

Señales de transducción y mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli

Signal transduction pathways and molecular mechanisms involved in the regulation of Sertoli cell proliferation

Cecilia L. Centola, Gustavo M. Rindone, Agostina Gorga, Eliana H. Pellizzari, Selva B. Cigorraga, María F. Riera, Silvina B. Meroni, María N. Galardo

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr. César Bergadá (CEDIE)-CONICET/FEI/División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Contacto de la autora: María N. Galardo

E-mail: mngalardo@cedie.org.ar

Correspondencia: Gallo 1330, C1425 CABA

Recibido: 15/4/2020

Aceptado: 16/6/2020

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

RESUMEN

Las células de Sertoli son células somáticas presentes en los túbulos seminíferos que cumplen funciones esenciales en la regulación de la espermatogénesis. Teniendo en cuenta que cada célula de Sertoli es capaz de sustentar un número limitado de células germinales, el número final de células de Sertoli alcanzado durante el período proliferativo determina la capacidad de producción de esperma. Solo proliferan las células de Sertoli inmaduras mientras no hayan establecido el complejo de uniones intercelulares que conforman la barrera hematotesticular. El cese de la proliferación es un prerrequisito para la maduración de las células de Sertoli acompañado del establecimiento de la barrera hematotesticular. Esta revisión se centra en las hormonas, los factores producidos localmente, las vías de transducción de señales y los mecanismos moleculares que controlan la proliferación y maduración de las células de Sertoli. La comprensión de cómo se establece el número final de células de Sertoli en la edad adulta constituye un requisito previo para comprender las causas subyacentes responsables de la disminución progresiva en la producción de esperma observada durante los últimos 50 años en los seres humanos.

Palabras clave: célula de Sertoli, proliferación, maduración, señales de transducción.

ABSTRACT

Sertoli cells are somatic cells present in seminiferous tubules which have essential roles in regulating spermatogenesis. Considering that each Sertoli cell is able to support a limited number of germ cells, the final number of Sertoli cells reached during the proliferative period determines sperm production capacity. Only immature Sertoli cells, which have not established the blood-testis barrier, proliferate. Cessation of proliferation is a prerequisite to Sertoli cells maturation accompanied by the establishment of the blood-testis barrier. This review focuses on the hormones, locally produced factors, signal transduction pathways, and molecular mechanisms controlling Sertoli cells proliferation and maturation. The comprehension of how the final number of Sertoli cells in adulthood is established constitutes a pre-requisite to understand the underlying causes responsible for the progressive decrease in sperm production that has been observed during the last 50 years in humans.

Key words: Sertoli cell, proliferation, maturation, signal transduction.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2020; Vol. XXVII N° 1 Suplemento 1 Enero - junio de

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2020; Vol. XXVII N° 1 Suplemento 1 Enero - junio de

INTRODUCCIÓN

Las células de Sertoli representan uno de los tipos celulares más complejos del organismo. La principal función de este tipo celular es proveer soporte físico y nutricional a las células germinales en desarrollo. Considerando que cada célula de Sertoli es capaz de sustentar un número limitado de células germinales, el número final de células de Sertoli alcanzado durante el período proliferati-

vo determinará la capacidad espermatogénica del individuo adulto¹.

Solo las células de Sertoli inmaduras son capaces de proliferar y se considera que la proliferación cesa en la pubertad en la mayoría de las especies². Así, la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli –determinando el número final de células– y el cese de la proliferación simultáneo

a la maduración constituyen la base de la función testicular en el individuo adulto.

La hormona foliculoestimulante (FSH) y los andrógenos regulan tanto la proliferación como la maduración funcional de este tipo celular. Además de estas hormonas, un gran número de factores participan en la regulación fina de la célula de Sertoli³.

A partir de estudios iniciales llevados a cabo desde la década de 1970 y que establecieron los conceptos básicos en lo que respecta a la proliferación de la célula de Sertoli, se sucedieron importantes investigaciones cuyo objetivo era comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la regulación del ciclo celular en este tipo celular.

En la presente revisión se intentan describir los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la proliferación y el cese de esta simultáneo a la maduración.

PRINCIPALES FACTORES IMPLICADOS EN LA ESTIMULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Las hormonas y los factores producidos localmente –al igual que las vías de señalización y los mecanismos moleculares involucrados en la estimulación de la proliferación de la célula de Sertoli– son cruciales para determinar la producción de espermatozoides en los animales adultos. Los conocimientos actuales sobre la función que desempeñan la FSH, los factores de crecimiento de la familia de la insulina y las activinas en la proliferación de la célula de Sertoli se resumirán en las siguientes secciones.

Hormona foliculoestimulante

Los efectos de esta hormona son mediados por su asociación al receptor (FSHR), una proteína transmembrana de siete dominios, perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR). Está ampliamente aceptado que, en los machos, FSHR se expresa exclusivamente en las células de Sertoli durante la vida fetal y a lo largo de la vida posnatal⁴. Sin embargo, la respuesta a FSH varía según el estado de maduración en el que se encuentre la célula de Sertoli². La FSH regula la proliferación de la célula de Sertoli solo durante los períodos fetal y posnatal, mientras que regula la maduración luego del cese de la mitosis en la pubertad. La primera demostración del papel estimulador de la

FSH sobre la proliferación de la célula de Sertoli proviene de estudios realizados por Griswold et al.⁵. Posteriormente, durante las últimas décadas numerosos estudios determinaron la relevancia de FSH en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli⁶⁻⁹.

Una vez que el papel mitótico de la FSH quedó demostrado de manera convincente, los estudios posteriores se centraron en dilucidar las vías de transducción de señales involucradas en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli desencadenadas por la hormona. Por más de 20 años, ha sido ampliamente aceptado que la vía de señalización Gs/adenosina monofosfato cíclico (AMPC)/quinasa dependiente de AMPC (PKA) era el único mecanismo que contribuía a la acción de la FSH¹⁰. El aumento de la incorporación de [³H]-timidina en células de Sertoli inmaduras incubadas en presencia de dibutilil-AMPC (dbAMPC)^{5,6} fue la primera evidencia de la participación de una vía dependiente de AMPC en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli. Hoy se sabe que las acciones biológicas de FSH se acompañan de la activación de una compleja red de señalización celular. Crepieux et al.¹¹ demostraron que la FSH incrementa la proliferación de células de Sertoli inmaduras a través de la regulación de la vía de las proteínas quinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) de forma PKA y Src dependiente, dirigiendo la progresión del ciclo celular a través de la inducción de ciclina D1. La complejidad de la red de señalización desencadenada por FSHR se ve también reflejada en la activación de fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K)/Akt/p70S6 quinasa (p70S6K) por la FSH en células de Sertoli proliferativas¹². Más recientemente, Riera et al.¹³ demostraron que la FSH regula la proliferación a través de la vía *PI3K/Akt/mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1).

