2004 Sep;3(1):8.
162. Sathyanarayana S, Beard L, Zhou C, Grady R. Measurement and correlates of ano-genital distance in healthy, newborn infants. *Int J Androl*. 2010 Apr;33(2):317–23.
163. McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci*. 2001 Aug;62(2):236–49.
164. Ipuban LA, Suzuki K, Sakamoto Y, Murashima A, Imai Y, Omori A, et al. Nonmyocytic androgen receptor regulates the sexually dimorphic development of the embryonic bulbocavernosus muscle. *Endocrinology*. 2014 Jul;155(7):2467–79.
165. Christiansen S, Scholze M, Axelstad M, Boberg J, Kortenkamp A, Hass U. Combined exposure to anti-androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Int J Androl*. 2008 Apr;31(2):241–8.
166. Suzuki Y, Yoshinaga J, Mizumoto Y, Serizawa S, Shiraishi H. Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *Int J Androl*. 2012 Jun;35(3):236–44.
167. Adibi JJ, Lee MK, Naimi AI, Barrett E, Nguyen RH, Sathyanarayana S, et al. Human Chorionic Gonadotropin Partially Mediates Phthalate Association With Male and Female Anogenital Distance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Sep;100(9):E1216–24.
168. Bornehag C-G, Carlstedt F, Jonsson BAG, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, et al. Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environ Health Perspect*. 2015 Jan;123(1):101–7.
169. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Decrease in anogenital

- distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect.* 2005 Aug;113(8):1056–61.
170. Vafeiadi M, Agramunt S, Papadopoulou E, Besselink H, Mathianaki K, Karakosta P, et al. In utero exposure to dioxins and dioxin-like compounds and anogenital distance in newborns and infants. *Environ Health Perspect.* 2013 Jan;121(1):125–30.
171. Miao M, Yuan W, He Y, Zhou Z, Wang J, Gao E, et al. In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011 Oct;91(10):867–72.
172. Mammadov E, Uncu M, Dalkan C. High Prenatal Exposure to Bisphenol A Reduces Anogenital Distance in Healthy Male Newborns. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2018 Mar;10(1):25–9.
173. Papadopoulou E, Vafeiadi M, Agramunt S, Basagana X, Mathianaki K, Karakosta P, et al. Anogenital distances in newborns and children from Spain and Greece: predictors, tracking and reliability. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2013 Jan;27(1):89–99.
174. Mendiola J, Stahlhut RW, Jørgensen N, Liu F, Swan SH. Shorter Anogenital Distance Predicts Poorer Semen Quality in Young Men in Rochester, New York. *Environ Health Perspect.* 2011 Jul;119(7):958–63.
175. Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, Krasnow R, Lipshultz LI. The Relationship between Anogenital Distance, Fatherhood, and Fertility in Adult Men. *PLoS One.* 2011;6(5).
176. Mendiola J, Onate-Celdran J, Samper-Mateo P, Arense-Gonzalo JJ, Torres-Roca M, Sanchez-Rodriguez C, et al. Comparability and reproducibility of adult male anogenital distance measurements for two different methods. *Andrology.* 2016 Jul;4(4):626–31.
177. Eisenberg ML, Hsieh T-C, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and age. *Andrology.* 2013 Jan;1(1):90–3.
178. Dean A, Sharpe RM. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jun;98(6):2230–8.
179. Thankamony A, Lek N, Carroll D, Williams M, Dunger DB, Acerini CL, et al. Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. *Environ Health Perspect.* 2014 Feb;122(2):207–11.
180. Hsieh MH, Breyer BN, Eisenberg ML, Baskin LS. Associations among hypospadias, cryptorchidism,

