



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“ESTRÓGENOS EN EL MACHO CABRÍO; EXPRESIÓN DE LA P450  
AROMATASA, SÍNTESIS Y REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN EN EL  
TESTÍCULO.”**

**T E S I S**

Que presenta

**M.C. M.V.Z. LEOPOLDO GUADALUPE ORTIZ CARRERA**

**Para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE**

**FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**Directora de la Tesis:**

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Ciudad de México

Agosto, 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN.

A CONACYT por la beca otorgada durante mi formación en el Doctorado, con el número de becario 168706.

A mi directora de tesis: Dra. Marta C. Romano Pardo

A los miembros de mi Comité tutorial:

Dra. Maria Eugenia Del Carmen Mendoza Garrido

Dr. Javier De Jesús Valencia Méndez

Dr. Luis Alberto Zarco Quintero

A los miembros de mi jurado:

Dra. Maria Eugenia Del Carmen Mendoza Garrido

Dr. Javier De Jesús Valencia Méndez

Dr. Luis Alberto Zarco Quintero

Dra. Emma Soraida Calderón Aranda

Dr. Arturo Ponce Balderas

Dra. Marta C. Romano Pardo

Al Dr José Antonio Mondragón Herrera y a la Dra Lorena Hinojosa por su invaluable apoyo en el desarrollo de las técnicas de laboratorio.

A Ricardo Valdez, Jesús y Armando por su apoyo constante en el laboratorio.

Al Dr Ángel Pulido Albores por su apoyo para la obtención de los machos cabríos del primer estudio.

A la Dra Susana Rojas Maya por todo el apoyo para la validación del ensayo hormonal.

Maritza A. Uribe Fuentes por la castración de los machos cabríos.

José Martin Patricio Gómez por su apoyo en la validación del análisis.

A la Dra. Alejandra Aceves Ramos por el apoyo en la asesoría de las tinciones de los espermatozoides.

A los compañeros de laboratorio: Alba y Toño

A mis dos familias por todo el apoyo para la realización de este trabajo, gracias.

## **DEDICATORIA**

A Alejandra

Por todo el apoyo y empuje para seguir adelante a lo largo de todos estos años. Gracias Ale por todo el amor y la confianza.

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>IV</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
GEN CYP 19.....	7
P450-AROMATASA.....	8
ACTIVIDAD DE LA P450 AROMATASA.....	9
EXPRESIÓN TISULAR DE LA P450 AROMATASA.....	10
EXPRESIÓN TISULAR DE LA P450 AROMATASA EN EL MACHO.....	11
BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES SEXUALES.....	12
ESTEROIDES SEXUALES.....	15
<i>Testosterona</i> .....	16
<i>Estrógenos</i> .....	17
SECRECIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE ESTEROIDES SEXUALES Y CORTICOSTEROIDES.....	18
RECEPTORES DE ESTEROIDES SEXUALES.....	18
<i>Receptor de andrógenos</i> .....	19
<i>Receptor de estrógenos</i> .....	19
<i>Receptor <math>\alpha</math> a estrógenos</i> .....	19
<i>Receptor <math>\beta</math> a estrógenos</i> .....	20
EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN LA HEMBRA.....	21
EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN EL MACHO.....	21
EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS ESTEROIDES SEXUALES.....	22
<i>Andrógenos</i> .....	22
<i>Estrógenos</i> .....	23
DEFICIENCIA DE ESTRÓGENOS.....	24
REGULACIÓN DE LA P450 AROMATASA.....	26
REGULADORES E INHIBIDORES DE LAS RUTAS ESTEROIDOGÉNICAS.....	26
<i>Glucocorticoides (GC)</i> .....	26
<i>Ácido retinoico</i> .....	27
<i>Inhibidores de P450-aromatasa</i> .....	28
Formestane.....	28
Letrozol.....	29
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>32</b>
OBJETIVOS PARTICULARES I.....	32
OBJETIVOS PARTICULARES II.....	33
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
PARTE 1.....	34
<i>Animales y preparación del tejido testicular</i> .....	34

Castración .....	34
RT-PCR in situ .....	35
PCR in situ (Amplificación).....	36
Detección de la señal.....	36
Cromatografía en capa fina.....	37
Cultivo de células testiculares totales.....	37
Inmunohistoquímica.....	38
Enzimo inmunoensayo (EIA).....	39
Validación del ensayo.....	39
PARTE 2 .....	41
Alimentación.....	41
Tratamiento con letrozol.....	41
Muestreo sanguíneo.....	41
Enzimo inmunoensayo (EIA).....	42
Estudio del comportamiento.....	42
Circunferencia escrotal.....	43
Colección de semen.....	43
Evaluación Seminal.....	44
Movimiento en masa.....	44
Movimiento individual.....	44
Concentración espermática.....	45
Viabilidad espermática.....	45
Integridad acrosomal.....	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	46
Parte 1.....	46
Parte 2.....	47
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
PARTE 1 .....	48
Concentraciones séricas de testosterona.....	48
Concentraciones séricas de 17 $\beta$ estradiol.....	48
Síntesis de testosterona y estrógenos usando androstenediona tritiada como precursor.....	50
Síntesis de esteroides a partir testosterona tritiada.....	51
Efecto del inhibidor de síntesis de estrógenos formestane.....	52
Expresión del ARN mensajero de la P450 aromatasa en células testiculares de macho cabrío.....	53
RT-PCR In situ.....	53
Reacción histoquímica para detectar 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	55
PARTE 2 .....	56
Concentración sérica de testosterona por animal a lo largo del estudio con letrozol.....	56
Concentración sérica de 17 $\beta$ estradiol por animal a lo largo del estudio con letrozol.....	58
Conductas agonistas promedio.....	60
Evaluación del efecto de letrozol sobre la circunferencia escrotal y los parámetros del eyaculado.....	63
Efecto del letrozol sobre el volumen del eyaculado.....	64
Efecto del letrozol sobre la concentración espermática.....	65
Efecto del letrozol sobre el movimiento en masa e individual de los espermatozoides.....	66
Efecto del letrozol sobre la integridad del acrosoma.....	68
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
PARTE 1 .....	69
PARTE 2 .....	73

<b>CONCLUSIONES</b> .....	77
PARTE 1 .....	77
PARTE 2 .....	77
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	78
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	79
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	80
<b>ANEXOS</b> .....	98

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES (TOMADO DE GÓMEZ ET AL., 2007).....	15
FIGURA 2. SÍNTESIS DE ESTEROIDES SEXUALES EN DIFERENTES TEJIDOS (ADAPTADO DE BECERRO, 2008). .....	15
FIGURA 3. ESTRUCTURA Y DOMINIOS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\alpha$ Y EL RECEPTOR A ESTRÓGENOS $\beta$ . DBD DOMINIO DE UNIÓN AL ADN Y LBD DOMINIO DE UNIÓN AL LIGANDO. MODIFICADO DE OSBORNE ET AL. 2000. ....	21
FIGURA 4. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TESTOSTERONA Y 17 $\beta$ ESTRADIOL DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL TESTÍCULO DE MACHO CABRÍO. A) CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TESTOSTERONA (NG/ML). B) CONCENTRACIONES SÉRICAS DE 17 $\beta$ ESTRADIOL (PG/ML). LOS DATOS SON REPRESENTADOS POR LA MEDIA $\pm$ EE. LA MUESTRA MENSUAL FUE DE 12 MACHOS CABRÍOS. (* P<0.05). .....	49
FIGURA 5. SÍNTESIS DE TESTOSTERONA Y ESTRÓGENOS USANDO ANDROSTENEDIONA TRITIADA COMO PRECURSOR. LA SÍNTESIS DE LOS METABOLITOS SE EXPRESA EN PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN. LOS DATOS SE REPRESENTAN COMO LA MEDIA $\pm$ EE. ....	50
FIGURA 6. SÍNTESIS DE ESTEROIDES UTILIZANDO $^3$ H-TESTOSTERONA COMO PRECURSOR. SÍNTESIS DE 17 $\beta$ ESTRADIOL (A), ESTRONA (B) Y ANDROSTENEDIONA (C) POR CÉLULAS TESTICULARES DE MACHO CABRÍO DE 4 MESES DE EDAD, DESPUÉS DE 2 Y 4 HORAS DE INCUBACIÓN CON $^3$ H-TESTOSTERONA. LA SÍNTESIS DE LOS METABOLITOS SE EXPRESA EN PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN. LOS DATOS SE REPRESENTAN COMO LA MEDIA $\pm$ EE. ....	51
FIGURA 7. EFECTO DE FORMESTANE EN LA SÍNTESIS DE 17 $\beta$ ESTRADIOL POR CÉLULAS TESTICULARES DE MACHOS CABRÍOS DE 3 Y 4 MESES DE EDAD. LAS CÉLULAS FUERON INCUBADAS POR 24 HORAS EN DMEM EN PRESENCIA DE $^3$ H ANDROSTENEDIONA Y DIFERENTES DOSIS DE FORMESTANE. A) CÉLULAS TESTICULARES DE MACHO CABRÍO DE 3 MESES DE EDAD. B) CÉLULAS TESTICULARES DE MACHO CABRÍO DE 4 MESES DE EDAD. LA SÍNTESIS DE LOS METABOLITOS SE EXPRESA EN PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN. LOS DATOS SE REPRESENTAN CON LA MEDIA $\pm$ EE. (P<0.05 *). ....	52
FIGURA 8. EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE LA P450 AROMATASA EN CÉLULAS TESTICULARES DE MACHO CABRÍO. LOS TEJIDOS FUERON PROCESADOS POR RT-PCR IN SITU. LAS FLECHAS INDICAN CÉLULAS POSITIVAS A P450 AROMATASA. A) 3 MESES DE EDAD, AUMENTO 200X; LA BARRA INDICA 50 $\mu$ M. B) 4 MESES DE EDAD, AUMENTO 400X; LA BARRA INDICA 10 $\mu$ M. ....	54
FIGURA 9. EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE LA P450 AROMATASA EN CÉLULAS TESTICULARES DE MACHO CABRÍO. LOS TEJIDOS FUERON PROCESADOS POR RT-PCR IN SITU. LAS FLECHAS INDICAN CÉLULAS POSITIVAS A P450 AROMATASA. C) 5 MESES DE EDAD, VISTA PANORÁMICA; LA BARRA INDICA 100 $\mu$ M. D) DETALLE DEL ESPACIO INTERSTICIAL, AUMENTO 400X; LA BARRA INDICA 10 $\mu$ M. ....	54
FIGURA 10. CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS DETECTADAS CON LA REACCIÓN HISTOQUÍMICA PARA 3 $\beta$ -HIDROXI ESTEROIDE DESHIDROGENASA. LAS CÉLULAS PROVENIENTES DE TESTÍCULO DE CABRITO DE TRES MESES DE EDAD SE CULTIVARON Y	



