

Artículo de Revisión/Review Article

# IMPORTANCIA DE LOS ESTRÓGENOS EN EL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO EN MAMÍFEROS.

## IMPORTANCE OF ESTROGENS IN THE MAMMALIAN MALE REPRODUCTIVE SYSTEM.

María Genoveva González-Morán

Facultad de Ciencias, Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal, Departamento de Biología Comparada, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510, México. La correspondencia debe dirigirse a (Correspondence should be addressed to): e-mail: bita@live.com.mx

### RESUMEN

El testículo es capaz de sintetizar y responder a los estrógenos a través de su desarrollo, la localización de la aromatasa, receptor a estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) y receptor a estrógeno beta ( $ER\beta$ ) sugiere que la acción de los estrógenos es importante para la función testicular y de los conductos eferentes. Los estudios realizados en ratones transgénicos deficientes en receptores a estrógenos o de la enzima aromatasa han demostrado que los estrógenos tienen un papel crucial en el desarrollo y función normal de los testículos, del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, en la espermatogénesis y en la fertilidad del macho, destacando la importancia de la acción del estrógeno en el macho. Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es analizar la distribución de ambos receptores a estrógenos ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ), y de la aromatasa en testículo, conductos eferentes y epidídimo en mamíferos en varias etapas de desarrollo, como también comparar las alteraciones de la función testicular y perfil endócrino en ratones transgénico deficientes en la aromatasa, receptor a estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ), receptor a estrógeno beta ( $ER\beta$ ) y en ambos receptores ( $ER\alpha\beta$ ). Esta revisión también proporciona una visión general de la biosíntesis y acción de los estrógenos en el testículo, estructura de los receptores a estrógenos y la función de los estrógenos en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Toda esta información muestra que los estrógenos son importantes en la regulación fisiológica del aparato reproductor del macho.

**Palabras clave:** Estrógeno, receptores a estrógenos, aromatasa, testículo, mamíferos.  
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2017) 2(2):38-51

### ABSTRACT

The testis is able to synthesize and respond to estrogens throughout their development. The localization of aromatase and estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ ) and estrogen receptor beta ( $ER\beta$ ) suggest that estrogen action is likely to be important for testicular and efferent ductules function. The studies of transgenic mice lacking estrogen receptors (ERs) or the aromatase enzyme demonstrated that the estrogen plays a crucial role in the development and normal function of the testis, the hypothalamic-pituitary-testis-axis, spermatogenesis and male fertility, highlight the importance of estrogen action in male. Therefore, the aim of this review is to analyze the distribution of both estrogen receptors ( $ER\alpha$  and  $ER\beta$ ), and aromatase in testis, efferent ductules and epididymis in mammalian in various stages of development, and also compare the alterations of testicular function and endocrine profile in transgenic mice deficient in aromatase, estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ ), estrogen receptor beta ( $ER\beta$ ) and in both estrogen receptors ( $ER\alpha\beta$ ). This review will also provide an overview of the biosynthesis and action of estrogen in the testis, structure of estrogen receptors, and the role of estrogen in the regulation of hypothalamic-pituitary-testicular axis. All this information clearly show that estrogens play a physiological role in the regulation of male reproductive tract.

**Keywords:** estrogen, estrogen receptors, aromatase, testis, mammalian.  
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2017) 2(2):38-51

Received/Recibido: 07/03/2017; Accepted/Aceptado: 10/04/2107

Copyright: © 2017 González-Morán M. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la [Licencia Creative Commons Attribution](#), la cual permite el uso irrestricto, la distribución y reproducción en cualquier medio, dando el crédito correspondiente al autor y la fuente original / This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited



## INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo, los estrógenos fueron considerados específicamente como hormonas femeninas, sin embargo, también cumplen funciones esenciales en la fisiología reproductiva en machos (Sharpe, 1997, 1998; Hess et al., 2001ab; Schulster et al., 2016). Los efectos biológicos predominantes de los estrógenos están mediados a través de dos receptores intracelulares, el receptor a estrógenos alfa (RE $\alpha$ ) y el receptor a estrógenos beta (RE $\beta$ ), cada uno de ellos codificado por un gen independiente, pero ambos con el dominio funcional característico de la superfamilia de los receptores nucleares (Gruber et al., 2002). La biosíntesis de estrógenos esta catalizada por un miembro de la superfamilia de citocromos P450, denominada citocromo P450 aromatasa, la cual está altamente conservada en todos los vertebrados y especialmente en mamíferos (Simpson et al., 1994).

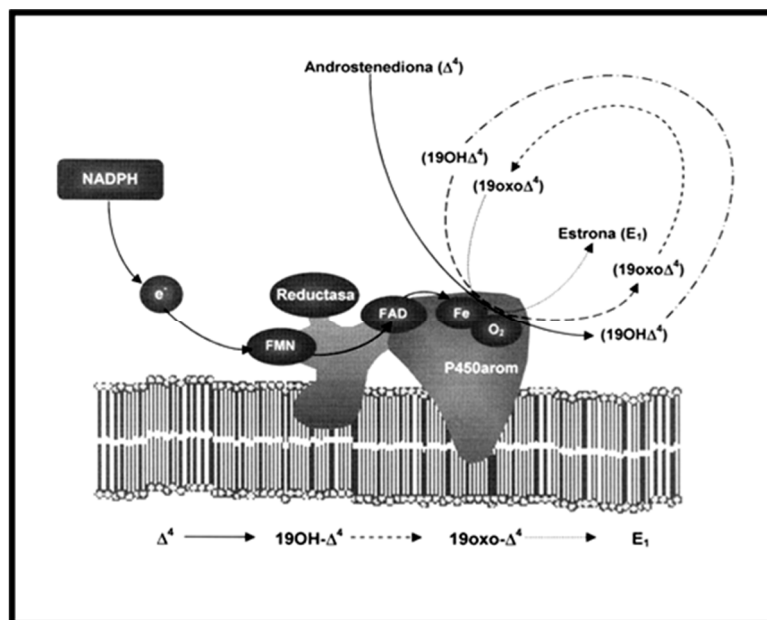
Se ha demostrado que la aromatasa y los receptores a estrógenos se expresan en el aparato reproductor del macho, implicando que la biosíntesis de los estrógenos ocurre en este sitio y que tanto los estrógenos como sus receptores se producen localmente (Gruber et al., 2002; Zhou et al., 2002; Carreau & Levallet, 2000; Carreau et al., 2003, 2006), apoyando que las estructuras reproductivas responden a los estrógenos (O'Donnell et al., 2001). El análisis de fenotipos testiculares en ratones Knockout o transgénicos deficientes en la aromatasa o receptores a estrógenos (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Enmark et al., 1997; Hess et al., 1997a; Saunders et al., 1997; Tremblay et al., 1997; Honda et al., 1998; Toda et al., 2001; Hamilton et al., 2014) han contribuido a mostrar evidencias contundentes de que los estrógenos son necesarios para la fertilidad del macho.

## BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES TESTICULARES Y MECANISMO DE ACCIÓN

El testículo de los mamíferos es un órgano complejo que lleva a cabo dos funciones importantes: la síntesis de esteroides y la producción de espermatozoides que son controladas por gonadotropinas y numerosos factores sintetizados localmente (Saez, 1994) y entre ellos los estrógenos (Carreau et al., 1999). La función de los estrógenos en la fisiología del tracto reproductor del macho ha estado en debate por largo tiempo. En 1934, se descubrió la hormona estrogénica en la orina del caballo (Zondek, 1934) y 30 años más tarde varias publicaciones proveen evidencias que los testículos son capaces de sintetizar y secretar estrógenos (Hess, 2003; Carreau & Hess, 2010).

El paso que generalmente se acepta como el limitante en la velocidad de la síntesis de los esteroides es la ruptura del enlace covalente entre las posiciones C20 y C22 del colesterol, resultando en un compuesto de 21 átomos de carbono llamado pregnenolona y liberando aldehído isocaproico, el sistema enzimático que cataliza esta reacción está localizado en la membrana interna de la mitocondria. La pregnenolona es un precursor común a todas las clases de esteroides, puede transformarse en dos compuestos por dos diferentes vías de biosíntesis. La pregnenolona puede convertirse a progesterona mediante una reacción catalizada por la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa,  $\Delta$ 5-4 isomerasa (3 $\beta$ -HSD) un complejo enzimático cuya actividad se localiza en los microsomas. De manera similar, pero con diferentes enzimas, se realiza la transformación de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona en 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y androstenediona, respectivamente. La síntesis de andrógenos es una reacción catalizada por el complejo enzimático C17-C20 liasa, un componente de la membrana del retículo endoplasmático liso. Si la pregnenolona se utiliza como sustrato, el producto resultante será la dehidroepiandrosterona, en tanto, que si el sustrato es progesterona el producto será la androstenediona. Estas dos vías alternas son la  $\Delta$ 5 o  $\Delta$ 4.