- anogenital distance, and endocrine disruption. *Curr Urol Rep*. 2008 Mar;9(2):137–42.
181. Jiang D, Geng H, Lin H, Xi-na Y, Zhang X, Yang S, et al. [Relationship between anogenital distance and cryptorchidism in human newborns]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2015 May;21(5):432–5.
 182. Jain VG, Singal AK. Shorter anogenital distance correlates with undescended testis: a detailed genital anthropometric analysis in human newborns. *Hum Reprod*. 2013 Sep;28(9):2343–9.
 183. Hua X-G, Hu R, Hu C-Y, Li F-L, Jiang W, Zhang X-J. Associations between hypospadias, cryptorchidism and anogenital distance: Systematic review and meta-analysis. *Andrologia*. 2018 Dec;50(10):e13152.
 184. Hsieh MH, Eisenberg ML, Hittelman AB, Wilson JM, Tasian GE, Baskin LS. Caucasian male infants and boys with hypospadias exhibit reduced anogenital distance. *Hum Reprod*. 2012 Jun;27(6):1577–80.
 185. Gilboa Y, Perlman S, Kivilevitch Z, Messing B, Achiron R. Prenatal Anogenital Distance Is Shorter in Fetuses With Hypospadias. *J Ultrasound Med*. 2017 Jan;36(1):175–82.
 186. Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect*. 2009 Nov;117(11):1786–90.
 187. Eisenberg ML, Shy M, Chanc Walters R, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and azoospermia in adult men. *Int J Androl*. 2012;
 188. Mendiola J, Melgarejo M, Monino-Garcia M, Cutillas-Tolin A, Noguera-Velasco JA, Torres-Cantero AM. Is anogenital distance associated with semen quality in male partners of subfertile couples? *Andrology*. 2015 Jul;3(4):672–6.
 189. Parra MD, Mendiola J, Jorgensen N, Swan SH, Torres-Cantero AM. Anogenital distance and reproductive parameters in young men. *Andrologia*. 2016 Feb;48(1):3–10.
 190. Priskorn L, Bang AK, Nordkap L, Krause M, Mendiola J, Jensen TK, et al. Anogenital distance is associated with semen quality but not reproductive hormones in 1106 young men from the general population. *Hum Reprod*. 2019 Jan;34(1):12–24.
 191. Eisenberg ML, Jensen TK, Walters RC, Skakkebaek NE, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *J Urol*. 2012 Feb;187(2):594–8.
 192. Wilson JD. The critical role of androgens in prostate development. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011 Sep;40(3):577–90, ix.
 193. Castano-Vinyals G, Carrasco E, Lorente JA, Sabate Y, Cirac-Claveras J, Pollan M, et al. Anogenital

- distance and the risk of prostate cancer. *BJU Int.* 2012 Dec;110(11 Pt B):E707-10.
194. Sahin A, Kutluhan MA, Toprak T, Vural Y, Urkmez A, Akan S, et al. Assessment of anogenital distance as a marker in diagnosis of prostate cancer. *Arch Ital di Urol Androl organo Uff [di] Soc Ital di Ecogr Urol e Nefrol.* 2019 Oct;91(3).
 195. Eisenberg ML, Hsieh T-C, Pastuszak AW, McIntyre MG, Walters RC, Lamb DJ, et al. The relationship between anogenital distance and the androgen receptor CAG repeat length. *Asian J Androl.* 2013 Mar;15(2):286–9.
 196. Tyler-Smith C. An evolutionary perspective on Y-chromosomal variation and male infertility. *Int J Androl.* 2008 Aug;31(4):376–82.
 197. Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl’Innocenti S, Becherini L, Forti G, et al. The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? Vol. 42, *Journal of medical genetics.* England; 2005. p. 497–502.
 198. Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2002 Mar;8(3):286–98.
 199. Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005 Mar;42(3):209–13.
 200. Krausz C, Giachini C, Xue Y, O’Byrne MK, Gromoll J, Rajpert-de Meyts E, et al. Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet.* 2009 Jan;46(1):21–31.
 201. Teitz LS, Pyntikova T, Skaletsky H, Page DC. Selection Has Countered High Mutability to Preserve the Ancestral Copy Number of Y Chromosome Amplicons in Diverse Human Lineages. *Am J Hum Genet.* 2018 Aug;103(2):261–75.
 202. Reijo RA, Dorfman DM, Slee R, Renshaw AA, Loughlin KR, Cooke H, et al. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod.* 2000 Nov;63(5):1490–6.
 203. Mitchell RT, Mungall W, McKinnell C, Sharpe RM, Cruickshanks L, Milne L, et al. Anogenital distance plasticity in adulthood: implications for its use as a biomarker of fetal androgen action. *Endocrinology.* 2015 Jan;156(1):24–31.

204. Foster PMD. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl*. 2006 Feb;29(1):140–5.
205. Liu C, Xu X, Huo X. Anogenital distance and its application in environmental health research. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014 Apr;21(8):5457–64.
206. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009 Jun;30(4):293–342.
207. Zhou N, Sun L, Yang H, Chen Q, Wang X, Yang H, et al. Anogenital distance is associated with serum reproductive hormones, but not with semen quality in young men. *Hum Reprod*. 2016 May;31(5):958–67.
208. Foresta C, Valente U, Di Nisio A, Cacco N, Magagna S, Cosci I, et al. Anogenital distance is associated with genital measures and seminal parameters but not anthropometrics in a large cohort of young adult men. *Hum Reprod*. 2018 Sep;33(9):1628–35.
209. Jorgensen 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 Apr;33(2):298–303.
210. Gates MA, Mekary RA, Chiu GR, Ding EL, Wittert GA, Araujo AB. Sex steroid hormone levels and body composition in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jun;98(6):2442–50.
211. Seidell JC, Bjorntorp P, Sjostrom L, Kvist H, Sannerstedt R. Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism*. 1990 Sep;39(9):897–901.
212. Anderson RE, Hanson HA, Patel DP, Johnstone E, Aston KI, Carrell DT, et al. Cancer risk in first- and second-degree relatives of men with poor semen quality. *Fertil Steril*. 2016 Sep;106(3):731–8.