La compleja señalización de FSH es responsable de la inducción/represión de diversos genes a través de la activación de factores de transcripción en las células de Sertoli. Además de modular la actividad transcripcional de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPC (CREB), FSH también modula la de: NFκB, AP1, c-Myc, el factor inducible por hipoxia (HIF)1 y HIF2; sin embargo, hasta el momento solo se ha demostrado que c-Myc y HIF2 estarían implicados en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli por FSH¹³⁻¹⁵.

En resumen, la FSH regula positivamente la proliferación de las células de Sertoli a través de la activación de las vías dependientes de AMPc/PKA/ERK1/2 y PI3K/Akt/mTORC1 y por el aumento de la actividad transcripcional de c-Myc y HIF2 y la expresión de ciclina D1. Sumada a esta complejidad, se debe tener en cuenta la acción de factores autocrinos sobre la regulación de la proliferación de células de Sertoli cuya secreción es regulada por FSH.

Factores de crecimiento de la familia de la insulina

Los factores de crecimiento de la familia de la insulina –insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y 2 (IGF-2) y la relaxina– son pequeños polipéptidos responsables del control de crecimiento y de las funciones metabólicas y reproductivas. IGF-1 y IGF-2 se expresan de forma ubicua, a diferencia de la insulina, la cual se expresa exclusivamente en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Los efectos fisiológicos de estos péptidos son mediados por la activación de receptores tirosina-quinasa: el receptor de insulina (InsR) y el receptor de IGF-1 (IGF-1R).

Las funciones cruciales de la insulina e IGF-1 en el desarrollo testicular han sido más extensamente estudiadas. Se ha demostrado que células de Sertoli aisladas de testículos de embriones y ratones neonatales expresan IGF-1 e IGF-1R y que el tratamiento con IGF-1 promueve la progresión del ciclo celular y la proliferación¹⁶. En cuanto al papel de la insulina, esta hormona también promueve la proliferación; sin embargo, dado que se requirió una mayor concentración de insulina que de IGF-1 para obtener la respuesta biológica, se sugirió que la insulina actuó a través de los receptores de IGF-1¹⁷.

En relación con la vía de transducción de señales desencadenada por el sistema insulina/IGF-1 en células de Sertoli, es ampliamente aceptado que activan las vías de señalización de PI3K/Akt y ERK1/2 a través de distintas isoformas del sustrato del receptor de insulina (IRS). La reducción del peso testicular y del número final de células de Sertoli, espermatogonias, espermátocitos, espermátidas elongadas y espermatozoides observada en ratones adultos nulos para *Irs2*, pero no en ratones nulos para *Irs1*¹⁸, permitió asumir que IGF-1 desempeña un papel crítico en el desarrollo testicular a través de *Irs2*. La participación de la vía ERK1/2 en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli

por IGF-1 ha sido puesta en evidencia a través de la utilización de inhibidores específicos de la vía en cultivos de células de Sertoli embrionarias¹⁶. Cabe aclarar en este punto que se ha propuesto a IGF-1 como mediador de la acción FSH en células de Sertoli inmaduras. Los primeros estudios en la regulación del sistema IGF-1 por FSH demostraron que la gonadotropina estimula la secreción de IGF-1 e inhibe la de la proteína de unión a IGF (IGFBP) 3 en células de Sertoli^{19,20}. Además, se ha demostrado que el aumento del tamaño testicular y el recuento de espermatozoides del epidídimo en ratones hemicastrados durante el período neonatal no se observan en ratones hemicastrados nulos selectivos en células de Sertoli para *Insr;Igf1r* y este no se recupera al tratar con FSH²¹. Por lo que se estima que FSH requiere la vía insulina/IGF-1 para mediar su efecto proliferativo en células de Sertoli inmaduras. Sin embargo, hay que considerar que en los ratones nulos para *Insr;Igf1r* selectivos para células de Sertoli se observó una disminución en la expresión de FSHR y Akt. Por consiguiente, la incapacidad de las células de Sertoli de proliferar luego de la hemicastración o del tratamiento con FSH podría ser explicada por una reducción en la señalización de la hormona. En resumen, se puede concluir que los efectos de la FSH en células de Sertoli inmaduras pueden ser mediados, al menos en parte, por IGF-1 y que la producción local de IGF-1 es un componente importante de la red intratesticular involucrada en la regulación del número de células de Sertoli, el tamaño testicular y la producción de espermatozoides en el adulto.

La relaxina es otro miembro de la familia de péptidos relacionada con la insulina. Para ejercer su efecto biológico se une a receptores de péptidos de la familia de la relaxina (RXFP 1 y 2) pertenecientes a la superfamilia GPCR²². Tanto la relaxina como RXFP1 se expresan en mayor cantidad en células de Sertoli inmaduras, lo que sugiere que tienen un rol importante en los períodos tempranos de la vida²³. La relaxina incrementa la incorporación de [³H]-timidina y los niveles del antígeno nuclear de proliferación (PCNA) en cultivos de células de Sertoli. La proliferación de la célula de Sertoli inducida por relaxina involucra la activación de la proteína Gi y de las vías ERK1/2 y PI3K/Akt²⁴. Más recientemente se demostró la existencia de un *crosstalk* entre FSH y relaxina al final de la etapa proliferativa de las células de Sertoli en ratas, y los autores postularon que mientras que la acción de FSH parece

ser esencial para dirigir la maduración celular, la relaxina parecería promover preferentemente la proliferación de la célula de Sertoli²⁵.