LUEGO FUERON SOMETIDAS A LA TÉCNICA MENCIONADA. LAS FLECHAS SEÑALAN A LAS CÉLULAS POSITIVAS A LA REACCIÓN HISTOQUÍMICA. ....	55
FIGURA 11. EFECTO DEL LETROZOL EN LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE TESTOSTERONA. CADA LETRA REPRESENTA A CADA UNO DE LOS MACHOS CABRÍOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO. SE MUESTRAN LAS CONCENTRACIONES DE CADA ANIMAL OBTENIDAS ANTES (-), DURANTE Y DESPUÉS (+) DEL TRATAMIENTO CON LETROZOL. N=6 (P<0.05 *).....	57
FIGURA 12. EFECTO DEL LETROZOL EN LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE 17β ESTRADIOL. CADA LETRA REPRESENTA A CADA UNO DE LOS MACHOS CABRÍOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO. SE MUESTRAN LAS CONCENTRACIONES EN CADA ANIMAL OBTENIDAS ANTES (-), DURANTE Y DESPUÉS (+) DEL TRATAMIENTO CON LETROZOL. (N=6. P<0.05 *).....	59
FIGURA 13 (A) MUESTRA LA MATRIZ DE DOMINANCIA DE LOS MACHOS CABRÍOS CONTROL Y DE LOS QUE DESPUÉS FUERON TRATADOS CON LETROZOL EN EL PERÍODO PREVIO AL TRATAMIENTO. ....	60
FIGURA 13 (B). MUESTRA LA MATRIZ DE DOMINANCIA DE LOS MACHOS CABRÍOS CONTROLES Y DE LOS TRATADOS CON LETROZOL EN EL PERÍODO POSTERIOR AL TRATAMIENTO.....	61
FIGURA 14. CONDUCTAS AGONISTAS PROMEDIO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LETROZOL. EL LETROZOL SE ADMINISTRÓ DURANTE 15 DÍAS Y LAS CONDUCTAS SE REGISTRARON ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO. N=6 (MEDIA±EE). (P<0.05 *).....	62
FIGURA 15. EFECTO DEL LETROZOL SOBRE LA CIRCUNFERENCIA ESCROTAL. LOS DATOS EXPRESAN MEDIA ± EE, N= 6 GRUPO CONTROL Y N=6 GRUPO TRATADO CON LETROZOL. (P<0.05 *).....	63
FIGURA 16. EFECTO DEL LETROZOL SOBRE EL VOLUMEN DEL EYACULADO. LOS DATOS EXPRESAN MEDIA ± EE, N= 6 GRUPO CONTROL Y N=6 GRUPO TRATADO CON LETROZOL (P<0.0001 ***). ....	64
FIGURA 17. EFECTO DEL LETROZOL SOBRE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA. LOS DATOS INDICAN MEDIA ± EE. (P<0.0001***). ....	65
FIGURA 18. EFECTO DEL LETROZOL SOBRE EL MOVIMIENTO EN MASA (A) E INDIVIDUAL (B) DE LOS ESPERMATOZOIDES. LOS DATOS INDICAN MEDIA ± EE. (P<0.0001 ***). ....	66
EFECTO DEL LETROZOL SOBRE EL NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS.....	67
FIGURA 19. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LETROZOL SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES. LA VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES FUE EVALUADA MEDIANTE LA TINCIÓN EOSINA-NIGROSINA. LOS DATOS INDICAN MEDIA ± EE. (P<0.0001 ***). ....	67
FIGURA 20. EFECTO DEL LETROZOL SOBRE LA INTEGRIDAD DEL ACROSOMA. TINCIÓN AZUL DE COOMASIE (P<0.0001). LOS DATOS INDICAN MEDIA ± EE. (P<0.0001 ***). ....	68



## RESUMEN

El papel de la testosterona en machos ha sido extensamente estudiado. Sin embargo, estudios en varias especies sugieren que los estrógenos son también importantes para el desarrollo y funcionamiento de diferentes órganos en el macho; como el cerebro, los huesos, las gónadas, así como para la espermatogénesis y el comportamiento sexual. Adicionalmente el conocimiento del papel de los estrógenos en el macho es incompleto. No existe información sobre la expresión testicular del ARNm de la P450 aromatasa, la síntesis de estrógenos, o de las concentraciones séricas circulantes del  $17\beta$  estradiol en el macho cabrío, así como de los efectos de la inhibición de la P450 aromatasa sobre la espermatogénesis, el comportamiento agonista.

Este trabajo tiene dos objetivos de estudio:

- A) Hacer estudios *in vivo* e *in vitro* relacionados con las síntesis de estrógenos y las concentraciones séricas durante el desarrollo testicular postnatal del macho cabrío, además de estudiar la expresión y distribución tisular del ARNm de la P450 aromatasa.
- B) Investigar los efectos de la inhibición de la P450 aromatasa en machos cabríos adultos por letrozol (un inhibidor competitivo no esteroideo) sobre la espermatogénesis y el comportamiento agonista.

En la primera parte de este trabajo las concentraciones séricas de  $17\beta$  estradiol y testosterona fueron determinadas en el macho cabrio durante el primer año de vida, empezando a los 15 días de edad. Adicionalmente, para asegurar que los testículos de machos cabrios de cuatro meses de edad son capaces de producir estrógenos, las células testiculares fueron incubadas con precursores tritados ( $^3\text{H}$ -androstenediona y  $^3\text{H}$ -testosterona) en la presencia o ausencia del inhibidor de P450 aromatasa (formestane), usando cromatografía en capa fina (TLC) para identificar los esteroides sexuales producidos.

Finalmente, la expresión y distribución tisular del ARNm de P450 aromatasa en testículos de machos cabríos de 3 y 5 meses de edad fue estudiada a través de la RT PCR *in situ*.

Los resultados de estos estudios indican que el 17 $\beta$  estradiol esta presente en el suero de los machos cabríos desde los 15 días de nacido, y posteriormente tiene incrementos significativos a los 3 y 10 meses de edad. La síntesis *in vitro* de 17 $\beta$  estradiol tritiado fue inhibida por el inhibidor de la P450 aromatasa, formestane. El ARN mensajero de la P450 aromatasa esta abundantemente expresado en las células de Sertoli y en las células de Leydig a los tres, cuatro y cinco meses de edad.

En la segunda parte 12 machos cabríos Saanen fueron usados, asignados aleatoriamente en dos grupos (seis usados como control y seis tratados con letrozol). El letrozol fue administrado oralmente (2.5 mg/día) por 15 días. Se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena yugular cada tercer día, cinco días antes del inicio del tratamiento, durante el tratamiento y cinco días después de terminado. Las concentraciones séricas de 17 $\beta$  estradiol y testosterona fueron medidas por enzimo inmuno ensayo. Simultáneamente, el comportamiento agonista de los machos cabríos fue registrado por 3 horas incluyendo topeteos, amenazas, persecuciones y evasiones para conocer el nivel dominancia de cada animal del grupo. Adicionalmente se evaluó la circunferencia escrotal y se colectó el semen por medio de vagina artificial cada cuatro días. Se evaluo en el semen el volumen, color, concentración, movimiento individual, movimiento en masa, la viabilidad y la integridad del acrosoma.

Los resultados de la siguiente parte del estudio indican que el tratamiento con letrozol incremento significativamente el comportamiento agonista entre los grupos y los niveles séricos de testosterona pero no mostró cambios significativos en los niveles de 17 $\beta$  estradiol. Las características de los testículos del semen del macho cabrío se vieron afectadas, ya que la

circunferencia escrotal, el volumen del eyaculado, la concentración espermática disminuyó. De la misma forma el movimiento en masa e individual a partir del quinto muestreo sufrió una disminución. Adicionalmente las células muertas en el grupo tratado con letrozol aumentaron y aquellas con el acrosoma intacto disminuyeron.

En conclusión, el macho cabrío prepúber tiene cantidades medibles de  $17\beta$  estradiol y los testículos tienen la capacidad de sintetizar estrógenos durante este período. La inhibición de la P450 aromatasa resultó en un incremento en los niveles séricos de testosterona, los parámetros del eyaculado alterados indican que la síntesis de estrógenos es importante en la reproducción el macho cabrío.

Palabras clave: macho cabrío; desarrollo prepuberal; esteroides sexuales séricos; síntesis de estrógenos; formestane; letrozol; ARNm P450 aromatasa; eyaculado; conducta agonista.

## ABSTRACT

The role of testosterone in males has been studied extensively. However, research in different species suggest that estrogens are also important for the development and function from the brain, bone, gonads, as well as for spermatogenesis and sexual behavior in the male. Furthermore, the knowledge of the role of estrogens in the male is actually incomplete.

There is no information in testicular mRNA aromatase expression, estrogen synthesis, or estradiol-17 $\beta$  concentrations in the systemic circulation of the male goat, and about the effects of P450-aromatase inhibition on the spermatogenesis in adult bucks by the competitive non-steroid inhibitor letrozole and their agonistic behavior.

This work had two study argues:

A) To conduct *in vivo* and *in vitro* studies related to estrogen synthesis and serum concentrations during the postnatal testicular development in goat bucks. Moreover study the expression and tissue distribution of P450 aromatase in the testis.

B) To investigate the effects of P450-aromatase inhibition by letrozole over spermatogenesis and the agonistic behavior.