La androstenediona y la testosterona son convertidas en estrona y 17 $\beta$ -estradiol, respectivamente, mediante la actividad de la aromatasa, un complejo enzimático localizado en las membranas del retículo endoplasmático liso de varios tipos celulares de las gónadas (Conley & Hinshelwood, 2001; Lambard et al., 2005). El complejo catalíticamente activo está compuesto por una aromatasa citocromo P450 (P450 arom), que se une al sustrato, y acoplado a ella una flavoproteína, la adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-citocromo P450 reductasa (reductasa), que facilita el flujo de electrones necesarios para la oxidación del sustrato (Simpson et al., 1994). El citocromo P450 aromatasa está altamente conservado en todos los vertebrados y especialmente en mamíferos. El gen que codifica para esta proteína es el CYP19 y dependiendo del tejido y especie, la aromatasa posee entre 490 y 525 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente de 55000 daltons (Conley & Hinshelwood, 2001; Porter, 1991), ver Figura 1.



**Figura. 1.** Diagrama esquemático del anclaje del complejo citocromo P450 aromatasa y NADPH-citocromo P450 oxido-reductasa a la membrana del retículo endoplasmático liso. Se señalan los grupos prostéticos: Flavin adenina dinucleótido (FAD) de la aromatasa y Flavin mononucleótido (FMN) de la reductasa, los electrones ( $e^-$ ) procedentes de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) reducida, así como el hierro (Fe) y el oxígeno. (Tomado de Conley & Hinshelwood, 2001).

Las hormonas esteroides, una vez que se sintetizan se secretan a la circulación general o al sistema linfático para ser transportadas y posteriormente captadas de manera específica por sus respectivos órganos blanco. Cuando se liberan hacia la circulación, los esteroides gonadales se fijan a proteínas plasmáticas. El primer hecho lo constituye el paso del esteroide en su forma libre (desprovisto de su proteína transportadora) al interior de la célula. Como las hormonas esteroides son liposolubles, son capaces de difundir dentro y fuera de las células atravesando la membrana celular con relativa facilidad (Kraus et al., 1995; Nilsson et al., 2001). Debido a ello, la mayor parte de los efectos de los estrógenos en sus órganos blanco se deben a la cadena de eventos celulares conocida como “señalización estrogénica” la cual es una vía de transducción celular que inicia con la activación de los receptores a estrógeno (Nilsson et al., 2001; Tsai & O’Malley, 1994).

Estos receptores son factores de transcripción que se clasifican dentro de la clase II de la familia de receptores nucleares a hormonas esteroides (Aranda & Pascual, 2001; Nilsson et al., 2001). En ausencia del ligando, los receptores a estrógenos permanecen inactivos, ya que se encuentran unidos a proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins), quienes los mantienen en una conformación que oculta los péptidos señal de localización nuclear (SLN). La unión del receptor con la hormona correspondiente provoca cambios de conformación separando las proteínas de choque térmico, liberando señales de localización nuclear, permitiendo su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, el complejo hormona receptor se une a secuencias específicas de DNA, que se denominan elementos de respuesta a la hormona o HRE (hormone response element) (Sabbah et al., 1996; Paech et al., 1997; Gruber et al., 2004). Cuando los receptores nucleares se unen HRE reclutan un gran número de proteínas o correguladores transcripcionales: coactivadores o correpresores, que facilitan o inhiben la transcripción de los genes blanco (McKenna, 1999; Klinge, 2000).

## RECEPTORES A ESTRÓGENOS

En 1958, se descubrió que las acciones de los estrógenos requerían de la activación de un receptor intracelular, cuya composición y estructura fueron determinadas en 1986 (Green et al., 1986). El primer receptor a estrógenos fue identificado en 1962 describiendo la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas. Cuatro años más tarde, Toft & Gorski, 1966, aislaron por primera vez receptores de estrógeno del útero de ratas, en una época se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo RE, sin embargo, en 1996 fue descubierto otro receptor por lo que se decidió denominarlos RE- $\beta$  al recientemente descubierto y RE- $\alpha$  al previamente conocido. El RE- $\alpha$  es codificado por el gen ES1 situado en el cromosoma 6 y es expresado mayoritariamente en endometrio, células de cáncer de mama,

células del estroma ovárico, hipotálamo e hipófisis (Ascenzi et al., 2006). El RE- $\beta$  está codificado por el gen ESR2 del cromosoma 14 expresado mayoritariamente en riñones, cerebro, hueso, corazón, pulmones, mucosa intestinal, próstata y células del endotelio (Kuiper et al., 1996, 1997). La principal función de los receptores a estrógeno es la de actuar como factores de transcripción uniéndose al DNA con el fin de regular la expresión génica (Tsai & O'Malley, 1994; Harris, 2007; Koehler et al., 2005).

Los RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  tienen funciones específicas, incluso algunas veces contrarias en los diferentes tejidos, por tanto, no representan dos isoformas redundantes del mismo receptor, sino dos diferentes herramientas para señalización estrogénica, con propiedades funcionales específicas (Dumasiak et al., 2015). El RE- $\alpha$  tiene una afinidad 5 veces mayor por el estradiol que los RE- $\beta$  in vitro, ambos receptores forman heterodímeros uno con otro y el RE- $\beta$  disminuye la sensibilidad del RE- $\alpha$  a estrógeno, actuando como un regulador fisiológico de los efectos proliferativos del RE- $\alpha$ . Se ha identificado que los dos receptores de estrógenos RE- $\alpha$  y RE- $\beta$ , están formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos respectivamente y ambos receptores a estrógenos exhiben la organización característica de los receptores nucleares conformados por seis dominios denotados de la A a la F y codificados por 8-9 exones (Figura 2).

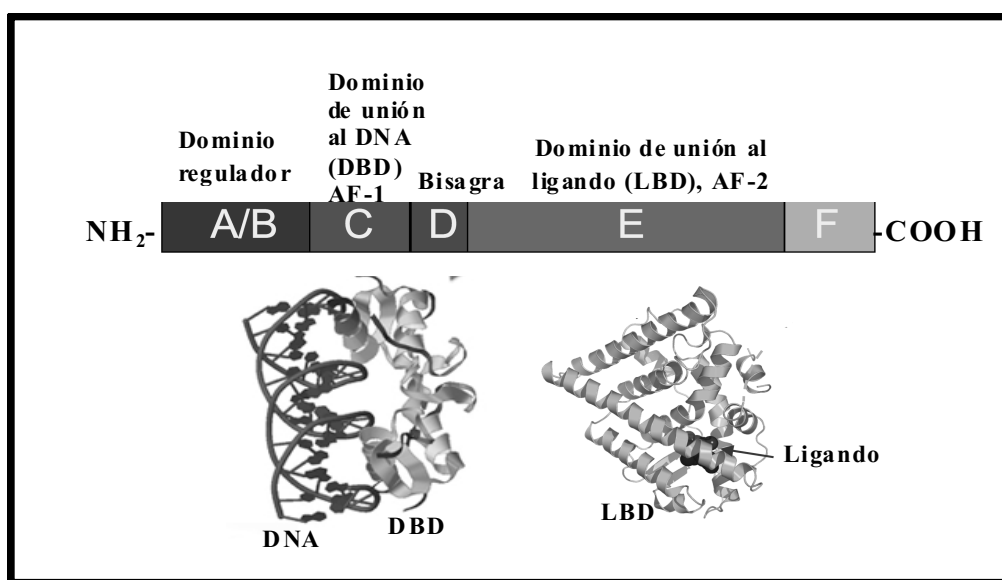


Figura. 2.- Estructura del receptor a estrógenos.