Activinas e inhibinas

Los péptidos gonadales activinas e inhibinas pertenecen a la superfamilia β de los factores de crecimiento transformantes (TGF). Las activinas son homodímeros de dos subunidades β de inhibina codificadas por cinco genes designados de *Inbba* a *Inbbe*²⁶. Las activinas más estudiadas son la activina A ($\beta\beta\beta$) y la activina B ($\beta\beta\beta\beta$). Por otro lado, las inhibinas son heterodímeros conformados por una subunidad β - β A o β B- y una subunidad α , codificada por el gen *Inba*, llamadas inhibina A ($\alpha\beta$ A) e inhibina B ($\alpha\beta$ B) respectivamente²⁶.

Toda información relacionada con la regulación de la función de la célula de Sertoli por parte de la activina fue obtenida utilizando activina A. La activina A se expresa en los testículos durante los períodos fetal y posnatal²⁷⁻²⁹. Mientras que en los testículos fetales las células de Leydig son la fuente principal de activina A³⁰, en los testículos neonatales lo son las células mioideas peritubulares²⁹. Barakat et al.³¹ demostraron que la concentración testicular de activina A es alta durante el período de proliferación de la célula de Sertoli y luego disminuye hasta alcanzar un valor bajo que se mantiene constante hasta la adultez.

La acción de activina A está mediada por su interacción con la subunidad de tipo II del receptor específico, ActRIIa o ActRIIb, que provoca que esa subunidad fosforile la subunidad de tipo I, ActRIb (ALK4). La subunidad de tipo I fosforilada recluta y fosforila a SMAD2 y/o SMAD3, también llamadas SMAD regulatorias. Las SMAD regulatorias fosforiladas se disocian del receptor y se oligomerizan con SMAD4. Este oligómero se transloca al núcleo y afecta la transcripción de genes específicos. Cabe mencionar que las células de Sertoli mitóticamente activas expresan las subunidades de tipo I y tipo II del receptor de activina³².

La importancia de la activina A en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli quedó puesta en evidencia al utilizar ratones nulos para *Inbba* selectivos para células de Leydig. Los resultados obtenidos permitieron postular que la activina A producida por las células de Leydig es el principal regulador paracrino de la mitosis de las células de Sertoli fetales³⁰. A su vez, se observó que ratones que poseen una delección en *ActRIa* o una mutación que lleva a la anulación

de la transducción de la señal de ALK4/5/7 tienen menor tamaño testicular y un número reducido de células de Sertoli^{33,34}. Estos resultados destacaron la importancia fisiológica de este péptido en la mitosis de la célula de Sertoli fetal.

Como ya se mencionó, la producción de activina A decrece con la edad del animal. La caída más marcada ocurre en la pubertad en el momento en que las células de Sertoli maduran y dejan de proliferar³¹. Aunque la producción de activina A decrece, esta molécula no desaparece por completo en el individuo adulto, por lo que se ha indagado sobre el posible papel del péptido en células de Sertoli maduras. En este contexto, Nicholls et al.³⁵ demostraron, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la activina A disrumpe la barrera hematotesticular e induce la expresión de marcadores de inmadurez en las células de Sertoli maduras. Los autores concluyeron que la disminución de la concentración de activina A durante el desarrollo testicular es fisiológicamente relevante y podría ser importante para la correcta función de la célula de Sertoli y para la fertilidad.

Los estudios llevados a cabo en cuanto al papel de la activina B en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli sugieren que este péptido no está involucrado³⁶. Sin embargo, serán necesarios más análisis para determinar si la activina B tiene alguna función en el desarrollo testicular.

En relación con las inhibinas, se demostró que la inhibina B es la principal inhibina circulante en machos y es producida en su mayoría por las células de Sertoli³¹. Un ratón con una delección de *Inba* posee un desarrollo normal del testículo durante la embriogénesis, pero desarrolla tumores testiculares hacia el día 30 de edad³⁷, por lo que se postuló que la inhibina B ejerce una inhibición de la proliferación de la célula de Sertoli. Años después se comprobó que ratones nulos para *Inba*, que no producen inhibina B, tienen una sobreproducción de activina A, lo cual podría explicar el desarrollo de tumores³⁸. En conjunto, esta evidencia sugiere que en la adultez la inhibina B no posee un rol en sí misma, pero tiene un papel en la modulación de la proliferación de la célula de Sertoli inducida por activina A.

En resumen, la activina A estimula la proliferación de la célula de Sertoli durante los períodos fetal y posnatal. Los niveles incrementados de inhibina B en la pubertad podrían contrarrestar los efectos de la activina A.

PRINCIPALES FACTORES INVOLUCRADOS EN EL CESE DE LA PROLIFERACIÓN Y LA MADURACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

El cese de la proliferación de la célula de Sertoli está acompañado por un proceso de maduración, que consiste en cambios profundos en la expresión de genes, el establecimiento de la barrera hematotesticular y la adquisición de la capacidad completa para sustentar el desarrollo de las células germinales. Por lo tanto, el análisis de las hormonas y de los factores producidos de manera local, así como el análisis de las vías de señalización y los mecanismos moleculares implicados en el arresto del ciclo celular y la maduración de las células de Sertoli también son relevantes para entender las posibles alteraciones en la producción de esperma. Los conocimientos actuales sobre el papel de los andrógenos, las hormonas tiroideas, los estrógenos y el ácido retinoico en el cese de la proliferación y/o maduración se resumen en las siguientes secciones.

Andrógenos

El papel de los andrógenos en la fertilidad masculina y en el mantenimiento de la espermatogénesis es bien conocido. Estos ejercen la mayoría de sus efectos a través de acciones genómicas, las cuales involucran su difusión a través de la membrana plasmática para unirse al receptor de andrógenos (AR). AR se expresa en los testículos de rata, en células de Sertoli, en células de Leydig y en las células mioideas peritubulares. Específicamente, en las células de Sertoli su expresión varía a lo largo del desarrollo: no se expresa en estadios fetales y luego va aumentando gradualmente durante el desarrollo posnatal³⁹.