In the first part of this thesis, the circulating concentrations of estradiol-17 $\beta$  and testosterone were evaluated in male goat along the first year of their life, starting at 15 days of age. Besides, in order to assess the estrogen-producing ability of testicles from prepubertal male goats (four months), testicular cells were incubated with tritiated androgen precursors (<sup>3</sup>H-androstenedione and <sup>3</sup>H-testosterone) in the presence or absence of the P450-aromatase inhibitor formestane, using TLC to identify sex steroids. Finally, the expression and tissue distribution of P450-aromatase mRNA in the testis of 3-5 month old males was evaluated by *in situ* RT-PCR. Results indicate that estradiol-17 $\beta$  is

present in the serum of male goats at 0.5 months of age, and that there are significant increases at 3 and 10 months of age. The *in vitro* synthesis of tritiated estradiol-17 $\beta$  was inhibited by the P450-aromatase inhibitor formestane. Messenger RNA for P450-aromatase was abundantly expressed both in Sertoli cells in the testis of goats of ages three, four and five months. The expression of P450 mRNA was also localized in Leydig cells.

For the second part, twelve Saanen bucks were used randomly assigned to one of two groups, 6 bucks were control and other 6 bucks were treat with letrozole. Letrozol was orally administered (2.5 mg/day) during 15 days. Serum samples were obtained from the jugular vein, every third day since 5 days before beginning the treatment, during the treatment and 5 days after the end of it. The concentrations of estradiol (E2) and testosterone (T4) were measured form serum by an enzyme immunoassay (EIA). Simultaneously, the agonistic behavior of the goats was recorded 3 h daily for evaluating butts, threats, chases and avoidance to record the dominance hierarchies, in both groups. The scrotal circumference was measured too, and semen was collected by an artificial vagina every 4 days. The semen characteristics that were evaluated: volume, color, mass and individual motility, concentration, viability and acrosome integrity.

Differences in agonistic behavior were found between groups. The treatment with letrozole increased T4 concentrations but did not change E2 levels significantly. The scrotal circumference decreased after letrozol administration. The ejaculate volume and the sperm concentration decreased too, by the letrozole treatment. The mass and individual motility began to decrease after the 5th sampling. In addition, dead sperm cells increased in the letrozole group after the 4th sampling. Cells with an intact acrosome were more frequent in the control group in comparison with the letrozole group.

With these results, is concluded that the prepubertal goat has measurable quantities of serum estradiol-17 $\beta$  and that their testis has the capacity to synthesize estrogens during this period. Inhibition of P450-aromatase resulted in an increase in serum testosterone concentration, sperm parameters alterations, indicating that estrogen synthesis may be important for male reproduction in the male goat.

Keywords: male goat; prepubertal development; serum sex steroids; estrogen synthesis; formestane; letrozol; aromatase mRNA expression; ejaculated, agonistic behavior.



## INTRODUCCIÓN

El propósito del presente estudio es estudiar la expresión de la P450 aromatasa en el testículo del macho cabrío, a lo largo de su desarrollo, desde el nacimiento hasta el año de edad, así como la distribución tisular que presenta en el epidídimo y en los testículos; además buscamos estudiar los efectos *in vivo* del letrozol sobre la fisiología testicular del macho cabrío.

Se sabe que el desarrollo testicular normal y el mantenimiento de la espermatogénesis son controlados por las gonadotropinas y la testosterona y modulados por una red compleja de factores (Carreau et al., 2007; Hess et al., 2001). En algunos estudios se ha desafiado el dogma de que el fenotipo del macho es mantenido únicamente por la unión de la testosterona a su proteína blanco; el receptor de andrógenos, y se han enfocado al papel de los estrógenos en la salud reproductiva del macho, poniendo relevancia en la importancia de estudiar el papel de los estrógenos en la salud reproductiva del macho (Toppari et al., 1996). Adicionalmente la relación andrógenos/estrógenos es esencial para un desarrollo sexual y reproductivo normal en mamíferos. En los testículos de los mamíferos, el mantenimiento de este balance es mantenido por la actividad de la P450 aromatasa, la cual en humanos es producto del gen *CYP 19*.

### Gen *CYP 19*

El gen *CYP 19* humano es un gen de copia única perteneciente a la familia de los genes Citocromo P450, que contiene más de 500 miembros. Está compuesto de 10 exones; el exon II-X codifica la proteína aromatasa y la región 3' no traducida del RNAm de todos los tejidos productores de estrógenos (Carreau et al., 2007; Simpson y Davis, 2001). Los exones primarios codifican regiones únicas 5' no traducidas de RNAs *CYP19* que se expresan en

tejidos diferentes. Por consiguiente, las transcripciones del RNAm *CYP19* en el ovario, tejido adiposo, y placenta contienen diferentes exones primarios que se unen alternativamente hacia un sitio común del codón de iniciación traducido en el exón II. Con lo que se tiene que la expresión del gen *CYP19* en estos tejidos se maneja por promotores tejido-específicos (Vanselow *et al.*, 2004) a través del uso de mecanismos alternativos. El Promotor I.1 se activa en placenta, el Promotor I.2 se activa en ovario y tejido adiposo y el Promotor I.4 se activa en tejido adiposo (Simpson *et al.*, 1997).

Al parecer en la mayoría de los mamíferos únicamente se utiliza un gen de la P450 aromatasa, aunque en el bovino se ha descrito un pseudogen de esta enzima (Furbass y Vanselow, 1995). En cerdos, pecaris y otros suidos se presentan dos o más genes que resultan de la duplicación de un ancestro común. La expresión tejido específica en placenta y gónadas de los cerdos y los pecaris indica la adaptación funcional influenciada por las estrategias reproductivas de las especies, que incluyen el tamaño de la camada, la tasa ovulatoria y la protección de los fetos hembra contra la testosterona producida por los fetos macho (Conley *et al.*, 2009). El gen *cyp 19* es responsable de codificar el complejo enzimático conocido como P450-aromatasa (Carreau y Hess, 2010).

### **P450-aromatasa**

La biosíntesis de estrógenos es producto del metabolismo de andrógenos catalizado por el complejo enzimático conocido como aromatasa, el cual tiene dos componentes; la aromatasa citocromo P450 (P450 arom) acoplada a una flavoproteína, la NADPH citocromo P450 reductasa (Conley y Hinshelwood 2001; Simpson y Davis, 2001).

La P450 aromatasa es miembro de la superfamilia de enzimas Citocromo P450, (producto del gen *CYP19*). Está altamente conservada en los

vertebrados, existiendo una identidad del 50 al 90% en la secuencia de aminoácidos entre las formas de la enzima de mamíferos y peces.

En el cerdo se han descrito tres diferentes isoformas de aromatasa (Graddy et al., 2000) y en el pez zebra se describieron dos P450 aromatasa distintas codificadas por genes (Kishida y Callard, 2001). En la cabeza del epidídimo del mono rhesus Pereyra-Martínez et al. (2000), encontraron que la actividad de la aromatasa es elevada y la cantidad de transcritos son bajos, situación contraria a la encontrada en las regiones de la cola y el cuerpo del epidídimo. El epidídimo contiene un solo transcrito, mientras que los testículos del mono rhesus expresan dos formas de RNAm de P450 aromatasa (uno completo y uno truncado), lo que también ha sido reportado en ratas macho por Levallet et al. (1998) y en la placenta de la oveja (Vanselow *et al.*, 1999).

#### **Actividad de la P450 aromatasa**

La actividad de la P450-aromatasa varía incluso entre razas, por ejemplo, en el ovario de la cerda Meishan la P450 aromatasa tiene mayor actividad en las células de la granulosa y las células de la teca en comparación con la raza Large-White (Hunter et al., 1994). En el área medio basal del hipotálamo y en las regiones de la amígdala del macho de rata se ha encontrado una elevada actividad de aromatasa. Específicamente, la actividad de la aromatasa fue alta en la amígdala, en el núcleo preóptico periventricular y en el núcleo preóptico medio; con baja actividad se encontró en el núcleo supraquiasmático, el hipotálamo anterior, el hipotálamo periventricular anterior, el núcleo arcuato, la corteza y otras regiones (Conley y Hinshelwood, 2001; Schwarz, 2008). Estas regiones son importantes en la regulación neuroendocrina de la reproducción, el comportamiento y en la mayoría de los casos muestran desarrollo y diferencias sexuales dimórficas en la actividad de la enzima. Otros tejidos, como la piel, hígado, riñón, músculo esquelético, pulmones, intestinos y otros también aromatizan testosterona o androstenediona.

En los testículos de ratones la actividad de la aromatasa es encontrada en las células de Sertoli antes de la pubertad y en las células de Leydig en los ratones adultos. La actividad de la aromatasa y de sus transcritos ha sido observada en las células germinales de varias especies, incluyendo los espermatocitos en paquiteno, espermatides elongadas y espermatozoides de epidídimo (Nitta *et al.*, 1993).

A diferencia de los roedores machos, en el hombre la actividad de la aromatasa y la biosíntesis de los estrógenos ocurre mayormente en el tejido adiposo, y los testículos sintetizan únicamente del 10 al 25% de los estrógenos circulantes (Akingbemi, 2005).

### **Expresión tisular de la P450 aromatasa**

En especies como los humanos y los roedores, la P450 aromatasa puede ser localizada en el cuerpo lúteo. La enzima en la rata se encuentra en el hipotálamo de ambos sexos durante el período prenatal, después de 16 días de gestación, declina al nacimiento y después disminuye a partir de la pubertad.

En humanos, la P450 aromatasa se encuentra en el sincitio trofoblasto de la placenta, en las células del estroma adiposo, osteoblastos del hueso, fibroblastos de piel, ciertas porciones de los vasos sanguíneos, así como en el hígado fetal y en otros tejidos. Como se ha encontrado en gónadas y cerebro, los factores y las vías que activan o inhiben la expresión varía ampliamente entre estos tejidos.

Se ha encontrado expresión de la P450-aromatasa tanto en la placenta de primates como en la de ungulados, aunque el patrón de expresión de la biosíntesis de estrógenos varía ampliamente entre especies a lo largo de la gestación (Hinshelwood *et al.*, 1995 y Mondragón *et al.*, 2007). Estudios en cerdos han confirmado que la P450 aromatasa se expresa en la teca interna y

la granulosa de los folículos preovulatorios, en la zona reticular de la adrenal fetal y en el trofoectodermo del blastocisto (Hunter *et al.*, 1994).