El **dominio A/B** localizado en el lado amino terminal de la proteína es la región menos conservada entre los distintos receptores, posee una función de activación de la transcripción génica "AF-1" y varios sitios de fosforilación que son importantes en el proceso de activación de la proteína (Mangelsdorf et al., 1995; Kumar y Thompson 1999). La región de unión al DNA (DBD) o **dominio C**, está compuesta por nueve residuos de cisteínas de los cuales, ocho están ordenados alrededor de dos iones de  $Zn^{2+}$  para formar dos "Dedos de Zinc" que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al DNA (Mangelsdorf et al., 1995; Kumar & Thompson 1999).

El **dominio D** o región de bisagra, poco caracterizada, participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico hsp90 (heat shock protein 90) que permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo, en este dominio se localiza la señal de localización nuclear. En el extremo carboxilo terminal se encuentra la **región E/F** o dominio de unión al ligando (LBD), donde se une y reconoce la hormona 17 $\beta$ - estradiol (E2) y a ligandos sintéticos, que pueden ser antagonistas totales o SERMs (Moduladores Selectivos del RE), activando o inhibiendo al receptor dependiendo del contexto celular y del promotor. El LBD al interactuar con E2 activa al receptor promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen la localización nuclear, la activación de AF-2 (dependiente de ligando) para promover una interacción con coactivadores transcripcionales, por otra parte, opera en regiones de homodimerización. La formación de dímeros puede ser en homodímeros del tipo RE- $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ ) o RE- $\beta$  ( $\beta\beta$ ), o heterodímeros del tipo RE- $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ ) (Kumar & Thompson, 1999). Se han descrito hasta 3 isoformas del RE- $\alpha$  y 5 del RE- $\beta$ . Ambos subtipos de receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) pueden mediar la transcripción genética por 2 vías distintas: 1) Interactuando con secuencias de nucleótidos específicas (repetidas como palíndromo) denominadas elementos de reacción estrogénicas

(ERE), lo que permite la hipo o hiperregulación de la transcripción de genes regulados por hormonas o 2) Por la activación de la vía AFI, importante factor de transcripción nuclear involucrado en la inducción de respuesta de factores de crecimiento (Klinge, 2000).

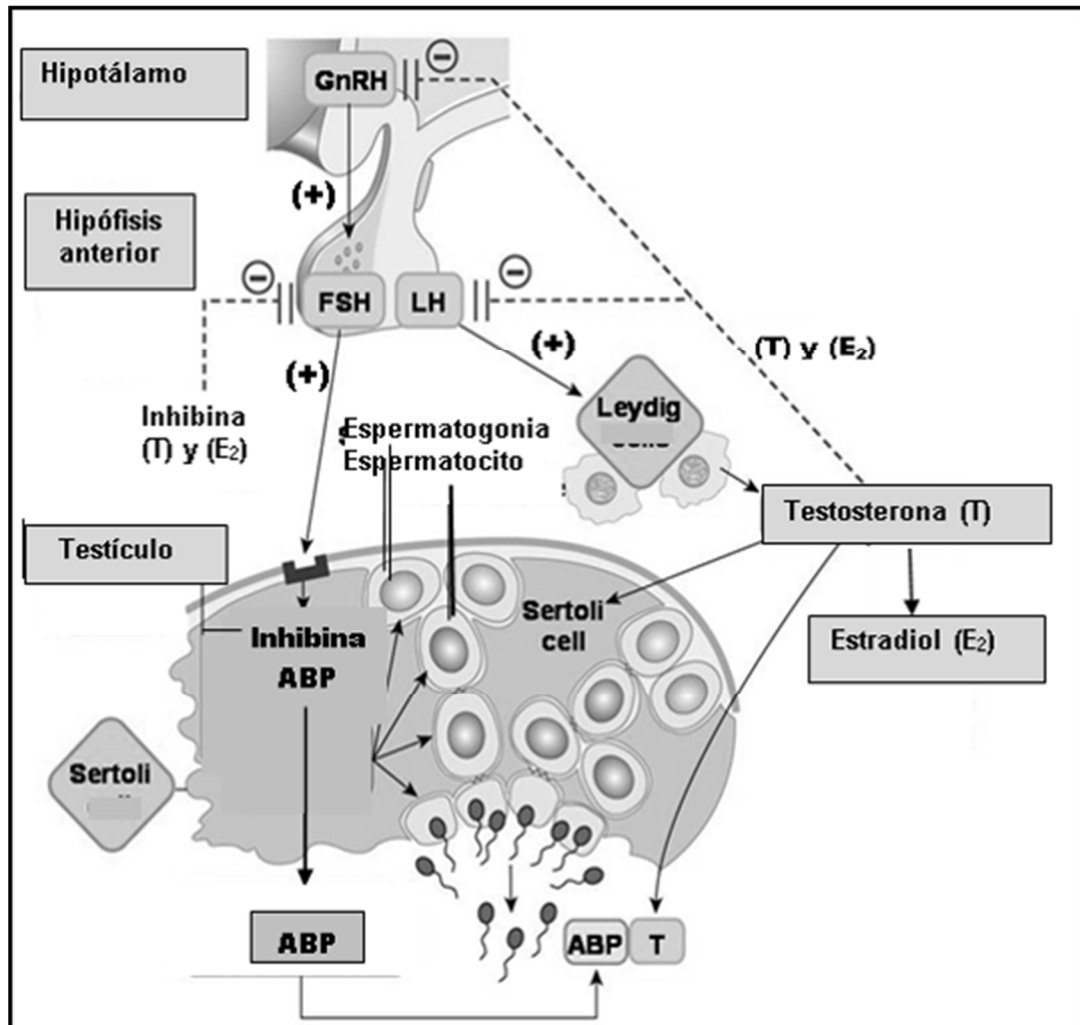
## REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN TESTICULAR

Los testículos poseen dos compartimentos importantes separados estructuralmente, que tienen funciones diferentes: 1-. El compartimento tubular, formado por los túbulos seminíferos, que albergan a las células de Sertoli y a las células germinales en maduración encargadas de la producción de espermatozoides. Las células de Sertoli son indispensables para la espermatogénesis, su función es la de proveer a las células germinales de un soporte físico y de un ambiente bioquímico óptimo para su maduración (Griswold, 1998). 2-. El compartimento intersticial, que contiene a las células de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos, que rodea a los túbulos seminíferos. La principal función de las células de Leydig es la producción de testosterona. Estas células también poseen la maquinaria enzimática para la conversión o aromatización de los andrógenos a estrógenos (Haider, 2004). Ambos componentes testiculares guardan estrecha relación, la función testicular no es autónoma, sino que está controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

Ya hemos mencionado la acción directa de los estrógenos en el testículo, pero también es importante tener en cuenta que la regulación de los estrógenos puede llevarse a cabo indirectamente por cambios causados en el hipotálamo e hipófisis. Esto es debido a que los esteroides testiculares actúan en el hipotálamo afectando los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y en hipófisis en los niveles de secreción de las gonadotropinas (LH y FSH). Siendo estas gonadotropinas las hormonas primarias que regulan la función testicular. Hay evidencias que demuestran que los  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  están presentes en varios núcleos hipotalámicos y en los gonotropos de la hipófisis, lo que indica que los estrógenos regulan el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Shughrue et al., 1997, 1998).

El hipotálamo sintetiza un decapeptido, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y lo secreta de una manera pulsátil a la sangre de la red porta hipotálamo-hipófisis. La GnRH secretada se une a un receptor membranal de los gonadotropos de la hipófisis anterior. En estas células la GnRH regula la síntesis y secreción de las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Conn et al., 1995). La secreción de la GnRH y su ritmo son modulados por numerosos neurotransmisores, la GnRH es liberada por el hipotálamo de forma pulsátil, este tipo de liberación resulta esencial para el efecto estimulador de la secreción de gonadotropinas. La amplitud y la frecuencia de los pulsos de GnRH condicionan los niveles de FSH y LH segregados por la adenohipófisis y a su vez, la función testicular (Knobil, 1990).