A lo largo de los años se han llevado a cabo un gran número de estudios utilizando distintos enfoques a fin de dilucidar si los andrógenos participaban en la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli; sin embargo, los resultados obtenidos no permitieron elaborar una conclusión convincente. Había que enfrentar el hecho de que durante el período proliferativo de las células de Sertoli la expresión del AR es muy débil en ese tipo celular, por lo que aquellas investigaciones que mostraban la ausencia de efectos de los andrógenos sobre la progresión del ciclo celular en células de Sertoli⁴⁰ eran bien aceptadas, pero eran de difícil interpretación aquellos estudios que afirmaban que los andrógenos ejercían un rol estimulador sobre la proliferación de las células

de Sertoli^{41,42}. Recién cuando se desarrolló el ratón nulo para AR selectivo para células de Sertoli se logró entender casi en su totalidad el papel de los andrógenos al comparar el número de células de Sertoli de este modelo con el de los ratones nulos para AR. Mientras que el número de células de Sertoli en los ratones nulos para AR estaba disminuido, el número final de células de Sertoli permaneció inalterado en los ratones nulos para AR selectivos para células de Sertoli⁴³. De manera concluyente, los animales nulos para AR selectivos para células de Sertoli permitieron demostrar que no se requiere la expresión de AR en las células de Sertoli para lograr un número de células de Sertoli normal. Los datos obtenidos del análisis de los ratones nulos para AR sugirieron que la expresión de AR en otros tipos celulares del testículo podría ser importante para el rol modulador de los andrógenos en la proliferación de la célula de Sertoli. Como las células mioideas peritubulares expresan AR fuertemente durante los períodos fetal y posnatal, y dado que existe evidencia suficiente de que las secreciones de las células mioideas peritubulares pueden modificar la función de la célula de Sertoli, se propuso que los andrógenos regulan la proliferación de la célula de Sertoli indirectamente a través de sus efectos sobre las células mioideas peritubulares. Esta hipótesis encuentra sustento en el hecho de que ratones transgénicos PTCM-*Ar^{r/y}* exhiben menor peso testicular y conteo de esperma, que podría ser una consecuencia de una disminución en el número de células de Sertoli⁴⁴. Teniendo en cuenta que la activina A producida por las células mioideas peritubulares estimula la proliferación de las células de Sertoli²⁹, se ha propuesto que este péptido podría ser el factor paracrino involucrado en la acción indirecta de los andrógenos. El desarrollo de un modelo transgénico que expresa prematuramente el AR de manera específica en células de Sertoli permitió demostrar que los andrógenos inducen la maduración celular de forma directa. Además, una expresión prematura de AR en las células de Sertoli conlleva la reducción de la cantidad de células inmaduras disponibles para la expansión mitótica inducida por FSH y deriva en unas pocas células de Sertoli en la adultez⁴⁵. De acuerdo con estos descubrimientos, Buzzard et al.⁴⁶ habían demostrado con anterioridad que la testosterona inhibe la proliferación de la célula de Sertoli de rata en cultivos primarios a través de la inducción de los inhibidores del ciclo celular p21Cip1 y p27Kip1.

Se debe considerar que la regulación por andrógenos de las funciones de la célula de Sertoli podría involucrar respuestas no clásicas. En una línea celular de células de Sertoli se describió la expresión de un transportador de zinc (ZRT-and Irt-like Protein -ZIP-9) que media la acción de los andrógenos. En esta línea celular ZIP9 participa en la regulación de la expresión de claudina 1 y 5 y el ensamblaje de uniones estrechas⁴⁷. De este modo, debe considerarse la contribución de ZIP9 en la regulación mediada por andrógenos de la maduración de la célula de Sertoli.

En resumen, la regulación de la proliferación de la célula de Sertoli dependiente de andrógenos es un efecto indirecto ejercido probablemente a través de la secreción de un factor paracrino. Efectos directos de andrógenos en células de Sertoli parecerían estar relacionados con la maduración de este tipo celular. El mecanismo por el cual los andrógenos participan en la regulación de la función de la célula de Sertoli permanece aún sin dilucidar.

Hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas T_3 y T_4 (TH) son reguladores críticos del crecimiento, el desarrollo y el metabolismo prácticamente en todos los tejidos. Las TH inician su respuesta biológica a través de vías genómicas clásicas uniéndose al receptor de TH (TRs) de los cuales se conocen hasta el momento cinco isoformas funcionales: TRa1, TRb1, TRb2, TRβ y p43, una forma truncada de TRa1 de expresión mitocondrial^{48,49}. También se describieron efectos no genómicos de TH por activación de la integrina avb3, receptor de membrana plasmática⁵⁰.

En particular en la célula de Sertoli no se ha encontrado expresión de la proteína TRb1 e, interesantemente, la expresión de TRa1 varía con la edad del animal: se expresa en el núcleo de las células de Sertoli proliferantes y su expresión disminuye al mismo tiempo que cesa la proliferación⁵¹. Por otro lado, se describieron sitios de alta afinidad para T_3 en mitocondrias de células de Sertoli de rata⁵², lo que indica la presencia del receptor p43 en este tipo celular. Asimismo, se evidenciaron acciones de TH mediadas por la integrina avb3 en células de Sertoli⁵³.

A partir del análisis de los efectos del hipotiroidismo y del hipertiroidismo en ratas neonatales, se esclareció el papel central de TH en la regulación de la función de la célula de Sertoli inmadura. Por un lado, se observó que el hipotiroidismo temprano causa un incremento en el tamaño testicular y un aumento en la producción de esperma diaria en ratas adultas⁵⁴, lo que se correlaciona con un incremento en el número de células de Sertoli y con un atraso en su maduración. Por otro lado, los niveles neonatales altos de TH redujeron el período de proliferación de la célula de Sertoli, aceleraron la formación del lumen tubular y aumentaron la secreción de inhibina⁵⁵. Estos resultados indicaron que, además de su rol en la detención de la proliferación, TH también promueve la maduración de la célula de Sertoli.

En estudios *in vitro* realizados en cultivos de células de Sertoli se observó que TH inhibió la mitosis de la célula de Sertoli estimulada por FSH⁵⁶ acompañándose de un aumento en la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21Cip1 y p27Kip1⁴⁶. Por otro lado, los tratamientos con TH estimularon la expresión de marcadores de maduración de las células de Sertoli como el AR⁵⁷ e inhibieron la expresión de marcadores de células de Sertoli inmaduras como la hormona antimülleriana (AMH)⁵⁸. En conjunto, la evidencia indica que TH cumple un papel central en la transición del fenotipo inmaduro al funcionalmente maduro de la célula de Sertoli.