La expresión aberrante de la P450 aromatasa en tejidos que carecen normalmente de elevadas concentraciones de la enzima se ha asociado en el humano con varias condiciones patológicas como ginecomastia, endometriosis, precocidad sexual y tumores de seno, testículo, hígado, corteza adrenal y útero (Conley y Hinshelwood, 2001 y Fowler *et al.*, 2000).

### **Expresión tisular de la P450 aromatasa en el macho**

En el macho de la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas, la aromatasa se expresa en varias partes del cerebro, tejido adiposo, hueso, corazón, células de Leydig, células de Sertoli y células germinales, incluyendo los espermatozoides. También se expresa en los conductos eferentes y la cabeza del epidídimo en el hombre (Carpino *et al.*, 2004) y en el corzo (Schön y Blottner, 2008).

La síntesis en las células espermáticas germinales junto con las células de Sertoli y Leydig, pueden ser otra fuente importante de estrógenos en el tracto reproductivo del macho.

Durante el desarrollo fetal en los roedores la aromatasa se expresa en las células de Sertoli y en las de Leydig pero no en las espermatogonias. La expresión celular de la aromatasa es dependiente de la edad en la rata macho postnatal, ocurriendo predominantemente en las células de Sertoli y en las células germinales del testículo prepuberal (sobre 21 días de edad) y en las células de Leydig después de este período. Por otra parte, la aromatasa ha sido localizada virtualmente en todos los tipos celulares del testículo adulto de los animales, incluyendo en las células de Leydig del ratón (Nitta *et al.*, 1993; Bilinska *et al.*, 2003), rata (Janulis *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 2002), oso (Tsubota *et al.*, 1997), cerdo (Conley *et al.*, 1996), carnero (Vanselow *et al.*, 2001) y caballo (Hess y Roser, 2004). También se ha encontrado en las células

de Sertoli en oso (Okano et al., 2003), caballo (Hess y Roser, 2004), perro (Peters et al., 2003) y topillo rojo (Bilinska et al., 2001).

La presencia de la enzima en los espermatozoides se ha demostrado en varias especies, incluyendo el ratón, la rata, el oso pardo y el gallo (Hess et al., 1995; Hess et al., 2001; Janulis et al., 1996 a y b; Janulis et al., 1998; Kwon et al., 1995; Nitta et al., 1993). La enzima está localizada en gotas citoplasmáticas en la cola de los espermatozoides, y la tinción se vuelve menos intensa conforme los espermatozoides atraviesan el epidídimo (Janulis et al., 1996a). Su presencia en las células germinales y espermatozoides representa aproximadamente el 62% de la aromatasa testicular total (Carreau et al., 1999; Levallet et al., 1998; Levallet y Carreau, 1997). Se ha encontrado tanto en espermatoцитos como en espermátides y espermatozoides (Akingbemi, 2005; Bilinska et al., 2003; Carpino et al., 2001; Carreau *et al.*, 2003). La aromatasa no se ha encontrado en la rete testis, conductos eferentes y epidídimo (Hess et al., 2004) por lo que la conversión de andrógenos a estrógenos por los espermatozoides es la principal fuente de estrógenos en el lumen del tracto (Schleicher et al., 1989).

La información que describe la actividad de la aromatasa y la expresión de los receptores a estrógenos en tejidos reproductivos de machos y hembras fue colectada utilizando una combinación de técnicas: ensayos de unión, inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y RT-PCR (Akingbemi, 2005).

### **Biosíntesis de esteroides sexuales**

Las hormonas esteroides son derivadas del colesterol. El paso limitante en la biosíntesis de hormonas esteroides es la traslocación del colesterol al interior de la membrana mitocondrial interna por efecto de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory), donde es convertido en pregnenolona por la enzima cortadora de la cadena lateral (P450 cholesterol side-chain cleavage) (Clark y Stocco, 1996). La estructura química básica de los

esteroides son cuatro anillos aromáticos (tres ciclohexanos y un ciclopentano), conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno. Sobre éste se agregan cadenas laterales que determinan las clases de esteroides, generando tres tipos básicos:

1. Esteroides de 21 átomos de carbono: son las hormonas responsables de las funciones endócrinas de la corteza suprarrenal. Se clasifican en:  
1) glucocorticoides (GC), que tienen acción básica sobre el metabolismo hidrocarbonado y proteínico (principalmente la cortisona y la hidrocortisona); además tienen acciones relacionadas con la función inflamatoria y con la función inmune. 2) mineralocorticoides (MC), que participan en el equilibrio hidroelectrolítico (la aldosterona). 3) progestágenos, que juegan un papel central en eventos reproductivos asociados con el establecimiento y mantenimiento de la preñez (Conneely et al., 2002).
2. Esteroides de 19 átomos de carbono: los andrógenos son las hormonas sexuales masculinas, cuya principal función es estimular la aparición de caracteres masculinos.
3. Esteroides de 18 átomos de carbono: se conocen como estrógenos, hormonas sexuales femeninas, los cuales tienen diferentes efectos, como el desarrollo de características femeninas (figura 1).

Así tenemos tres tipos de hormonas esteroideas. Los esteroides sexuales (progestágenos, andrógenos y estrógenos), los mineralocorticoides, y los glucocorticoides.

Los esteroides se sintetizan a partir de colesterol, el cual puede ser obtenido por la célula esteroideogénica de dos formas. A partir del colesterol circulante en sangre procedente de la dieta, o iniciando con la síntesis *de novo* de colesterol a partir de acetato, vía mevalonato, escualeno y colesterol.

A partir del colesterol la biosíntesis puede seguir dos vías: la de la pregnenolona (vía  $\Delta 5$ ), que es el pregnano del que derivan todos los demás esteroides; o la de la progesterona (vía  $\Delta 4$ ), que ya muestra una estructura

delta-4-3-ceto en su anillo A. Para dar lugar a los andrógenos, las progestinas deben sufrir una hidroxilación en el carbono 17, que puede ser seguida por una ruptura entre el carbono 17 y el 20, quedando una molécula de 19 carbonos (un andrógeno). Mediante este proceso se forma dehidroepiandrosterona (DHEA) a partir de la 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, y el DHEA puede ser reducido para formar androstenediol y posteriormente por la participación de la enzima 17  $\beta$ - hidroxiesteroide-deshidrogenasa se forma testosterona. Otra vía es a partir de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, que puede ser convertida directamente en androstenediona (A4) y posteriormente en testosterona. Esta hormona puede ser posteriormente reducida a dihidrotestosterona (5 $\alpha$  o 5 $\beta$ ). La androstenediona puede ser directamente aromatizada a estrona o primero convertirse en testosterona y después aromatizarse a 17 $\beta$  estradiol. Es decir que los estrógenos son derivados de la testosterona o de la androstenediona, por la aromatización del anillo A de estos andrógenos.

La aromatización incluye una serie de reacciones complejas que consisten, entre otros pasos, en una serie de hidroxilaciones del carbono 19 seguidas de oxidaciones, la segmentación del grupo metilo del carbono 19, la aromatización del anillo esteroide A y la formación de estrógenos. El 17 $\beta$  estradiol, que es el estrógeno más potente, resulta directamente de la aromatización de la testosterona, mientras que la estrona se obtiene por la aromatización de la androstenediona.



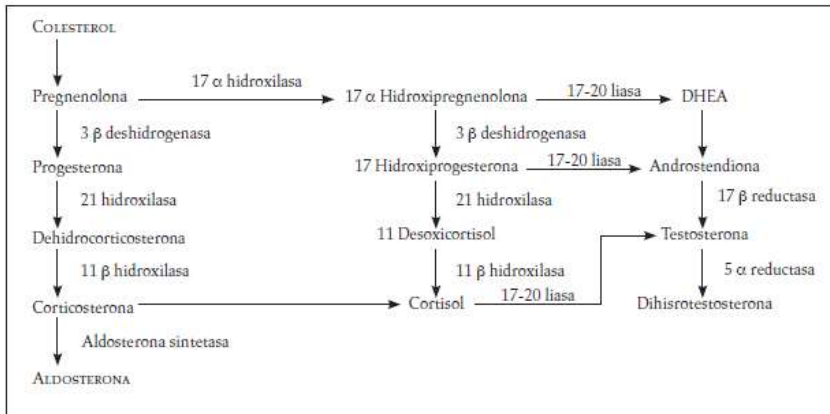


Figura 1. Biosíntesis de esteroides (tomado de Gómez *et al.*, 2007)

### Esteroides Sexuales

El colesterol, por la acción de distintas enzimas se transforma en diferentes esteroides sexuales, según el órgano donde tiene lugar su transformación: las adrenales, los ovarios o los testículos (figura 2).

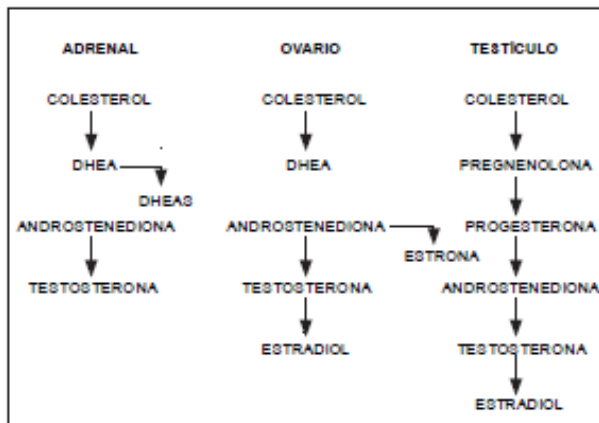


Figura 2. Síntesis de esteroides sexuales en diferentes tejidos (adaptado de Becerro, 2008).

La acción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), estimula en la hipófisis anterior la producción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). En el macho, la LH actúa en las células de Leydig del testículo estimulando la síntesis de testosterona. En las células de Sertoli, ubicadas en el túbulo seminífero, la testosterona se transforma en  $17\beta$  estradiol, por acción de la aromatasa. La testosterona pasa a la circulación general y ejerce una retroalimentación negativa sobre la LH. En hembras, la acción de la LH sobre las células de la teca del ovario estimula la síntesis de androstenediona, que en el interior de las células de la granulosa se transforma en estrona por acción de la P450-aromatasa.