Las hormonas hipofisarias estimulan las funciones testiculares: exocrina y endocrina. Debido al proceso de retroalimentación negativa, las hormonas producidas por el testículo ejercen efectos inhibidores sobre la secreción de la FSH y la LH. La FSH se une a receptores específicos de las células de Sertoli, localizadas en los túbulos seminíferos del testículo, en los cuales se promueve la bioconversión de testosterona a estrógenos, la síntesis de inhibina, y la producción de la proteína fijadora de andrógenos (ABP: androgen binding protein) que es necesaria para mantener una concentración adecuada de testosterona en el epitelio seminífero. La ABP se segrega a la luz de los túbulos seminíferos y transporta la testosterona necesaria para completar el proceso de la espermatogénesis. La inhibina es considerada un supresor selectivo de la síntesis y secreción de la FSH (De Kretser et al., 2000). En presencia de una dotación de células espermatogénicas en el epitelio seminífero, la inhibina se va liberando de modo continuo y actúa sobre la hipófisis para suprimir la producción de FSH. También se conoce que la propia testosterona y el estradiol son capaces de reducir los niveles séricos de la FSH (Plant et al., 2001). La LH, por su parte, tiene sus células blanco en las células de Leydig localizadas en el intersticio testicular, donde regula las concentraciones local y sistemática de andrógenos. Los niveles disponibles de esta hormona determinarán la cantidad secretada de testosterona. Pero a su vez, los niveles de estradiol y de la testosterona regulan, por mecanismos de retrocontrol negativo, la síntesis de LH. Pero también, a la inversa, una concentración baja de testosterona permite al hipotálamo aumentar la secreción de GnRH, y esta estimula la liberación de FSH y LH, con ello, aumentar la testosterona. La función principal de las células de Leydig es la producción de testosterona, pero también posee la maquinaria enzimática necesaria para la aromatización de los andrógenos a estrógenos. El estradiol, en concentraciones fisiológicas, también disminuye la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH. Con estas observaciones se demuestra que la regulación de los estrógenos en la función testicular está también mediada, indirectamente por cambios que ocurren en el hipotálamo e hipófisis (Figura 3).



**Figura 3.-** Eje hipotálamo-hipófisis-testículo. GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas); LH (hormona luteinizante); FSH (hormona foliculo estimulante); T (testosterona); ABP (proteína ligadora de andrógenos); E<sub>2</sub> (estradiol); ⊖ (retrocontrol negativo); ⊕ (retrocontrol positivo).

## LOCALIZACIÓN DE AROMATASA Y RECEPTORES A ESTRÓGENOS EN CÉLULAS TESTICULARES DE MAMÍFEROS.

La aromatasa y los receptores a estrógenos se han encontrado en todas las etapas del desarrollo testicular en los roedores (Hughes et al., 1999; Gustafson & Donahoe, 1994). Varios estudios de inmunohistoquímica usando anticuerpos que reconocen el RE $\alpha$  han demostrado que esta proteína está presente en la gónada indiferenciada del ratón (Nielsen et al., 2000), sugiriendo que los estrógenos pueden tener un papel en el proceso de diferenciación temprana. Las células de Leydig en el testículo fetal de roedores presentan RE $\alpha$  hasta el nacimiento (Fisher et al., 1997; Greco et al., 1992; Saunders et al., 1998; Jefferson et al., 2000; Sar & Wesch, 2000). En realidad, los receptores a estrógenos se expresan en las células de Leydig en una etapa de desarrollo cuando los receptores a andrógenos aún no se han expresado (Majdic et al., 1995; Fisher et al., 1997). Aunque existe controversia si el RE $\alpha$  está presente dentro de los túbulos seminíferos del testículo fetal (Greco et al., 1992). Los RE $\alpha$  también están presentes durante el desarrollo de los conductos eferentes y epidídimo (Fisher et al., 1997; Greco et al., 1992; Nielsen et al., 2000).

Hay evidencias de que tanto la proteína como el ARNm del RE $\beta$  se encuentra tempranamente desde los 16 días de gestación hasta el nacimiento en los gonocitos, células de Sertoli y de Leydig (van Pelt et al., 1999; Jefferson et al., 2000; Sar & Welsch, 2000), siendo los gonocitos los que

expresan en mayor abundancia los RE $\beta$  que los demás tipos celulares del testículo, posiblemente RE $\beta$  influye en la maduración de los gonocitos (Saunders et al., 1998; van Pelt et al., 1999). En rata el RE $\beta$  también está presente en los conductos asociados (Fisher et al., 1997; Sar & Welsch, 2000).

El testículo fetal de rata también presenta actividad de la aromatasa desde el día 19 (Weniger & Zeis, 1987; Weniger, 1990, 1993), los tipos celulares responsables son las células de Sertoli (Weniger y Zeis, 1988) y las células de Leydig (Tsai-Morris et al., 1986). Estas evidencias demuestran que las células testiculares fetales de roedores sintetizan estrógenos y expresan ambos receptores a estrógenos lo que sugiere un papel de los estrógenos en el desarrollo fetal del aparato reproductor del macho y diferenciación de los gonocitos.

Al nacimiento los testículos inmaduros de roedores continúan expresando ambas isoformas de RE y la aromatasa. La mayoría de los reportes sugieren que el RE $\beta$  se localiza antes que el RE $\alpha$  en el epitelio seminífero tanto en células de Sertoli y células germinales en desarrollo (Saunders et al., 1997, 1998; van Pelt et al., 1999; Jefferson et al., 2000). En roedores la proteína del RE $\alpha$  también se encuentra en el rete testis (Fisher et al., 1997), conductos eferentes (Fisher et al., 1997; Nielsen et al., 2000) y en el epidídimo (Fisher et al., 1997; Nielsen et al., 2000; Sar & Welsch, 2000), donde se han expresado desde el desarrollo fetal. El RE $\alpha$  se expresa en niveles más altos en los conductos eferentes que en la cauda del epidídimo (Fisher et al., 1997; Nielsen et al., 2000). El RE $\beta$  también se encuentra en el epidídimo durante el desarrollo (Jefferson et al., 2000; Sar & Welsch, 2000; Atanassova et al., 2001).

En esta etapa de desarrollo, la actividad de la aromatasa se encuentra en células inmaduras de Leydig y de Sertoli (Rommerts et al., 1982; Tsai-Morris et al., 1985; Papadopoulos et al., 1986) y no se ha detectado la aromatasa en células germinales (Kurosumi et al., 1985). Durante los días 10-26 en la rata inmadura, las células de Leydig y de Sertoli se dividen y sufren una maduración funcional. Otra vez, el RE $\alpha$  está ausente del epitelio seminífero y solo se expresa el RE $\beta$  en el epitelio de roedores en etapa inmadura. En rata el RE $\beta$  está presente en niveles muy bajos en espermatogonias y células de Sertoli inmaduras, en el día 21 el RE $\beta$  se expresa abundantemente en espermatoцитos en paquiteno pero no en ninguna otra célula germinal a esta edad (Saunders et al., 1998; van Pelt et al., 1999). Para el día 12 en el ratón, RE $\beta$  está también específicamente localizado en espermatoцитos, sin embargo, su expresión decrece y no es detectable para el día 26 (Jefferson et al., 2000). De nuevo, las células de Leydig de ratón y rata expresan RE $\alpha$  en este tiempo (Fisher et al., 1997; Saunders et al., 1998; Jefferson et al., 2000; Sar & Welsch, 2000). Durante el periodo neonatal y puberal de desarrollo los RE $\alpha$  abundan en el rete testis y conductos eferentes (Fisher et al., 1997; Atanassova et al., 2001) y están presentes en el epidídimo del ratón (Jefferson et al., 2000). El RE $\beta$  está también presente en esta edad (Jefferson et al., 2000; Atanassova et al., 2001).

En el testículo adulto varias evidencias indican que los RE $\alpha$  se expresan en las células de Leydig en ratas y ratones, sin embargo, su localización en células de Leydig de primates y humanos es muy controversial (West & Brenner, 1990; Fisher et al., 1997; Pelletier & El-Alfy, 2000; Saunders et al., 2001). En el ratón adulto RE $\beta$  se expresa en células de Leydig (Rosenfeld et al., 1998), pero no en el caso de la rata adulta (van Pelt et al., 1999; Pelletier et al., 2000), la localización del RE $\beta$  en células de Leydig en primates y humanos es también controversial (Pelletier et al., 1999; Taylor & Al-Azawi, 2000; Saunders et al., 2001).

En la edad adulta, las células de Leydig de los roedores expresan niveles muy altos de la aromatasa, la cual es estimulada por LH y esteroides (Valladares & Payne, 1979; Kurosumi et al., 1985; Tsai-Morris et al., 1985; Carreau et al., 1999; Janulis et al., 1998; Levallet et al., 1998; Genissel et al., 2001). La actividad de la aromatasa es más alta en el adulto que en la etapa puberal y es más alta en las células de Leydig del adulto que en las células de Sertoli (Levallet et al., 1998). Se ha demostrado también la presencia de la aromatasa en células de Leydig de primates y humanos (Carreau et al., 1999).