Los estudios en ratones nulos para *Trα* y *Trβ* permitieron determinar que TRa1, pero no TRβ, es el receptor mediante el cual TH promueve la maduración de la célula de Sertoli⁵⁹. Esta conclusión fue luego confirmada por el análisis de un animal mutante específico para *Trα1* de las células de Sertoli, *Trα^{AM1}-SC*⁶⁰. Además, se demostró que los ratones nulos para p43 presentan un fenotipo testicular muy similar al observado en los ratones nulos para *Trα* y *Trα^{AM1}-SC*, lo que sugiere que el receptor mitocondrial de p43 tiene un rol fisiológico en el desarrollo de la célula de Sertoli⁶¹.

En relación con los mecanismos moleculares involucrados en el cese de la proliferación de la célula de Sertoli por TH, el papel de la conexina 43 (Cx43), una proteína constitutiva de las uniones *gap* que participa en la formación de uniones estrechas, y el de p27Kip1 merecen especial atención. Con respecto a Cx43, se observó que el efecto inhibitorio de TH en la mitosis de la célula de Sertoli está asociado a un aumento en los niveles de Cx43⁶². De manera interesante, ratones nulos para *Cx43* específica para células de Sertoli mostraron una proliferación prolongada y una maduración retardada en las células de Sertoli en

la adultez⁶³, por lo que a Cx43 se le asigna una función crucial en la capacidad de TH de promover la maduración de la célula de Sertoli. Con relación a p27Kip1, se demostró que la interrupción del ciclo celular inducido por TH es mediada por p27Kip1⁶⁴. Otro mecanismo molecular que sustenta la capacidad de TH de promover el cese de la proliferación de la célula de Sertoli es aquel que involucra a c-Myc, activador de la expresión de la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4). Utilizando animales nulos para *Trα1* específicos para células de Sertoli y nulos para *p43*, se observó una regulación positiva de CDK4 y c-Myc y se postuló que estas proteínas son los factores principales que controlan la proliferación de la célula de Sertoli^{60,61}.

La participación de las vías de transducción de señales en los efectos de TH sobre células de Sertoli inmaduras fue analizada escasamente. En lo que a esto respecta, Sun et al.⁶⁵ postularon que los efectos de TH sobre la proliferación de la célula de Sertoli son dependientes de la inhibición de la vía PI3K/Akt y que este efecto está mediado por la integrina receptora de membrana celular avb3.

En resumen, los estudios realizados hasta ahora han demostrado que TH posee un rol central en el cese de la proliferación de la célula de Sertoli y que promueve la maduración de este tipo celular a través de los receptores de TRα1 y p43. Los mecanismos que participan en este proceso involucran la regulación de Cx43, c-Myc y p27Kip1.

Estrógenos

Los estrógenos cumplen un papel importante en la regulación del desarrollo y la espermatogénesis del testículo. El 17β-estradiol (E2) es el estrógeno predominante y el más activo producido a partir de la testosterona por la enzima aromatasa citocromo P45019 A1, codificada por el gen *Cyp19a1*⁶⁶. En el testículo, las células de Sertoli y las células de Leydig, espermatoцитos y espermátides expresan esa enzima⁶⁷. Las células de Sertoli son la mayor fuente de estrógenos en ratas inmaduras, mientras que las células de Leydig son la mayor fuente en animales adultos⁶⁷.

Las acciones genómicas de los estrógenos son mediadas por el receptor nuclear alfa (ERα o ESR1) o por el beta (ERβ o ESR2). Además de acciones genómicas, se describieron eventos de señalización rápida. Estos efectos rápidos pueden estar mediados por: a) ERα y ERβ localiza-

dos en la membrana plasmática o cerca de ella⁶⁸, b) variantes truncadas de ERα llamadas ERα-46 o ERα-36^{69,70} y/o c) un receptor de estrógenos acoplado a la proteína G (GPER o GPR30)⁷¹.

Tanto ERα como ERβ se expresan en el núcleo de células de Sertoli y células de Leydig⁷²⁻⁷⁴. Asimismo, se confirmó la presencia de GPER en células de Sertoli de ratas inmaduras⁷⁵.

Una de las primeras aproximaciones para evaluar el efecto de los estrógenos en la proliferación de la célula de Sertoli consistió en la administración *in vivo* de estrógenos a ratas. Al respecto, los resultados obtenidos al tratar ratas neonatales con estrógenos, un inhibidor de aromatasa o un antagonista no específico de ER (ICI 182,780) sugirieron que la proliferación de la célula de Sertoli disminuye por activación de receptores de estrógenos⁷⁶⁻⁷⁸. Dado que ICI 182,780 es capaz de antagonizar el efecto tanto de ERα como de ERβ, los resultados obtenidos no distinguieron el tipo de receptor que estaba participando en el efecto biológico.

Con el fin de aclarar el papel de los estrógenos en el desarrollo testicular, se estudiaron diversos modelos de ratones nulos. Debido a que estos modelos no eran selectivos para células de Sertoli y tampoco a las acciones pleiotrópicas de los estrógenos, el fenotipo observado no pudo atribuirse directamente a las acciones directas de los estrógenos sobre la proliferación de la célula de Sertoli.

Los estudios en células de Sertoli aisladas utilizando agonistas y antagonistas específicos de ERα y ERβ permitieron dilucidar el complejo papel de los estrógenos en la proliferación⁷⁴. Por un lado, se observó que los estrógenos modulan la proliferación de la célula de Sertoli por su interacción con ERα a través de la activación de NFκB de manera dependiente de PI3K y ERK1/2 y que esto está acompañado de la inducción de la ciclina D1. Por otro lado, se demostró que ERβ media la salida del ciclo celular y la diferenciación involucrando la activación de CREB de manera PI3K dependiente, lo que conduce a la expresión de marcadores de diferenciación celular de las células de Sertoli – p27Kip, GATA1 y DMRT1. Teniendo en cuenta que la expresión de ERα disminuye mientras que la de ERβ aumenta con la edad del animal, se ha postulado que la relación ERα/ERβ es relevante para determinar la finalización de la proliferación celular y el comienzo de la maduración celular.