Cualquiera de los esteroides sexuales mencionados es insoluble en agua, por lo que para su transporte a través de la circulación necesita unirse a albúmina (aproximadamente el 40% de la hormona) o a la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG). A la primera se une de forma débil y a la segunda se une con gran afinidad. Solo una pequeña cantidad de las hormonas esteroides, que no suele superar el 2% del total, circula no unida a una globulina, y se le denomina testosterona o  $17\beta$  estradiol libre. Tanto la hormona libre como la que va unida a albúmina es hormona biodisponible porque puede penetrar fácilmente en las células diana, donde ejerce su acción a través de la unión al receptor específico.

### Testosterona

Se produce principalmente en el testículo, mientras que las glándulas adrenales son responsables de la producción de DHEA circulante. El andrógeno más activo es la dihidrotestosterona (DHT), que se origina por la acción de la enzima  $5\alpha$  reductasa sobre la testosterona. La presencia de DHT en plasma es limitada, ya que la mayor parte se forma en los tejidos donde lleva a cabo su acción. Una buena parte de las acciones de la testosterona en tejidos periféricos se lleva a cabo en forma directa, tras convertirse en DHT y

unirse con el receptor de andrógenos (RA). En la circulación, únicamente 2% de la testosterona aparece como libre, un 44% restante está unido a la SHBG y el 54% restante se encuentra unido a albúmina y a otras proteínas (Griffin y Wilson, 1998).

### Estrógenos

La síntesis de estrógenos en el tracto reproductor del macho adulto se lleva a cabo en las células de Leydig (Rommerts et al., 1982, Carreau et al., 2003 y Sharpe et al., 2003).

Los estrógenos están presentes en el semen y en las secreciones de las glándulas accesorias de varias especies, como el mono (Waites y Einer Jensen, 1974); toro (Ganjam y Amann, 1976; Eiler y Graves, 1977; Free y Jaffe, 1979); caballo (Setchell et al., 1983; Claus et al., 1992); hombre (Adamopoulos, et al., 1984; Bujan et al., 1993); cerdo (Claus et al., 1985). En algunas de ellas las concentraciones de estrógenos son elevadas, incluso en la rata macho pueden alcanzar concentraciones que exceden los que se encuentran circulantes en las hembras (Free y Jaffe, 1979). Particularmente en la vena testicular las concentraciones son elevadas en la mayoría de las especies estudiadas como el mono (Waites y Einer Jensen, 1974); caballo (Setchell, 1982) y el hombre (Adamopoulos et al., 1984).

La concentración de estrógenos en la sangre periférica es típicamente baja en el macho, pero se han encontrado rangos de 2 a 180 pg/ml dependiendo de la especie. El caballo es una excepción, ya que el sulfato de estrona se encuentra en concentraciones séricas del orden de ng/ml (Claus et al., 1992; Setchell, 1982).

Las concentraciones encontradas en la rete testis varían entre especies, con la rata mostrando niveles de 249 pg/ml (Free y Jaffe, 1979), la cual es mayor que el promedio de la concentración sérica de  $17\beta$  estradiol en la hembra (Overpeck et al., 1978; Robaire y Fan, 1998). Los estrógenos también son

abundantes en el semen y dependiendo de las especies la concentración puede variar de los 14 a cerca de 900 ng/ml de sulfato de estrona en el semen del caballo y en el cerdo niveles de 705 nmol/L (Amann y Schanbacher, 1983; Ganjam y Amann, 1976; Waites y Einer-Jensen, 1974).

### **Secreción, transporte y metabolismo de esteroides sexuales y corticosteroides**

Los esteroides son sustancias hidrofóbicas. Las reacciones catabólicas, además de inactivar a las hormonas, sirven también para convertir a las moléculas esteroides en productos más hidrofílicos que pueden ser eliminados a través de la orina. Las reacciones catabólicas en su mayoría son reductivas y ocurren sobre todo en el hígado. La solubilidad en agua de las hormonas esteroides aumenta cuando son conjugadas con sulfatos o con ácido glucurónico. La mayor parte de los metabolitos esteroides se eliminan en orina como sulfatos o conjugados glucuronados hidrosolubles formados principalmente en el hígado. La sulfoquinasa necesita sulfato activo, que es donado por la fosfoadenosinfosulfato (PAPS). La glucuronil transferasa utiliza ácido uridina difosfoglucurónico (UDPG) (Guillemette *et al.*, 2004).

### **Receptores de esteroides sexuales**

Los receptores de esteroides sexuales al igual que los de glucocorticoides, son de tipo nuclear y se comportan como factores de transcripción al unirse con el esteroide. La mayoría de los receptores esteroides se unen como homodímeros a palíndromos hexámeros AGAACA separadas por tres bases, y el receptor de estrógenos homodímero reconoce AGGTCA de la misma manera (Brosens *et al.*, 2004; Becerro, 2008).

### Receptor de andrógenos

Es miembro de la superfamilia de receptores nucleares que funciona como un factor de transcripción activado por su ligando. Es una copia simple de un gen, consta de 8 exones y abarca más de 90 kb de ADN en la región q11-12 del cromosoma X, es muy similar al receptor de glucocorticoides y de progesterona (Brosens *et al.*, 2004; Becerro, 2008). La expresión del gene es regulada por un promotor sencillo que contiene 2 sitios de iniciación de la transcripción localizados en una región con 13 pares de bases. Así como otros receptores nucleares de esteroides, los RA tienen dominios funcionales diferentes para el ligando, el sitio de unión al ADN y la activación transcripcional, así como para la secuencia señal de localización nuclear (Becerro, 2008; Jenster *et al.*, 1991).

### Receptor de estrógenos

Para ejercer sus efectos biológicos, los estrógenos interactúan con receptores específicos de estrógenos (Carreau *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2001). El receptor de estrógenos pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares, que incluye también a los receptores para hormona tiroidea, ácido retinoico y vitamina D (Tsai y O'Malley, 1994). Se han identificado dos tipos de receptores de estrógenos, el receptor a estrógenos  $\alpha$  y el receptor a estrógenos  $\beta$ . Ambos receptores funcionan como factores de transcripción cuando están unidos a sus respectivos ligandos que por lo general, comparten características estructurales y funcionales (Nilsson *et al.*, 2001).

### Receptor a estrógenos $\alpha$

Contiene 595 aminoácidos y está constituido por diferentes dominios:

1. Dominio regulador: situado en las regiones A/B que contiene varios sitios de fosforilación.
2. Dominio central de unión al ácido desoxirribonucleico en la región C; activa la transcripción y produce el cambio conformacional necesario para interactuar con los elementos de respuesta a estrógenos.
3. Dominio en la región D; participa en el movimiento del receptor de estrógenos al núcleo después de su síntesis en el citoplasma.
4. Dominio de unión al ligando que se ubica en la región D en el extremo del carboxilo terminal.

El receptor a estrógenos  $\alpha$  contiene dos diferentes dominios de activación; el AF-1 localizado en el extremo amino terminal (región A/B) y el AF-2, localizado en el extremo carboxilo terminal (región E; figura 3).

#### Receptor a estrógenos $\beta$

Contiene 50 aminoácidos (Ogawa et al., 1998), tiene un dominio AF1 en su extremo amino terminal, este dominio es débil ya que se encuentra asociado con un dominio represor (Cowley y Parker, 1999) y un dominio AF-2 que funciona en forma independiente dentro del receptor.

La estructura de estos receptores es muy similar, con mayor grado de homología en el dominio DBD (95%) comparada con el dominio LBD (53%) y considerable divergencia en sus extremos amino terminal (Figura 3).

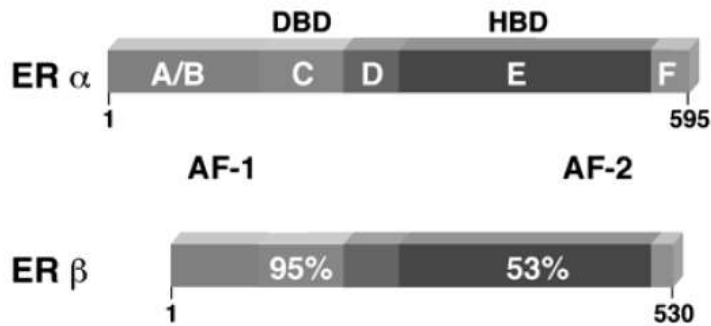


Figura 3. Estructura y dominios funcionales del receptor de estrógenos  $\alpha$  y el receptor a estrógenos  $\beta$ . DBD dominio de unión al ADN y LBD dominio de unión al ligando. Modificado de Osborne et al. 2000.

Diversos estudios muestran que los estrógenos se unen a lo largo de todo el sistema reproductor del macho. Los receptores de estrógenos se expresan de manera diferente dependiendo del tejido (Warner et al., 2003).

#### **Expresión de los receptores de estrógenos en la hembra**

El receptor a estrógenos  $\alpha$  se encuentra fundamentalmente en el endometrio, la mama y el estroma ovárico, y el receptor a estrógenos  $\beta$  predomina en las células granulosas ováricas, los riñones, la mucosa intestinal, el parénquima pulmonar, la médula ósea, el hueso, el cerebro y las células endoteliales (Gruber et al., 2002; Nilsson et al., 2001).

#### **Expresión de los receptores de estrógenos en el macho**

Los receptores a estrógenos  $\alpha$  se expresan en las células de Leydig en roedores (Saunders et al., 1998; Bilinska et al., 2001) y primates (Pelletier y El-Alfy, 2000).

Los receptores a estrógenos  $\beta$  se expresan en las células de Sertoli, espermatogonias y en la línea espermática; espermaticitos, espermátides y espermatozoides en roedores (Saunders et al., 1998; Bilinska et al., 2001) y primates (Pelletier y El-Alfy, 2000; Saunders et al., 2001; Saunders et al., 2002; Makinen et al., 2001; Lambard et al., 2004 y Aquila et al., 2004).