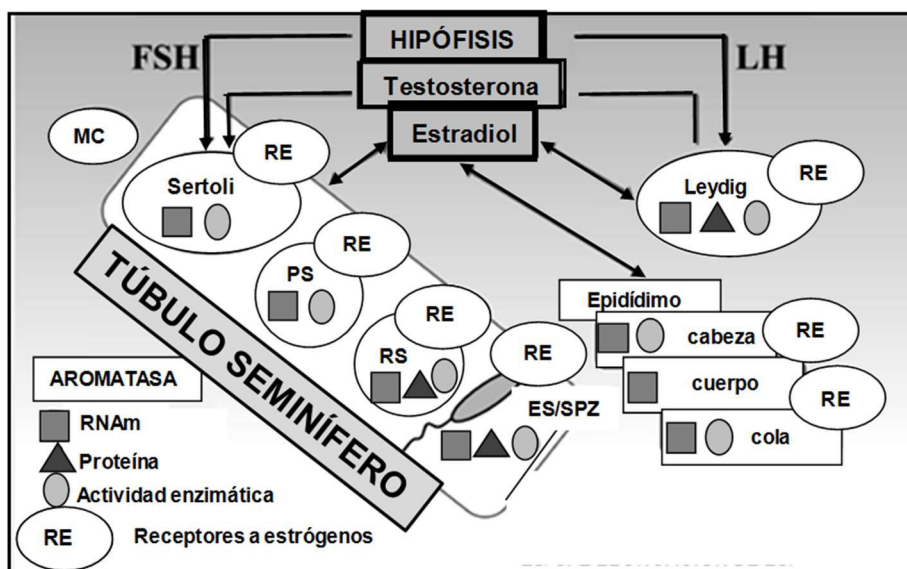
En rata las células de Sertoli expresan el RE $\beta$  desde la etapa fetal hasta la adulta, en contraste no hay reportes de RE $\beta$  en células de Sertoli en ratón. En primates y humanos las células de Sertoli contienen RE $\beta$  (Pelletier & El-Alfy, 2000; Taylor & Al-Azawi, 2000; Saunders et al., 2001) pero no RE $\alpha$  (Fisher et al., 1997; Pelletier & El-Alfy, 2000; Saunders et al., 2001). En células germinales se han localizado ambos receptores y la aromatasa, en ratas los RE $\alpha$  se expresan en espermatoцитos y espermátidas, (Pelletier et al., 2000), pero otros estudios no muestran RE $\alpha$  en células germinales de primates o humanos (Pelletier & El-Alfy, 2000; Saunders et al., 2001). El RE $\beta$  está presente en células germinales en varios estadios de desarrollo tanto en ratas (Saunders et al., 1998; van Pelt et al., 1999), como en primates y humanos (Taylor & Al-Azawi, 2000; Saunders et al., 2001).

En rata y ratón se ha demostrado que las células germinales son un importante origen de estrógenos en el testículo (Carreau & Levallet, 1997; Janulis et al., 1998; Levallet et al., 1998), la demostración de la aromatasa en el esperma sugiere que el esperma por sí mismo puede nivelar

los niveles de estrógenos presentes en el fluido luminal, modulando directamente funciones como la reabsorción de fluidos de los conductos eferentes. Los RE $\alpha$  están presentes en los conductos eferentes de la rata (Fisher et al., 1997; Hess et al., 1997b) y en el epidídimo de la rata y ratón (Couse et al., 1997; Hess et al., 1997b; Sar & Welsch, 2000) y el RE $\beta$  está presente en los conductos eferentes y epidídimo del ratón (Couse et al., 1997; Rosenfeld et al., 1998) y la rata (Hess et al., 1997b., Sar & Welsch, 2000). El RE $\alpha$  raramente se expresa en el epidídimo de primates y humanos (Pelletier & El-Alfy, 2000; Saunders et al., 2001). En contraste, el RE $\beta$  se encuentra tanto en los conductos eferentes como en el epidídimo de estas especies (Saunders et al., 2001).

A partir de la demostración de que las células germinales del ratón adulto expresaban la aromatasa funcional y que la cantidad de estradiol producida por las células germinales es equivalente a la de las células de Leydig (Nitta et al., 1993), se estudió extensivamente el origen de estrógenos en testículos de varias especies de mamíferos. En el roedor campañol (Arvicolinae), la aromatasa ha sido descrita tanto en células somáticas como en células germinales (Bilinska et al., 2000, 2001) siendo la proteína más abundante durante la época de reproducción (Gancarczyk et al., 2004). En el jabalí la célula de Leydig es la única célula descrita como el origen de los estrógenos (Raeside et al., 1983; Mutembei et al., 2005). En contraste, la expresión de la aromatasa en el caballo (Eisenhauer et al., 1994; Sipahutar et al., 2003; Hess & Carnes, 2004), oso negro (Tsubota et al., 1997), bisonte (Kopera et al., 2010) y venado (Schon y Blottner, 2008), ha sido detectada en células somáticas y germinales. En el testículo de mono (Pereyra-Martinez et al., 2001) y humanos (Carreau et al., 2010) la aromatasa se localizó en células de Leydig (Payne et al., 1976), células de Sertoli (Foucault et al., 1992), células germinales inmaduras (Lambard et al., 2003) y espermatozoides eyaculados (Aquila et al., 2002, Lambard et al., 2004, Carreau et al., 2010).

Estos trabajos han demostrado que los RE $\alpha$  y RE $\beta$  se localizan en células específicas del testículo, conductos eferentes y epidídimo y que su localización varía según la especie, edad (Hess 2002, 2003; Hess et al., 2001, 2002; Hess & Carnes, 2004; Sierens et al., 2005; Li Q et al., 2015), y el estado de desarrollo de la célula germinal (Rago et al., 2007; O`Donnell et al., 2001; Carreau et al., 2011; González et al., 2012). (Figura 4). Todos estos estudios también sugieren que los testículos son capaces de sintetizar y responder a los estrógenos en todos los estadios de desarrollo. La localización del RE $\alpha$ , RE $\beta$  y la aromatasa demuestra que la acción de los estrógenos es importante en el desarrollo y función de las células de Leydig, Sertoli y germinales, también como en el desarrollo y función de los conductos eferentes y epidídimo.



**Figura 4-** Presentación esquemática de la localización de la aromatasa y receptor a estrógeno en el testículo y epidídimo de rata adulta. Célula miode (MC), espermatoцитos en fase paquitena (PS), espermátidas redondas (RS), espermátidas elongadas (ES), espermatozoides (SPZ). (Tomado de Carreau et al., 2011).



## ESTUDIOS CON RATONES TRANSGÉNICOS

Reportes de anomalías testiculares en hombres con mutaciones que ocurren naturalmente en el gen de la aromatasa y en individuos que carecen de RE- $\alpha$  funcional indican que presentan testículos no descendidos, disminución en la producción de esperma y perfiles endócrinos alterados, estos datos refuerzan la opinión de que la acción de los estrógenos es un requisito para la función testicular normal (Smith et al., 1994; Morishima et al., 1995; Carani et al., 1997; Herrmann et al., 2002). Por lo tanto, el desarrollo de ratones transgénicos o knockout con eliminación de moléculas relacionadas con la reproducción, ha contribuido enormemente a la comprensión de la endocrinología reproductiva (Akingbemi, 2005; Hewitt et al., 2005). Cuatro líneas diferentes de ratones Knockout deficientes de estrógenos se han desarrollado: 1) ratón knockout (ARKO) con eliminación del gen de la aromatasa, 2) ratón Knockout RE $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) con eliminación del gen RE $\alpha$ , 3) ratón Knockout RE $\beta$  ( $\beta$ ERKO) con eliminación del gen RE $\beta$ , 4) ratón knockout RE $\alpha$  y RE $\beta$  ( $\alpha\beta$ ERKO) con eliminación de ambos subtipos de RE (Korach, 1994; Couse & Korach, 1999). Una diferencia importante entre estas líneas de ratones mutantes es que ratones ARKO expresan adecuadamente la proteína para RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  pero no sintetizan E<sub>2</sub> endógeno mientras que los ratones knockout ERKO son capaces de sintetizar E<sub>2</sub>, pero carecen de cualquier RE- $\alpha$  y / o RE- $\beta$ .