Los estudios más recientes han mostrado que no solo los receptores clásicos están involucrados en la proliferación de la célula de Sertoli. Yang et al.⁷⁹ han demostrado que GPER desencadena la activación de la vía Src/PI3K/Akt que está involucrada en la proliferación de la célula de Sertoli inducida por E2 a través de la regulación de la expresión de la proteína 2 asociada a una quinaasa de fase S (Skp2).

En resumen, las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora nos han permitido llegar a la conclusión de que los estrógenos aumentan la proliferación de la célula de Sertoli a través de ER α y GPER. Por otro lado, al final del estadio proliferativo los estrógenos promueven el cese de la proliferación y la maduración celular a través de ER β .

Ácido retinoico

Por décadas ha sido reconocido que la señalización a través de la vitamina A es esencial para la reproducción masculina. La forma biológicamente activa de la vitamina A es el ácido retinoico (RA), que incluye RA todo trans (atRA) y el 9-cis-RA (9-cRA). El atRA es producido en el testículo y se demostró que la síntesis de atRA aumenta aproximadamente cinco veces en el momento de la transición al fenotipo no proliferativo de la célula de Sertoli y que a partir de entonces se mantiene casi constante⁸⁰.

Las acciones de RA son mediadas por receptores nucleares específicos, los llamados receptores de ácidos retinoicos (RAR), los cuales trabajan como factores de transcripción dependientes de ligando y forman heterodímeros con receptores de retinoides X (RXR). Existen tres subtipos importantes de ambos: α , β , γ . Particularmente, se ha observado que las células de Sertoli de roedor mitóticamente activas expresan RAR α y β y RXR α y γ ⁸¹.

La regulación de la mitosis de la célula de Sertoli por atRA fue evaluada en estudios *in vitro*. Se demostró que atRA inhibe la proliferación estimulada por FSH en cultivos de células de Sertoli inmaduras acompañándose de un incremento en la expresión de p21Cip1 y p27Kip1⁴⁶. Además, se evidenció que atRA inhibe la proliferación de la célula de Sertoli estimulada por activina A a través de una disminución de la expresión de ciclina E1 y un incremento en los niveles del inhibidor del ciclo celular p15INK4; a su vez, se acompaña de un aumento en la resistencia eléctrica trans-epitelial (TER), una medida de la integridad de las uniones estrechas, en conjunto con una re-

localización de las proteínas claudina 11 y Tjp1 en la membrana plasmática⁸². En conjunto, estas observaciones son consistentes con los roles anti-proliferativo e inductor de maduración de RA en células de Sertoli.

El papel de las proteínas RAR y RXR en la fisiología testicular fue analizado a través de la utilización de animales nulos. Aunque en estos estudios se analizaron minuciosamente las características de la población germinal, no se prestó especial atención a los cambios en la fisiología de la célula de Sertoli. Recién cuando se diseñaron modelos murinos nulos selectivos, se propuso un posible rol de RAR α en la regulación de la maduración de la célula de Sertoli. Ratones nulos para RAR α selectivo en células de Sertoli presentan deficiencias en la capacidad de esas células para sostener el desarrollo de células germinales⁸³. Además, la sobreexpresión de la forma dominante negativa del receptor RAR α (dn-PAR α) en las células de Sertoli conduce a una disrupción de la barrera hematotesticular en estadios específicos de los túbulos seminíferos⁸⁴. El rol de RA en el mantenimiento de la funcionalidad de la barrera hematotesticular fue respaldado por la observación de una disrupción parcial en las uniones estrechas en ratas deficientes en vitamina A y en ratones nulos para RAR α ^{85,86}.

En resumen, los resultados obtenidos hasta ahora son consistentes con el papel de RA en el cese de la proliferación y en la maduración de las células de Sertoli.

CONCLUSIÓN

El número final de células de Sertoli alcanzado durante los períodos proliferativos determina tanto el tamaño testicular como la capacidad de producción de espermatozoides en el individuo adulto. Este número final de células de Sertoli resulta de eventos durante la vida fetal, neonatal y peripuberal. Además, la maduración de las células de Sertoli, que implica la pérdida de la actividad proliferativa, la formación de uniones estrechas entre células de Sertoli y el establecimiento de la barrera hematotesticular, es necesaria para mantener la espermatogénesis. Por lo tanto, una orquesta perfectamente sincronizada que involucra hormonas, vías de transducción de señales y mecanismos moleculares que se conjugan para controlar la proliferación de células de Sertoli y para promover la adquisición de un fenotipo de célula de Sertoli maduro es determi-

nante para la fertilidad futura. Hemos tratado de resumir los conocimientos adquiridos sobre los mecanismos moleculares que controlan la proliferación y maduración de las células de Sertoli. Los temas tratados en esta revisión se resumen en la Figura 1.

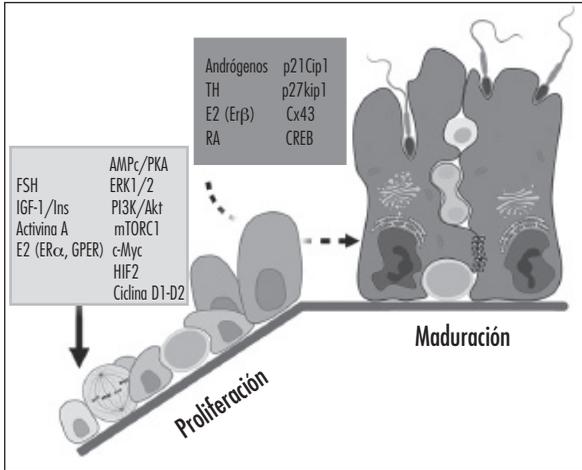


Figura 1. Representación esquemática de los principales reguladores de la proliferación y maduración de la célula de Sertoli. Las hormonas y factores paracrinos que estimulan la proliferación están representados en gris claro y aquellos que detienen la proliferación y/o promueven la maduración están representados en gris oscuro. Las señales de transducción y los posibles mecanismos involucrados están también incluidos en el esquema.

FSH: hormona foliculoestimulante; E2: 17 β -estradiol; ER α : receptor de estrógenos alfa; GPER: receptor de estrógenos acoplado a proteína G; IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina 1; Ins: insulina; PI3K: fosfatidil-inositol-3 quinasa; ERK1/2: proteínas quinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2; PKA: quinasa dependiente de AMPc; mTORC1: *mammalian target of rapamycin complex 1*; HIF2: factor inducible por hipoxia 2; TH: hormonas tiroideas; RA: ácido retinoico; ER β : receptor de estrógenos beta; Cx43: conexina 43; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc.