La unión de los estrógenos a los receptores a estrógenos del epidídimo se observa en diferentes especies incluyendo el perro (Younes et al., 1979; Younes y Pierrepoint, 1981), el humano (Murphy et al., 1980), la tortuga (Dufaure et al., 1983), el mono (Kamal et al., 1985; West y Brenner, 1990), el carnero (Tekpetey y Amann, 1998), el cobayo (Danzo et al., 1981) y la rata (Kuiper et al., 1997).

### **Efectos fisiológicos de los esteroides sexuales**

Tanto machos como hembras producen andrógenos y estrógenos; aunque sus cometidos más importantes se relacionan con la reproducción, los tejidos diana sobre los que actúan las hormonas sexuales son numerosos y se hallan presentes en los individuos de ambos géneros, como por ejemplo: huesos, sistema vascular, sistema nervioso central, gastrointestinal, genitourinario, inmunitario, piel, pulmones, riñones y aparatos reproductores del macho y la hembra.

#### Andrógenos

La secreción de andrógenos por los testículos durante la vida embrionaria y la vida neonatal es responsable del crecimiento inicial y la diferenciación de



muchos órganos del tracto reproductivo del macho, como los conductos de Wolff, el seno urogenital, y el primordio genital externo (Griffin y Wilson, 1998). Los andrógenos son responsables del fenotipo masculino durante la embriogénesis, y de la maduración sexual en la pubertad. En la edad adulta son necesarios para el mantenimiento de la función reproductiva y la conducta sexual. Además, ejercen efectos metabólicos sobre las proteínas, carbohidratos y grasas, por lo que participan en el mantenimiento de la masa y la fuerza de los músculos, e intervienen en la regulación del hueso y de la masa grasa. En los órganos sexuales y glándulas accesorias como la próstata la testosterona se convierte a DHT (Bruchovski y Wilson, 1968).

### Estrógenos

Los estrógenos promueven características sexuales femeninas secundarias, estimulan el crecimiento del endometrio, del útero y del tejido mamario, regulan el ciclo menstrual, aceleran el crecimiento del cuerpo, disminuyen la masa muscular, aumentan el metabolismo de las grasas, intervienen en el mantenimiento de los vasos sanguíneos; en la piel favorecen el crecimiento del vello y de las uñas, disminuyen la resorción del hueso y aumentan su formación. También elevan los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), los de antitrombina III y los del plasminógeno, mientras disminuyen los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), reducen la motilidad intestinal, incrementan la hormona corticotrópica y el cortisol, e intervienen en las funciones cerebrales.

La síntesis de estrógenos y la expresión de la P450 aromatasa en el cerebro es necesaria para un comportamiento sexual normal. La aromatasa en el cerebro ha sido extensamente estudiada en ratas.

La presencia de estrógenos en el macho y su potencial importancia en el sistema reproductor masculino ya fue notada a principios de 1940. La referencia a los estrógenos en el macho por la mayoría de los científicos

apareció al principio más como curiosidad que como una sugerencia seria de la función endocrina de este esteroide en el macho. Uno de los puntos que modificó este concepto fue el descubrimiento de que la P450 aromatasa estaba presente y muy activa en los testículos (Danzo et al., 1975, 1977 y 1978). Otro aporte importante en este sentido fue la demostración de los efectos del tratamiento con dietilestilbestrol durante la gestación en el ratón macho (McLachlan et al., 1975). Estos descubrimientos abrieron la puerta a investigaciones sobre el papel potencial de los estrógenos en el macho adulto, y los efectos a largo plazo de la exposición a compuestos estrogénicos durante el desarrollo (Sharpe et al., 2003; Wistuba et al., 2003).

Nitta et al., 1993 demostró que las células germinales y los espermatozoides en el epidídimo sintetizan estrógenos; por otra parte se encontró que el macho knockout a RE es infértil y que el conducto eferente es anormal (Eddy et al., 1996; Lubahn et al., 1993). Se demostró que los estrógenos regulan la reabsorción de fluidos por el epitelio del conducto eferente, y que un antiestrógeno puro inhibía el transporte de sodio y agua en el tracto reproductivo del macho (Hess et al., 1997; Lee et al., 2000; Zhou et al., 2001). El  $17\beta$  estradiol en la sangre del macho proviene primariamente de células como los adipocitos y las de leydig que expresan aromatasa y sintetizan activamente  $17\beta$  estradiol en mayor cantidad a la observada en las células de Sertoli adultas (Carreau et al., 1999; Levallet et al., 1998; Levin, 2002). Estas células producen el  $17\beta$  estradiol al menos parcialmente para acciones locales (Sharpe, 1998 y Simpson *et al.*, 1999). En el macho inmaduro la célula de Sertoli es la fuente primaria de estrógenos (van der Molen et al., 1981).

### **Deficiencia de estrógenos**

Los estrógenos ejercen un amplio rango de efectos biológicos en ambos sexos y también sobre sistemas no reproductivos y órganos. La deficiencia congénita de estrógenos, debido a una mutación inactivante del gen de la aromatasa,

lleva a la pérdida de la síntesis de estrógenos, con los niveles de testosterona y gonadotropinas circulantes normales o elevados.

Las hembras deficientes en aromatasa muestran hiperandrogenismo y virilización al nacimiento con genitales ambiguos. Durante la infancia hay una disfunción en los ejes LHRH-LH/FSH y un retraso progresivo de la edad ósea (Zirilli *et al.*, 2008). En el caso de los machos, la deficiencia congénita de estrógenos debida a una mutación inactivante del gen de la aromatasa lleva a la pérdida de la síntesis de estrógenos, con los niveles de testosterona y gonadotropinas circulantes normales o elevados (Zirilli *et al.*, 2008). El fenotipo en machos comprende crecimiento lineal aumentado y retraso en la edad ósea, osteopenia/osteoporosis, proporción de eunuco del cuerpo y discapacidad fértil. Estos fenotipos sugieren el papel fisiológico de los estrógenos en el esqueleto, sobre la función de la hipófisis, sobre el sistema reproductivo y en el metabolismo de la glucosa, siendo el mecanismo preciso de cada una de estas funciones poco conocido en detalle. El tratamiento de reemplazo con  $17\beta$  estradiol en el macho deficiente en estrógenos lleva a un completo cierre epifiseal y a la maduración del esqueleto. En el caso del perro, la actividad de la P450 aromatasa es un marcador de los tumores en las células de Sertoli (Peters *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que el ratón macho con knockout del receptor de estrógenos (ERKO) es infértil (Lubahn *et al.*, 1993), lo que sugiere que los RE se requieren para un funcionamiento normal del sistema reproductor del macho. Aunque el testículo ERKO parece normal antes de la pubertad, después del inicio de la espermatogénesis los testículos se empiezan a degenerar y eventualmente se atrofian (Eddy *et al.*, 1996). A los 150 días la cola de los espermatozoides de los ratones ERKO era anormal y las concentraciones espermáticas se encuentran significativamente reducidas (Eddy *et al.*, 1996), sugiriendo anomalías en el tracto reproductivo. En los ratones ERKO la rete testis está dilatada y protruye dentro del testículo, lo que

indica que el conducto deferente se dilata debido a una inhibición de la reabsorción de fluidos (Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997).

Sobre estas bases, es razonable postular que los estrógenos jueguen un papel fisiológico importante en machos (Carreau *et al.*, 2006 y Hess, 2003). Esto es consistente con lo visto en todas las especies domésticas estudiadas a la fecha, donde la diferencia entre masculinidad y femineidad no es una en absoluto, sino que está gobernada por un sutil balance de los rangos de acciones estrogénicas y androgénicas.

### **Regulación de la P450 aromatasa**

La regulación y expresión de la P450 aromatasa en las gónadas difiere de lo que ocurre en el cerebro. En los ovarios de la cerda (Hunter *et al.*, 1994) y de la rata (Stocco, 2008), así como en los testículos de caballo (Seralini *et al.*, 2003), las gonadotropinas (FSH y LH), actúan incrementando las concentraciones de AMP cíclico (cAMP) para inducir la expresión de P450 aromatasa. Por el contrario, en el cerebro, los agentes que incrementan las concentraciones intracelulares de cAMP causan una disminución en la actividad de la aromatasa, mientras que los andrógenos pueden actuar para inducir la expresión del gene (Conley y Hinshelwood, 2001).

### **Reguladores e inhibidores de las rutas esteroideogénicas**

La P450 puede ser regulada a través de los siguientes elementos:

#### Glucocorticoides (GC)

Los glucocorticoides regulan una variedad de funciones de crecimiento, metabólicas, del desarrollo e inmunológicas. Juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y son en parte responsables de la

respuesta al estrés (Charmandari et al., 2004). Los principales GC son el cortisol y la corticosterona. Estas moléculas esteroides alcanzan todos los tejidos, incluyendo al cerebro (Chrousos y Kino, 2009). Los receptores para GC se encuentran en la mayoría de las células.

Respecto a las rutas esteroidogénicas en gónadas se ha encontrado que los glucocorticoides, como el cortisol, modulan a la enzima P450-aromatasa, estimulándola en las células adiposas en el caso de las mujeres e inhibiéndolas en los hombres (McTernan et al., 2002).

### Ácido retinoico

La vitamina A (retinol) y sus derivados, conocidos colectivamente como retinoides, son importantes reguladores de la visión, embriogénesis, reproducción, inflamación, crecimiento y diferenciación.

La síntesis de hormonas esteroides es estimulada por los retinoides en las células de órganos esteroidogénicos periféricos. En células de Leydig de ratón, los retinoides estimulan la expresión génica y la función del promotor de la proteína StAR así como la esteroidogénesis (Lee et al., 1999). El nivel de mRNA de P450<sub>17a</sub> es promovido por el ácido retinoico all-trans en la línea de células de Leydig de ratón K9 (Lefevre et al, 1994). La expresión de genes de StAR, P450<sub>17a</sub> y P450<sub>scc</sub> y la producción de testosterona y dehidroepiandrosterona son estimuladas por ácido retinoico all-trans o 9-cis en células de la teca del ovario del humano (Wickenheisser et al., 2005). También se ha encontrado que los niveles de mRNA de P450<sub>17a</sub>, P450-aromatasa y del receptor de estrógenos  $\beta$  en cortes de cerebro de ratas se incrementa por tratamientos con ácido retinoico 9-cis (Munetsuna et al., 2009).