El ratón  $\alpha$ ERKO es infértil, los túbulos seminíferos están atrofiados y degenerados y ambos túbulos y rete testis están dilatados (Eddy et al., 1996; Hess et al., 2011). La desorganización en la espermatogénesis es progresiva mientras que la histología testicular es normal a los 10 días de edad, pero inicia a degenerarse a los 20-30 días. De los 40 a los 60 días los túbulos están marcadamente dilatados con un incremento significativo en el volumen testicular mientras que el túbulo llega a atrofiarse (Couse & Korach, 1999). La falta de reabsorción del fluido en los conductos eferentes y el progresivo hinchamiento de los túbulos seminíferos causa la infertilidad en los ratones  $\alpha$ ERKO. Los túbulos seminíferos dañados resultan del aumento de la presión del fluido, dañando la espermatogénesis acoplado con una atrofia testicular que aparece a la edad de 150 días (Couse & Korach, 1999; Hess et al., 2011). En estos ratones también se observa un incremento significativo de LH y testosterona en suero e hiperplasia de células de Leydig (Couse & Korach, 1999).

A diferencia de los ratones  $\alpha$ ERKO, los ratones ARKO son inicialmente fértiles (Fisher et al., 1998), pero la fertilidad decrece según avanza la edad. En consecuencia, la histología de los testículos de los ratones ARKO de un año de edad muestra alteraciones en la espermatogénesis en el estado temprano de espermátidas sin cambios significativos en el volumen de la luz del túbulo seminífero, junto con hiperplasia de las células de Leydig (Robertson et al., 1999). Se ha propuesto que los mecanismos involucrados en el desarrollo de la infertilidad en los ratones ARKO donde se detiene tempranamente la espermatogénesis es debido a un fracaso en la diferenciación de las células germinales probablemente causado por la falta de acción de los estrógenos a nivel de los túbulos seminíferos más que un problema de daño en la reabsorción de fluido, como sucede en los ratones  $\alpha$ ERKO, el estradiol parece ser un factor esencial para las espermátidas redondas y la falta de estradiol promueve la apoptosis resultando el fracaso en la diferenciación y en la elongación de la espermátida.

Estudios en ratones  $\alpha\beta$ ERKO muestran un fenotipo muy parecido a los ratones  $\alpha$ ERKO caracterizadas por infertilidad y túbulos seminíferos dilatados (Couse & Korach, 1999), pero por lo contrario el ratón  $\beta$ ERKO es completamente fértil y se reproduce en la edad adulta (Krege et al., 1998). Estos estudios proponen que el RE $\alpha$ , pero no RE $\beta$ , es necesario para el desarrollo y mantenimiento de la fertilidad normal en el ratón (Eddy et al., 1996; Krege et al., 1998; Couse & Korach, 1999; Hess et al., 2011). Estos estudios con ratones transgénicos donde se ha eliminado ya sea el gen de los receptores a estrógenos o la aromatasa demuestran que la falta de estrógenos es compatible con la vida y que ratones congénitos deficientes en estrógenos inducen la discapacidad de las funciones reproductivas del macho, variando de una fertilidad normal en los ratones  $\beta$ ERKO, a una completa infertilidad en ratones  $\alpha$ ERKO y ratones  $\alpha\beta$ ERKO. Así como un patrón intermedio en los ratones ARKO en los cuales la espermatogénesis es normal en el ratón joven y progresivamente empeora según avanza la edad. Las características de las funciones testiculares y perfiles endócrinos de los ratones transgénicos se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1- Alteraciones testiculares y perfiles endocrinos de ratones transgénicos deficientes en la aromatasa o en los receptores a estrógenos**

	ARKO	$\alpha$ ERKO	$\beta$ ERKO	$\alpha\beta$ ERKO
Espermatogénesis	Afectada	Afectada	Normal	Afectada
Esteroidogénesis	Afectada	Afectada	Normal	Afectada
Fertilidad	Fértil-Joven Afectada con la edad	Infértil	Fértil	Infértil
FSH	Elevada	ND	Normal	ND
LH	Elevada	Elevada	Normal	Elevada
Testosterona	Elevada	Elevada	Normal	Elevada
17 $\beta$ -estradiol	Ausente	ND	ND	ND

ARKO (ratones transgénicos deficientes en la aromatasa),  $\alpha$ ERKO (ratones transgénicos deficientes en el receptor a estrógenos alfa),  $\beta$ ERKO (ratones transgénicos deficientes en el receptor a estrógeno beta),  $\alpha\beta$ ERKO (ratones transgénicos deficientes en ambos receptores a estrógenos), ND (no determinada).

## CONCLUSIONES

Podemos concluir que los estudios mencionados anteriormente proveen evidencias muy claras del papel estimulador de los estrógenos en el desarrollo de las células germinales incluyendo la división de las espermatogonias, la viabilidad de las células germinales y diferenciación así como la función de los espermatozoides, destacando la importancia de los estrógenos en la regulación de la función testicular confirmando que los estrógenos están implicados y son necesarios en la fertilidad del macho.

## REFERENCIAS

- Ascenzi P., Bocedi A., Marino M. 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. **Molecular Aspects of Medicine** 27:299-402.
- Akingbemi BT. 2005. Estrogen regulation of testicular function. **Reproductive Biology and Endocrinology** 3:51-61.
- Aquila S., Sisci D., Gentile M., Middea E., Siciliano L., Ando S. 2002. Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 87:3385-3390.
- Aranda A., Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews** 81(3):1269-1279.
- Atanassova N., McKinnell C., Williams K., Turner KJ., Fisher JS., Saunders PTK., Millar MR., Sharpe RM. 2001. Age-, cell- and region specific immunoexpression of estrogen receptor  $\alpha$  (but not estrogen receptor  $\beta$ ) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. **Endocrinology** 142:874-886.
- Bilinska B., Schmalz-Fraczek B., Sadowska J., Carreau S. 2000. Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in testicular cells- an immunohistochemical study of the bank vole. **Acta Histochemica** 102:167-181.
- Bilinska B., Schmalz-Fraczek B., Kotula M., Carreau S. 2001. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. **Molecular and Cellular Endocrinology** 178:189-198.
- Carani C., Qin K., Simoni M., Faustini-Fustini M., Serpente S., Boyd J., Korach KS., Simpson ER. 1997. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. **The New England Journal of Medicine** 337:91-95.
- Carreau S., Levallet J. 1997. Cytochrome P450 aromatase in male germ cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica** 35:195-202.
- Carreau S., Genissel C., Bilinska B., Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. **International Journal of Andrology** 22:211-223.
- Carreau S., Levallet J. 2000. Testicular estrogens and male reproduction. **Physiology** 15: 195-198.
- Carreau S., Lambard S., Delalande Ch., Denis-Galeraud I., Bilinska B., Bourguiba S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology** 1:35-40.
- Carreau S., Delalande Ch., Silandre D., Bourguiba S., Lambard S. 2006. Aromatase and estrogens receptors in male reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology** 246:65-68.
- Carreau S., Wolczynski S., Galeraud-Denis I. 2010. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B** 365:1571-1579.
- Carreau S., Hess RA. 2010. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B** 365: 1517-1535.
- Carreau S., Bouraima-Lelong H., Delalande Ch. 2011. Estrogens-new players in spermatogenesis. **Reproductive Biology** 11(3):174-193.