REFERENCIAS

- Orth JM, Gonsalves GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988;122:787-94.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769-84.
- Parvinen M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev* 1982;3:404-17.
- Heckert L, Griswold MD. Expression of the FSH receptor in the testis. *Recent Prog Horm Res* 1993;48:61-77.
- Griswold MD, Mably ER, Fritz IB. FSH stimulation of DNA synthesis in Sertoli cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1976;4:139-49.
- Orth JM. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 1984;115:1248-55.
- Singh J, Handelsman DJ. The effects of recombinant FSH on testosterone induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl* 1996;17:382-93.

- Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (HPG) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology* 2003;144:509-17.
- O'Shaughnessy PJ, Monteiro A, Abel M. Testicular development in mice lacking receptors for follicle stimulating hormone and androgen. *PLoS ONE* 2012;7:e35136.
- Means AR, Huckins C. Coupled events in the early biochemical actions of FSH on the Sertoli cells of the testis. *Curr Top Mol Endocrinol* 1974;1:145-65.
- Crepieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, et al. The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* 2001;20:4696-709.
- Musnier A, Heitzler D, Boulo T, Tesseraud S, Durand G, Lecureuil C, et al. Developmental regulation of p70 S6 kinase by a G protein-coupled receptor dynamically modeled in primary cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:3487-503.
- Riera MF, Regueira M, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorraga SB. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E914-023.
- Lim K, Hwang BD. Follicle-stimulating hormone transiently induces expression of protooncogene c-myc in primary Sertoli cell cultures of early pubertal and prepubertal rat. *Mol Cell Endocrinol* 1995;111:51-6.
- Gorga A, Rindone G, Regueira M, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB, et al. HIF involvement in the regulation of rat Sertoli cell proliferation by FSH. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;502:508-14.
- Villalpando I, Lira E, Medina G, Garcia-Garcia E, Echeverria O. Insulin like growth factor 1 is expressed in mouse developing testis and regulates somatic cell proliferation. *Exp Biol Med* 2008;233:419-26.
- Saez JM, Chatelain PG, Perrard-Sapori MH, Jaillard C, Naville D. Differentiating effects of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and insulin on Leydig and Sertoli cell functions. *Reprod Nutr Dev* 1988;28:989-1008.
- Griffeth RJ, Carretero J, Burks DJ. Insulin receptor substrate 2 is required for testicular development. *PLoS ONE* 2013;8:e62103.
- Yamamoto T, Nakayama Y, Abe SI. Mammalian follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) up-regulate IGF-I gene expression in organ culture of newt testis. *Mol Reprod Dev* 2001;60:56-64.
- Smith EP, Dickson BA, Chernausk SD. Insulin-like growth factor binding protein-3 secretion from cultured rat Sertoli cells: dual regulation by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 1990;127:2744-51.
- Pitetti JL, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, et al. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating Sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol* 2013;27:814-27.
- Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD, et al. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 2002;295:671-4.
- Cardoso LC, Nascimento AR, Royer C, Porto CS, Lazari MF. Locally produced relaxin may affect testis and vas deferens function in rats. *Reproduction* 2010;139:185-96.
- Nascimento AR, Pimenta MT, Lucas TF, Royer C, Porto CS, Lazari MF. Intracellular signaling pathways involved in the relaxin-induced proliferation of rat Sertoli cells. *Eur J Pharmacol* 2012;691:283-91.

25. Nascimento AR, Macheroni C, Lucas TF, Porto CS, Lazari MF. Crosstalk between FSH and relaxin at the end of the proliferative stage of rat Sertoli cells. *Reproduction* 2016;152:613-28.
26. Barton DE, Yang-Feng TL, Mason AJ, Seeburg PH, Francke U. Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of JSD mice. *Genomics* 1989;5:91-9.
27. Roberts V, Meunier H, Sawchenko PE, Vale W. Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 1989;125:2350-9.
28. De Winter JP, Vanderstichele HM, Verhoeven G, Timmerman MA, Wesseling JG, De Jong FH. Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. *Endocrinology* 1994;135:759-67.
29. Buzzard JJ, Farnworth PG, De Kretser DM, O'Connor AE, Wreford NG, Morrison JR. Proliferative phase Sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. *Endocrinology* 2003;144:474-83.
30. Archambeault DR, Yao HH. Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:10526-31.
31. Barakat B, O'Connor AE, Gold E, de Kretser DM, Loveland KL. Inhibin, activin, follistatin and FSH serum levels and testicular production are highly modulated during the first spermatogenic wave in mice. *Reproduction* 2008;136:345-59.
32. Fragale A, Puglisi R, Morena AR, Stefanini M, Boitani C. Age-dependent activin receptor expression pinpoints activin A as a physiological regulator of rat Sertoli cell proliferation. *Mol Hum Reprod* 2001;7:1107-14. doi: 10.1093/molehr/7.12.1107
33. Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 1995; 374:356-60.
34. Miles DC, Wakeling SI, Stringer JM, van den Bergen JA, Wilhelm D, Sinclair AH, et al. Signaling through the TGF beta-activin receptors ALK4/5/7 regulates testis formation and male germ cell development. *PLoS ONE* 2013;8:e54606.
35. Nicholls PK, Stanton PG, Chen JL, Olcorn JS, Haverfield JT, Qian H, et al. Activin signaling regulates Sertoli cell differentiation and function. *Endocrinology* 2012;153:6065-77.
36. Schrewe H, Gendron-Maguire M, Harbison ML, Gridley T. Mice homozygous for a null mutation of activin beta B are viable and fertile. *Mechan Dev* 1994;47:43-51.
37. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992;360:313-9.
38. Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8817-21.
39. Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 1994;135:1227-34.
40. Zhou Q, Shima JE, Nie R, Friel PJ, Griswold MD. Androgen-regulated transcripts in the neonatal mouse testis as determined through microarray analysis. *Biol Reprod* 2005;72:1010-9.
41. Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, et al. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* 2004;145:318-29.
42. Atanassova NN, Walker M, McKinnell C, Fisher JS, Sharpe RM. Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol* 2005;184:107-17.
43. Tan KA, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PT, et al. The role of androgens in Sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 2005;146:2674-83.
44. Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, et al. Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17718-23.
45. Hazra R, Corcoran L, Robson M, McTavish KJ, Upton D, Handelsman DJ, et al. Temporal role of Sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Mol Endocrinol* 2013;27:12-24.
46. Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology* 2003;144:3722-31.
47. Bulldan A, Dietze R, Shihan M, Scheiner-Bobis G. Non-classical testosterone signaling mediated through ZIP9 stimulates claudin expression and tight junction formation in Sertoli cells. *Cell Signal* 2016;28:1075-85.
48. Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* 2002;12:441-6.
49. Wrutniak C, Cassar-Malek I, Marchal S, Rasclé A, Heusser S, Keller JM, et al. A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J Biol Chem* 1995;270:16347-54.
50. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 2005;146:2864-71.
51. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 2000;62:664-9.
52. Palmero S, Trucchi P, Prati M, Fugassa E, Lanni A, Goglia F. Effect of thyroid status on the oxidative capacity of Sertoli cells isolated from immature rat testis. *Eur J Endocrinol* 1994;130:308-12.
53. Zanatta AP, Zanatta L, Goncalves R, Zamoner A, Silva FR. Rapid responses to reverse T(3) hormone in immature rat Sertoli cells: calcium uptake and exocytosis mediated by integrin. *PLoS ONE* 2013;8:e77176.
54. Cooke PS, Meisami E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology* 1991;129:237-43.
55. Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis and increase serum inhibin levels. *Endocrinology* 1993;133:755-60.
56. Cooke PS, Zhao YD, Bunick D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod* 1994;51:1000-5.
57. Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *J Endocrinol* 1998;156:43-50.
58. Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. Thyroid hormone and follicle stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting

- substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology* 1998;139:4489-95.
59. Holsberger DR, Kiesewetter SE, Cooke PS. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biol Reprod* 2005;73:396-403.
 60. Fumel B, Guerin MJ, Livera G, Staub C, Magistrini M, Gauthier C, et al. Thyroid hormone limits postnatal Sertoli cell proliferation in vivo by activation of its alpha1 isoform receptor (TRalpha1) present in these cells and by regulation of Cdk4/JunD/c-myc mRNA levels in mice. *Biol Reprod* 2012;87(16):1-9.
 61. Fumel B, Roy S, Fouchecourt S, Livera G, Parent AS, Casas F, et al. Depletion of the p43 mitochondrial T3 receptor increases Sertoli cell proliferation in mice. *PLoS ONE* 2013;8:e74015.
 62. Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D, et al. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol* 2006;209:153-61.
 63. Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, et al. Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod* 2007;76:804-12.
 64. Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H, Cooke PS. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 2003;144:3732-8.
 65. Sun Y, Yang W, Luo H, Wang X, Chen Z, Zhang J, et al. Thyroid hormone inhibits the proliferation of piglet Sertoli cell via PI3K signaling pathway. *Theriogenology* 2015;83:86-94.
 66. Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Rev* 2009;30:343-75.
 67. Tsai-Morris CH, Aquilano DR, Dufau ML. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 1985;116:38-46.
 68. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:477-82.
 69. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9063-8.
 70. Li L, Hisamoto K, Kim KH, Haynes MP, Bauer PM, Sanjay A, et al. Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16468-73.
 71. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Pezzi V. GPER Signaling in Spermatogenesis and Testicular Tumors. *Front Endocrinol* 2014;5:30.
 72. Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol* 1997;153:485-95.
 73. Van Pelt AM, De Rooij DG, Van der Burg B, Van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GG. Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. *Endocrinology* 1999;140:478-83.
 74. Lucas TFG, Lazari MFM, Porto CS. Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. *Mol Cell Endocrinol* 2014;82:84-96.
 75. Lucas TF, Royer C, Siu ER, Lazari MF, Porto CS. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 2010;83:307-17.
 76. Atanassova N, McKinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M, et al. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 1999;140:5364-73.
 77. Berger T, Kentfield L, Roser JF, Conley A. Stimulation of Sertoli cell proliferation: defining the response interval to an inhibitor of estrogen synthesis in the boar. *Reproduction* 2012;143:523-9.
 78. Berger T, Conley AJ, Van Klompenberg M, Roser JF, Hovey RC. Increased testicular Sertoli cell population induced by an estrogen receptor antagonist. *Mol Cell Endocrinol* 2013;366:53-8.
 79. Yang WR, Zhu FW, Zhang JJ, Wang Y, Zhang JH, Lu C, et al. PI3K/Akt activated by GPR30 and Src regulates 17beta-estradiol-induced cultured immature boar Sertoli cells proliferation. *Reprod Sci* 2017;24:57-66.
 80. Cavazzini D, Galdieri M, Ottonello S. Retinoic acid synthesis in the somatic cells of rat seminiferous tubules. *Biochim Biophys Acta* 1996;313:139-45.
 81. Boulogne B, Levacher C, Durand P, Habert R. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: immunolocalization and implication in the control of the number of gonocytes. *Biol Reprod* 1999;61:1548-57.
 82. Nicholls PK, Harrison CA, Rainczuk KE, Wayne Vogl A, Stanton PG. Retinoic acid promotes Sertoli cell differentiation and antagonises activin-induced proliferation. *Mol Cell Endocrinol* 2013;377:33-43.
 83. Vernet N, Dennefeld C, Guillou F, Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M. Prepubertal testis development relies on retinoic acid but not retinoid receptors in Sertoli cells. *EMBO J* 2006;25:5816-25.
 84. Hasegawa K, Saga Y. Retinoic acid signaling in Sertoli cells regulates organization of the blood-testis barrier through cyclical changes in gene expression. *Development* 2012;139:4347-55.
 85. Morales A, Cavicchia JC. Spermatogenesis and blood-testis barrier in rats after long-term Vitamin A deprivation. *Tissue Cell* 2002;34:349-55.
 86. Chung SS, Choi C, Wang X, Hallock L, Wolgemuth DJ. Aberrant distribution of junctional complex components in retinoic acid receptor alpha-deficient mice. *Microscopy Res Tech* 2010;73:583-96.