### Inhibidores de P450-aromatasa

Se han desarrollado diversos inhibidores de la P450-aromatasa que pueden ser utilizados para regular en forma artificial la actividad de esta enzima.

Estos inhibidores han sido divididos en dos categorías basados en su estructura y su mecanismo de acción, llamados inhibidores esteroideos y no esteroideos. Los inhibidores esteroideos (exemestane, formestane) son derivados de la androstenediona, que es un sustrato natural de la aromatasa, y compiten con ésta por el sitio activo de la enzima; donde se unen en forma irreversible causando su inactivación permanente aún después de que la droga ha sido eliminada de la circulación (Buzdar et al., 2002). Los inhibidores no esteroideos (aminoglutetimida, fadrazol, anastrozol, letrozol) tienen un grupo funcional triazol que interactúa directamente con el sitio activo hierro heme en el citocromo P450 formando un fuerte pero reversible enlace covalente que inhibe a la aromatasa, excluyendo efectivamente a los ligandos endógenos (testosterona y androstenediona) e inhibiendo casi completamente la producción de estrógenos (Buzdar et al., 2002).

#### *Formestane*

El formestane p 4-hidroxiandrostenediona es un inhibidor competitivo de la aromatasa que reduce los niveles plasmáticos de estrógenos y que ha mostrado actividad antitumoral en mujeres con menopausia y con cáncer de seno (Wiseman y Goa, 1996). Se observa una reducción significativa de los niveles séricos de  $17\beta$  estradiol después de una aplicación intramuscular de formestane en mujeres con cáncer de seno. El formestane es efectivo como una segunda línea de tratamiento para cáncer de seno en mujeres con menopausia natural o artificial, presenta ventajas sobre inhibidores de aromatasa de generaciones anteriores, como la aminoglutetimida (Wiseman y McTavish, 1993).

### *Letrozol*

Es un inhibidor de aromatasa de tercera generación no esterooidal que bloquea efectivamente la producción de estrógenos sin producir los efectos de otros inhibidores esteroideos. El Letrozol inhibe la actividad de la aromatasa intracelular en los principales sitios donde se encuentra, con lo que al inhibir la aromatización efectivamente bloquea la síntesis de estrógenos.

La estructura química del Letrozol es (4-4'-[(1H-1,2,3-triazol-1-yl) metileno] bis-benzonitrilo). El Letrozol es un potente inhibidor de aromatasa *in vitro* e *in vivo* en animales y en humanos. El Letrozol inhibe la aromatasa en células de roedores, fibroblastos humanos, y líneas celulares de cáncer (Bhatnagar et al., 2001).

El letrozol es altamente selectivo y no afecta significativamente al cortisol, la aldosterona o la tiroxina (Haynes et al., 2003); adicionalmente, los efectos antitumorales de letrozol han sido demostrados en varios modelos animales (Haynes et al., 2003; Bhatnagar et al., 1996; Brodie et al., 1999).

## JUSTIFICACIÓN

Recientemente nuestro laboratorio ha estado interesado en el estudio de aspectos endocrinos en la cabra doméstica, con especial atención en los estrógenos. En esta especie se ha encontrado que la estrona predomina sobre el  $17\beta$  estradiol en el periodo peripuberal de la hembra y se estudió la regulación de la síntesis de esteroides sexuales en el ovario (Bobes et al., 2003; Pérez-Martínez et al., 1999; Velázquez et al., 2006). También se clonó la P450-aromatasa a partir del ovario de la cabra (Bobes, *et al.* 2004) y posteriormente se estudió la expresión y distribución celular del RNAm de P450-aromatasa en la placenta durante la gestación (Mondragón *et al.*, 2007). Actualmente se trabaja en la expresión de la aromatasa y en los factores que una vez expresada la enzima regulan la producción de esteroides placentarios y del ovario durante la gestación de la cabra.

Sin embargo, en el macho cabrío no existe información sobre la biosíntesis de estrógenos, ni sobre la expresión y distribución de la aromatasa en el adulto ni en el desarrollo del testículo de estos animales. Se desconocen asimismo los factores que regulan la síntesis de estrógenos en el testículo, y los promotores específicos involucrados.



## **HIPÓTESIS**

El testículo del macho cabrío sintetiza estrógenos en el período peripuberal, expresando la enzima P450-aromatasa en las células de Sertoli y las células de Leydig, y el bloqueo de la síntesis de este esteroide produce alteraciones en el eyaculado y en la conducta agonista.

## OBJETIVO

Investigar el desarrollo peripuberal del testículo, las vías de síntesis de estrógenos, la expresión de la P450 aromatasa y el efecto de la inhibición de la misma en parámetros reproductivos de machos cabríos.

### Objetivos particulares I

- Investigar la concentración de  $17\beta$  estradiol y testosterona en el plasma de machos cabríos desde el nacimiento hasta el año de edad.
- Estudiar *in vitro*, mediante TLC, las vías de síntesis de estrógenos en el testículo de machos cabríos de diferentes edades.
- Estudiar *in vitro* el efecto del inhibidor de la P450 aromatasa (formestane), durante el desarrollo del testículo del macho cabrío.
- Estudiar la expresión y la distribución celular de la P450-aromatasa en el testículo del macho cabrío por RT-PCR *in situ* durante el desarrollo postnatal.

## **Objetivos particulares II**

- Investigar el efecto del inhibidor de P450 aromatasa, letrozol, sobre el perfil sérico de testosterona y  $17\beta$  estradiol en el macho cabrío adulto.
- Investigar el efecto del letrozol sobre la conducta agonista en un rebaño de machos cabríos establecido.
- Investigar el efecto de letrozol sobre parámetros del eyaculado del macho cabrío.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Parte 1

#### Animales y preparación del tejido testicular

Para el estudio se utilizaron testículos de macho cabrío de la raza Saanen (*Capra hircus*), clínicamente sanos, obtenidos durante la estación no reproductiva de la especie por castración de tres machos cabríos cada mes desde el nacimiento hasta los seis meses de edad, para un total de 24 muestras.

Los animales fueron mantenidos en estabulación total y la alimentación consistió de avena, concentrado y alfalfa en cantidades acordes a sus requerimientos calculados según indicaciones del National Research Council (NRC, 1981). El agua se aportó a libre acceso.

#### *Castración*

Inmediatamente después de obtener los pares de testículos mediante castración en condiciones de asepsia, se enjuagaron repetidamente en solución salina fisiológica estéril, hecho lo cual se cortaron en porciones de menor tamaño, para posteriormente colocarlos dentro de un tubo Falcon. Uno de los testículos de cada macho se colocó en medio de cultivo DMEM con pH 7.6 y el otro en paraformaldehído al 4%. Ambos fueron transportados con hielo y refrigerante para ser procesados en el laboratorio. El testículo en medio de cultivo DMEM se utilizó para experimentos de metabolismo *in vitro* y para la obtención de células para cultivo. Los testículos fijados en paraformaldehído al 4% se deshidrataron en alcohol a diferentes concentraciones y posteriormente se incluyeron en parafina. A partir de la inclusión se realizaron

cortes de 5 micras que se fijaron en portaobjetos electrocargados para el estudio por RT-PCR *in situ* e inmunohistoquímica.

Para los estudios de RT-PCR *in situ* e inmunohistoquímica el testículo fue disecado en diferentes regiones: rete testis, ductos eferentes, ductos deferentes, y el epidídimo a su vez fue separado en cabeza, cuerpo y cola.

Adicionalmente se tomaron muestras sanguíneas mensualmente para estudiar el perfil hormonal de cada individuo desde el nacimiento hasta la pubertad. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción yugular utilizando tubos heparinizados (BD Vacutainer™) y agujas estériles (PrecisionGlide™, 21x38mm), y fueron almacenadas a -27° C hasta su procesamiento mediante un enzimo inmunoensayo (EIA) utilizando kits comerciales como se detalla más adelante.

#### RT-PCR *in situ*

Los cortes de testículo se desparafinaron en un horno (entre 65- 70°C) y se colocaron dentro de una cámara con Xilol, enseguida en una cámara con etanol absoluto y se secaron a temperatura ambiente. Después se colocaron dentro de vasos coplin con H<sub>2</sub>O-DEPC, HCl 0.02N, PBS 1X (Buffer de fosfatos) y PBS IX–Triton X100 0.01% y al final, nuevamente en PBS 1X. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se les agregó la proteinasa K (PK 0.5µg/ml) y se le incubó a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Se lavaron los tejidos con H<sub>2</sub>O-DEPC y etanol absoluto. Después se les agregó una dilución 1:10 de DNasa libre de RNasa (Roche), en presencia de H<sub>2</sub>O-DEPC, Tris1M pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> y se dejaron dentro de la cámara húmeda a 37°C en incubadora por 24 horas. Luego, se lavaron con H<sub>2</sub>O-DEPC y etanol absoluto, se trataron con una solución de anhídrido acético al 0.25% más trietanolamina 0.1M, y después en ácido acético al 20% y nuevamente se lavaron con H<sub>2</sub>O-DEPC y etanol absoluto por dos minutos secando al aire.

Para la síntesis de la primera cadena (cDNA) se aplicó una reacción que contenía la retrotranscriptasa (RT) a cada uno de los tejidos (tratados anteriormente con DNasa), en presencia de H<sub>2</sub>O-DEPC, Buffer 5X, dNTPs 10mM, inhibidor de RNasa, Oligo (dt)<sub>12-18</sub>, (Invitrogen, USA) específico para retrotranscribir los mRNA correspondientes, DTT, SSII (Super Script II Reverse Transcriptase, Invitrogen, USA), con 20µl de la reacción y se dejaron incubar a 37°C por 2 horas. Los controles negativos que se manejaron no incluían SSII por lo que el volumen ocupado por la SSII fue sustituido por H<sub>2</sub>O-DEPC. Posteriormente se realizaron 2 lavados con H<sub>2</sub>O-DEPC y etanol absoluto.