- Conley A., Hinshelwood M. 2001. Mammalian aromatases. **Reproduction** 121:685-695.
- Conn PM., Janovick JA., Stanislaus D., Kuphal D., Jennes L. 1995. Molecular and cellular basis of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. **Vitamins and Hormones** 50:151-214.
- Couse JF., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson JA., Korach KS. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. **Endocrinology** 138:4613-4621.
- Couse JF., Korach KS. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. **Endocrine reviews** 20:358-417.
- De Kretser DM., Meinhardt A., Meehan T., Phillips DJ., O'Bryan MK., Loveland KA. 2000. The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. **Molecular and Cellular Endocrinology** 161(1-2):43-46.
- Dumasiak K., Kumar A., Kadam L., Balasinar NH. 2015. Effect of estrogen receptor-subtype-specific ligands on fertility in adult male rats. **The Journal of Endocrinology** 255(3):169-180.
- Eddy EM., Washburn TF., Bunch DO., Goulding EH., Gladen BC., Lubahn DB., Korach KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology** 137:4796-4805.
- Eisenhauer KM., McCue PM., Nayden DK., Osawa Y., Roser JF. 1994. Localization of aromatase in equine Leydig cells. **Domestic Animal Endocrinology** 11:291-298.
- Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson JA. 1997. Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 82:4258-4265.
- Fisher JS., Millar MR., Majdic G., Saunders PT., Fraser HM., Sharpe RM. 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor- $\alpha$  within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. **The Journal of Endocrinology** 153:485-495.
- Fisher CR., Graves KH., Parlow AF., Simpson ER. 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95:6965-6970.
- Foucault P., Carreau S., Kuczynski W., Guillaumin J. M., Bardos P., Drosowsky M. A. 1992. Human Sertoli cells in vitro. Lactate, estradiol-17 beta and transferrin production. **Journal of Andrology** 13:361-367.
- Gancarczyk M., Paziewska A., Carreau S., Bilinska B. 2004. Dose and photoperiod- dependent effect of 17 $\beta$ -estradiol or ICI 182,780 administration on testicular structure, acceleration of spermatogenesis and aromatase immunoexpression in immature bank voles. **Acta Histochemica** 106:269-278.
- Genissel C., Levallet J., Carreau S. 2001. Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. **The Journal of Endocrinology** 168:95-105.
- González CR., Muscársel Isla ML., Leopardo NP., Willis MA., Dorfman VB., Vitullo AD. 2012. Expression of androgen receptor, estrogen receptors alpha and beta and aromatase in the fetal, perinatal, prepubertal and adult testes of the South American Plains Vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia). **The Journal of Reproduction and Development** 58:629-635.
- Greco TL., Furlow JD., Duello TM., Gorski J. 1992. Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. **Endocrinology** 130:421-429.
- Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert JM., Argos P., Chambon P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. **Nature** 320:134-139.
- Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology** 9: 411-416.
- Gruber CJ., Tschugguel W., Schneeberger C., Huber JC. 2002. Production and actions of estrogens. **The New England journal of medicine** 346:340-352.
- Gruber CJ., Gruber DM., Gruber IM., Wieser F., Huber JC. 2004. Anatomy of the estrogen response element. **Trends Endocrinol Metab** 15:73-78.
- Gustafson ML., Donahoe PK. 1994. Male sex determination: current concepts of male sexual differentiation. **Annual Review of Medicine** 45:505-524
- Haider SG. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. **International Review of cytology** 233:181-241.
- Hamilton KJ., Arao Y., Korach KS. 2014. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. **Reproductive Biology** 14(1): 3-8.
- Harris HA. 2007. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. **Molecular Endocrinology** 21:1-13.
- Herrmann BL., Saller B., Janssen OE., Gocke P., Bockisch A., Sperling H., Mann K., Broecker M. 2002. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 87:5476-5484.
- Hess RA., Bunick D., Lee KH., Bahr J., Taylor JA., Korach KS., Lubahn DB. 1997a. A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature** 390:509-512.
- Hess RA., Gist DH., Bunick D., Lubahn DB., Farrell A., Bahr J., Cooke PS., Greene GL. 1997b. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. **Journal of Andrology** 18(6):602-611.
- Hess RA., Bunick D., Bahr J. 2001a. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract-a review. **Molecular and Cellular Endocrinology** 178:29-38.
- Hess RA., Zhou Q., Nie R., Oliveira C., Cho H., Nakai M., Carnes K. 2001b. Estrogens and epididymal function. **Reproduction Fertility and Development** 13:273-283.

- Hess RA. 2002. The efferent ductules: structure and functions. In: **The epididymis: from molecules to clinical practice**. Robaire B & Hinton BT (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 49-80.
- Hess RA., Zhou Q., Nie R. 2002. The role of estrogens in the endocrine and paracrine regulation of the efferent ductules, epididymis and vas deferens. In: **The epididymis: from molecules to clinical practice**. Robaire B & Hinton BT (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, pp. 317-338.
- Hess RA. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology** 1:52-65.
- Hess RA., Carnes K. 2004. The role of estrogen in the testis and the male reproductive tract: a review. **Animal Reproduction** 1:5-30.
- Hess RA., Fernandes SA., Gomes GR., Oliveira CA., Lazari MF., Porto CS. 2011. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. **Journal of andrology** 32:600-613.
- Hewitt SC., Harrell JC., Korach KS. 2005. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. **Annual Review of Physiology** 67:285-308.
- Honda S., Harada N., Ito S., Takagi Y., Maeda Y. 1998. Disruption of sexual behaviour in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. **Annual Review of Physiology** 252: 445-449.
- Hughes IA., Coleman N., Faisal Ahmed S., Ng KL., Cheng A., Lim HN., Hawkins JR. 1999. Sexual dimorphism in the neonatal gonad. **Acta Paediatrica Supplementum** 88:23-30.
- Janulis L., Bahr JM., Hess RA., Janssen S., Osawa Y., Bunick D. 1998. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. **Journal of Andrology** 19:65-71.
- Jefferson WN., Couse JF., Banks EP., Korach KS., Newbold RR. 2000. Expression of estrogen receptor  $\beta$  is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. **Biology of Reproduction** 62:310-317.
- Klinge CM. 2000. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. **Steroids** 65:227-251.
- Knobil E. 1990. The GnRH pulse generator. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** 152 :1721-1727.
- Koehler KF., Helguero LA., Haldosen LA., Warner M., Gustafsson JA. 2005. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. **Endocrine Reviews** 26:465-478.
- Kopera I., Szczepanowicz M., Gizejewski Z., Sadowska J., Bilinska B. 2010. Immunoexpression of aromatase in immature and adult males of the European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). **Reproduction in Domestic Animals** 45:269-274.
- Korach KS. 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. **Science** 266:1524-1527.
- Kraus WL., McInerney EM., Katzenellenbogen BS. 1995. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 92:12314-12318.
- Krege JH., Hodgin JB., Couse JF., Enmark E., Warner M., Mahler JF., Sar M., Korach KS., Gustafsson JA., Smithies O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95:15677-15682.
- Kuiper GG., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J-A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93:5925-5930.
- Kuiper GG., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J-A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . **Endocrinology** 138:863-870.
- Kumar R., Thompson EB. 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. **Steroids** 64:310-319.
- Kurosumi M., Ishimura K., Fujita H., Osawa Y. 1985. Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. **Histochemistry** 83:401-404.
- Lambard S., Galeraud-Denis I., Bouraima H., Bourguiba S., Chocat A., Carreau S. 2003 Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. **Molecular Human Reproduction** 9:117-124.
- Lambard S., Galeraud-Denis I., Saunders PT., Carreau S. 2004 Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. **Journal of Molecular Endocrinology** 32:279-289.
- Lambard S., Silandre D., Delalande C., Denis-Galeraud I., Bourguiba S., Carreau S. 2005. Aromatase in testis: Expression and in male reproduction. **Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology** 95:63-69.
- Levallet J., Bilinska B., Mitre H., Genissel C., Fresnel J., Carreau S. 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. **Biology of Reproduction** 58: 919-926.
- Li Q., Zhang F., Zhang S., Sheng X., Han Y., Weng Q., Yuan Z. 2015. Seasonal expression of androgen receptor, aromatase, and estrogen receptor alpha and beta in the testis of the wild ground squirrel (*Citellus dauricus* Brandt). **European Journal of Histochemistry** 59(1):2456-2463.
- Majdic G., Millar MR., Saunders PT. 1995. Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. **The Journal of Endocrinology** 147:285-293.
- Mangelsdorf DJ., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans RM. 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. **Cell** 83:835-839.
- McKenna NJ., Lanz RB., O'Malley BW. 1999. Nuclear receptors coregulators: cellular and molecular biology. **Endocrine Reviews** 20:321-344.
- Morishima A., Grumbach MM., Simpson ER., Fisher C., Qin K. 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the

- physiological role of estrogens. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 80:3689-3698.
- Mosselman S., Polman J., Dijkema R. 1996. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **Federation of European Biochemical Societies Letters** 392:49-53.
- Mutembei H., Pesch S., Schuler G., Hoffmann B. 2005. Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature boars. **Reproduction in Domestic Animals** 40: 228-236.
- Nielsen M., Bjornsdottir S., Hoyer PE., Byskov AG. 2000. Ontogeny of oestrogen receptor  $\alpha$  in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. **Journal of Reproduction and Fertility** 118:195-204.
- Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. **Physiological Reviews** 81:1535-1565.
- Nitta H., Bunick D., Hess RA., Janulis L., Newton SC., Milette CF., Osawa Y., Shizuta Y., Toda K., Bahr JM. 1993. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology** 132:1396-1401.
- O'Donnell L., Robertson KM., Jones ME., Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews** 22:289-318.
- Paech K., Webb P., Kuiper GG., Nilsson S., Gustafsson J., Kushner PJ., Scanlan TS. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. **Science** 277:1508-10.
- Papadopoulos V., Carreau S., Szerman-Joly E., Drosowsky MA., Dehennin L., Scholler R. 1986. Rat testis 17  $\beta$ -estradiol: identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. **Journal of Steroid Biochemistry** 24:1211-1216.
- Payne AH., Kelch RP., Musich SS., Halpern ME. 1976. Intratesticular site of aromatization in the human. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 42:1081-1087.
- Pelletier G., El-Alfy M. 2000. Immunocytochemical localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human reproductive organs. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 85:4835-4840.
- Pelletier G., Labrie C., Labrie F. 2000. Localization of oestrogen receptor  $\alpha$ , oestrogen receptor  $\beta$  and androgen receptors in the rat reproductive organs. **Journal of Endocrinology** 165:359-370.
- Pelletier G., Luu-The V., Charbonneau A., Labrie F. 1999. Cellular localization of estrogen receptor  $\beta$  messenger ribonucleic acid in cynomolgus monkey reproductive organs. **Biology of Reproduction** 61:1249-1255.
- Pereyra-Martinez AC., Roselli CE., Stadelman HL., Resko JA. 2001. Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male rhesus monkeys. **Endocrine** 16:15-19.
- Plant TM., Marshall GR. 2001. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. **Endocrine Reviews** 22:764-786.
- Porter TD. 1991. An unusual yet strongly conserved flavorprotein in bacteria and mammals. **Trends in Biochemistry Science** 16:154-158.
- Raeside JJ., Renaud RL. 1983. Estrogen and androgen production by purified Leydig cells from mature boars. **Biology of Reproduction** 28:727-733.
- Rago V., Aquila S., Panza R., Carpino A. 2007. Cytochrome P450, androgen and estrogen receptors in pig. **Reproductive Biology and Endocrinology** 5:23-28.
- Robertson KM., O'Donnell L., Jones ME., Meachem SJ., Boon WC., Fisher CR., Graves KH., McLachlan RI., Simpson ER. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 96:7986-7991.
- Rommerts FF., de Jong FH., Brinkmann AO., van der Molen HJ. 1982. Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. **Journal of Reproduction and Fertility** 65:281-288.
- Rosenfeld CS., Ganjam VK., Taylor JA., Yuan X., Stiehr JR., Hardy MP., Lubahn DB. 1998. Transcription and translation of estrogen receptor- $\beta$  in the male reproductive tract of estrogen receptor- $\alpha$  knock-out and wild-type mice. **Endocrinology** 139:2982-2987.
- Sabbah M., Radanyi C., Redeuilh G., Baulieu EE. 1996. The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. **The Biochemical Journal** 314(Pt 1):205-213.
- Saez JM. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. **Endocrine Reviews** 15:574-626.
- Sar M., Welsch F. 2000. Oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in rat prostate and epididymis. **Andrologia** 32:295-301.
- Saunders PT., Maguire SM., Gaughan J., Millar MR. 1997. Expression of oestrogen receptor  $\beta$  (ER  $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. **The Journal of Endocrinology** 154:R13-16.
- Saunders PT., Fisher JS., Sharpe RM., Millar MR. 1998. Expression of oestrogen receptor  $\beta$  (ER  $\beta$ ) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. **The Journal of Endocrinology** 156:R13-17.
- Saunders PT., Sharpe RM., Williams K., Macpherson S., Urquart H., Irvine DS., Millar MR. 2001. Differential expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. **Molecular Human Reproduction** 7:227-236.
- Schon J., Blottner S. 2008. Estrogens are involved in seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation in roe deer (*Capreolus capreolus*). **General and Comparative Endocrinology** 159:257-263.
- Schulster M., Bernie AM., Ramasamy R. 2016. The role of estradiol in male reproductive function. **Asian Journal of Andrology** 18:435-440.
- Sharpe RM. 1997. Do males rely on female hormones? **Nature** 390:447-448.
- Sharpe RM. 1998. The roles of oestrogen in the male. **Trends in Endocrinology and Metabolism** 9:371-377.
- Shughrue PJ., Lane MV., Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and-beta mRNA in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology** 388:507-525.

- Shughrue PJ., Lane MV., Scrimo PJ., Merchenthaler I. 1998. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and-beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. **Steroids** 63:498-504.
- Sierens JE., Sneddon SF., Collins F., Millar MR., Saunders PT. 2005. Estrogens in testis biology. **Annals of the New York Academic of Sciences** 1061:65-76.
- Simpson ER., Mahendroo MS., Means GD., et al. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen synthesis. **Endocrine Reviews** 15: 342-355.
- Simpson ER., Mahendroo MS., Means GD., Kilgore MW., Hinshelwood MM., Graham-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher CR., Michael MD., Mendelson CR., Bulum SE. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine reviews** 15:342-355.
- Sipahutar H., Sourdain P., Moslemi S., Plainfossé B., Seralini GE. 2003. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 51:311-318.
- Smith EP., Boyd J., Frank GR., Takahashi H., Cohen RM., Specker B., Williams TC., Lubahn DB., Korach KS. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. **The New England Journal of Medicine** 331:1056-1061.
- Taylor AH., Al-Azzawi F. 2000. Immunolocalisation of oestrogen receptor  $\beta$  in human tissues. **Journal of Molecular Endocrinology** 24:145-155.
- Toda K., Okada T., Takeda K., Akira S., Saibara T., Shiraishi M., Onishi S., Shizuta Y. 2001. Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17 $\beta$ -oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. **The Journal of Endocrinology** 168:455-463.
- Toft D., Gorski J. 1966. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 55(6):1574-1581.
- Tremblay GB., Tremblay A., Copeland NG., Gilbert DJ., Jenkins NA., Labrie F., Giguere V. 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . **Molecular Endocrinology** 11:353-365.
- Tsai-Morris CH., Aquilano DR., Dufau ML. 1985. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. **Endocrinology** 116:38-46.
- Tsai-Morris CH., Knox G., Luna S., Dufau ML. 1986. Acquisition of estradiol-mediated regulatory mechanism of steroidogenesis in cultured fetal rat Leydig cells. **The Journal of Biological Chemistry** 261:3471-3474.
- Tsai MJ., O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members, **Annual Review of Biochemistry** 63:451-486.
- Tsubota T., Howell-Skalla L., Nitta HY., Mason JL., Meiers PG., Nelson RA., Bahr JM. 1997. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear, *Ursus americanus*. **Journal of Reproduction and Fertility** 109:21-27.
- Valladares LE., Payne AH. 1979. Acute stimulation of aromatization in Leydig cells by human chorionic gonadotropin in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 76:4460-4463.
- van Pelt MM., de Rooij DG., van der Burg B., van der Saag PT., Gustafsson JA., Kuiper GJM. 1999. Ontogeny of estrogen receptor beta expression in rat testis. **Endocrinology** 140:478-483.
- Weniger JP. 1990. Aromatase activity in fetal gonads of mammals. **Journal of Development Physiology** 14:303-306.
- Weniger JP. 1993. Estrogen production by fetal rat gonads. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** 44:459-462.
- Weniger JP., Zeis A. 1987. Oestrogen synthesis by the fetal rat testis in organ culture. **Journal of Steroid Biochemistry** 28:307-310.
- Weniger JP., Zeis A. 1988. Stimulation of aromatase activity in the fetal rat testis by cyclic AMP and FSH. **The Journal of Endocrinology** 118:485-489.
- West NB., Brenner RM. 1990. Estrogen receptor in the ductuli efferentes, epididymis, and testis of rhesus and cynomolgus macaques. **Biology of Reproduction** 42:533-538.
- Zhou Q., Nie R., Prins GS., Saunders PhTK., Katzenellenbogen BS., Hess RA. 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. **Journal of Andrology** 23(6):1-24.
- Zondek B. 1934. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. **Nature** 193: 209-210.