#### PCR *in situ* (Amplificación)

Se utilizó el sistema GeneAmp *In situ* PCR 1000 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA). Se Agregó a cada tejido 50µl de la reacción PCR (H<sub>2</sub>O, Buffer, oligo sentido y oligo antisentido de la secuencia de aromatasa clonada en el laboratorio, DIG (PCR DIG, Roche, USA), MgCl<sub>2</sub> y finalmente se agregó la enzima Taq DNA polimerasa (Taq DNA Polymerase Recombinant, Invitrogen USA). Se cubrió cada tejido con la mezcla de reacción para PCR, se sellaron con los AmpliCover discs (Applied Biosystems, USA) y se introdujeron las laminillas en el GenAmp *In situ* PCR System 1000. Iniciándose el programa convenido para la amplificación del producto.

#### Detección de la señal

Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X, pH 7.4, se bloquearon las muestras con una solución de Tris 1M, pH 7.4, NaCl 4M, BSA (Serum Bovine Albumina, Sigma, USA) y H<sub>2</sub>O bidestilada y se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina (Anti- DIG, Roche, USA) acoplado a fosfatasa alcalina en presencia de H<sub>2</sub>O bidestilada, Tris 1M pH 7.4 y NaCl 4M. A continuación las

muestras se lavaron con H<sub>2</sub>O bidestilada, NaCl 4M, Tris 1M pH 7.4 y Tween 20 (Aldrion, USA) y, posteriormente se cubrieron con el Buffer de detección (H<sub>2</sub>O bidestilada, Tris 1M, pH 9.5, MgCl<sub>2</sub> 250mM y NaCl 4M).

El desarrollo de color azul-morado se logró incubando las muestras con el sustrato NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium/5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-phosphate). Se detuvo la reacción realizando 5 lavados con H<sub>2</sub>O bidestilada y después se dejaron secar. Finalmente, se montaron con medio de montaje no-acuoso para su posterior análisis por microscopía de luz.

#### Cromatografía en capa fina

Se siguió el procedimiento descrito por Gómez y cols. (2000) de uso en nuestro laboratorio. Al final de la incubación de las células en cultivo, se colectó el sobrenadante y se procedió a efectuar una doble extracción de los esteroides con éter frío, separando la fase orgánica y evaporándola a sequedad. Los esteroides se solubilizaron con etanol absoluto y se aplicaron en placas de sílica gel corriéndose con dos sistemas de solventes: benceno-metanol (9:1 v/v) y diclorometano-acetato de etilo (8:2 v/v). Los sustratos y metabolitos se identificaron por comparación con esteroides de referencia. Posteriormente fueron identificados por luz ultravioleta y con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%. Las regiones correspondientes con los estándares auténticos fueron recortadas y colocadas en viales con líquido de centelleo. Los resultados se expresaron en porcentaje de transformación neta.

#### Cultivo de células testiculares totales

Se retiró la albugínea de los testículos y el tejido se disgregó con colagenasa disuelta en DMEM. Se cuantificó el número de células de la suspensión y al mismo tiempo la viabilidad, utilizando azul tripan y una cámara de Neubauer.

Alíquotas de la suspensión celular se sembraron en cajas de cultivo de 35 mm en un medio compuesto de DMEM, 10% SBF y antibióticos. Se incubaron en una incubadora a 37°C con atmósfera de aire 95%, CO<sub>2</sub> 5%. Veinticuatro horas después se cambió el medio de cultivo por otro sin suero y se agregó el precursor tritiado correspondiente (<sup>3</sup>H-Androstenediona y <sup>3</sup>H-Testosterona). Las células se incubaron por diferentes tiempos en presencia o ausencia (vehículo) de los reguladores a probar y se obtuvo el medio que fue extraído con éter para procesarlo luego por TLC.

Se hicieron tinciones con la técnica de hematoxilina y eosina de las células adheridas para caracterizar el cultivo. Brevemente se colocó una gota de Eosina por 15 segundos, posteriormente se agregó una gota de Hematoxilina por un minuto y medio, se lava el cultivo con agua corriente, PBS 1X por 30 segundos, después agua bidestilada por un minuto dejándose secar por un día para finalmente montar en Permount.

#### Inmunohistoquímica

Para la localización de la enzima 3β-hidroxiesteroide dehidrogenasa, cultivos de células testiculares fueron cubiertos con una solución de nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y β nicotinamida adenin nucleotido (NAD<sup>+</sup>; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) utilizando como precursor androstenediona (Steraloids, Wilton, NH, USA). Los cultivos fueron fijados en paraformaldehído al 10% y lavado con PBS por 10 minutos. Posteriormente se montaron los cultivos, fueron observados al microscopio y fueron fotografiados (Fernández et al., 2008). Este procedimiento nos permitió identificar a las células esteroideogénicas en el cultivo.



### Enzimo inmunoensayo (EIA)

Se midieron las concentraciones séricas de las siguientes hormonas: 17 $\beta$ -estradiol, y testosterona por EIA.

### Validación del ensayo

Las concentraciones de 17 $\beta$  estradiol y testosterona fueron determinadas por un EIA de fase sólida en micro placas de titulación. El antisuero contra 17 $\beta$  estradiol (R4972 del Laboratorio de Endocrinología Clínica de la Universidad de California de Davis) y el conjugado de 17 $\beta$  estradiol (17 $\beta$  estradiol horseradish peroxidase) fue usado para las determinaciones de 17 $\beta$  estradiol. La reacción cruzada del anticuerpo fue de 3.3% para estrona, 0.8% para progesterona, 1.0% con androstenediona y menos de 1.0% con otros esteroides

La concentración de testosterona fue determinada por un EIA usando el antisuero antitestosterona 6 carboximetil oxime (156/7 del Laboratorio de Endocrinología Clínica de la Universidad de California de Davis) y el conjugado de testosterona (testosterona 3-carboxi-metil oxime; horseradish peroxidasa). La reacción cruzada del anticuerpo fue de 5.7% con 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, 0.27% con androstenediona, 0.04% con DHEA y menos de 1% con otros esteroides.

La sensibilidad del ensayo fue de 4.9 pg/ml para 17 $\beta$  estradiol y de 0.20 ng/ml para testosterona. Los coeficientes de variación fueron de 3.07% (n=5) y 6.5% (n=6) para 17 $\beta$  estradiol y 4.5% (n=5) y 8.0% (n=6) para testosterona respectivamente.

Para la validación del ensayo se verificó el paralelismo para cada hormona comparando las curvas de diluciones seriadas de 5 diferentes muestras séricas contra la correspondiente curva estándar. Las diferencias en las curvas

no fueron significativas (testosterona  $F=0.755$ ;  $df=4$ ;  $P=0.085$ ;  $17\beta$  estradiol  $F=0.565$ ;  $df=4$ ;  $P=0.050$ ). El pico de la curva estándar contra las muestras séricas exhibieron una elevada correspondencia (testosterona  $R^2=0.999$ ;  $17\beta$  estradiol  $R^2=0.998$ ).

## **Parte 2**

El experimento se desarrolló en una granja localizada en la ciudad de México. Se estudiaron 12 machos cabríos adultos de un año de edad de la raza Saanen para investigar los efectos del letrozol *in vivo*. Se formaron dos grupos al azar de seis animales cada uno antes del inicio del experimento, uno como control y otro como grupo tratado con letrozol.

El experimento se realizó durante la época no reproductiva de la especie, ambos grupos permanecieron en el mismo corral desde el inicio hasta el término del experimento.

### Alimentación

Los machos cabríos fueron alimentados con concentrado comercial (una vez al día) y sales minerales de acuerdo a los requerimientos de la especie, adicionalmente recibieron avena y alfalfa y agua *ad libitum*.

### Tratamiento con letrozol

Los animales del grupo tratado recibieron letrozol (Femara® Tabletas 2.5 mg- Novartis Pharmaceuticals Corporation), por vía oral, a una dosis de 2.5 mg/día/macho durante 15 días, mientras que a los del grupo control se les administró un placebo consistente en pellets de concentrado, de la misma manera.

### Muestreo sanguíneo

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de la vena yugular cada tercer día, iniciando cuatro días antes del inicio del tratamiento con letrozol, durante el

tratamiento, y cuatro días después de finalizarlo. Fueron obtenidas usando tubos que contenían activador del coágulo (BD Vacutainer® SST™ Tube) y agujas estériles (PrecisionGlide®, 21x38mm).

Una vez tomada la muestra se mezcló cinco veces gentilmente mediante cinco inversiones del tubo, el cual posteriormente fue colocado en posición vertical para formar el coágulo, se colectó el suero y se colocó en el congelador a -20° C hasta que fue procesado mediante EIA para detectar 17β estradiol y testosterona.

#### Enzimo inmunoensayo (EIA)

Se midieron las hormonas 17β estradiol y testosterona en la forma anteriormente descrita.

#### Estudio del comportamiento

El comportamiento de los machos cabríos fue registrado diariamente por seis días antes (para conocer el comportamiento habitual del rebaño) y seis días después del tratamiento con letrozol, durante 3 horas al día (10:00 a 13:00 horas) para registrar todas las interacciones agonistas y determinar los niveles de agresión en el grupo.

Los comportamientos registrados fueron:

- A) Topeteos. Cuando el macho cabrío utiliza la cabeza para hacer contacto con otro.
- B) Persecuciones. Cuando un macho cabrío se mueve hacia otro provocando el desplazamiento de este último.
- C) Amenazas. Cuando un macho cabrío se acerca a otro con la clara intención de agredir sin contacto y provoca el desplazamiento del otro.
- D) Evasión. Cuando un macho cabrío se mueve lejos de otro con o sin interacción previa entre ambos.

Se registró cada interacción; cuando uno de los dos animales desplaza al otro al final de la interacción se convierte en ganador y el otro en perdedor, esta información fue usada para calcular el Índice de éxito (IE) en las interacciones agonistas con otros miembros del rebaño.

El Índice de éxito de cada macho cabrío fue calculado usando la siguiente fórmula.

$$IE = \frac{\text{Número de machos cabríos que es capaz de desplazar}}{\text{Número de machos cabríos que un individuo desplaza} + \text{Número de machos cabríos que desplazan al individuo}}$$

Número de machos cabríos que un individuo desplaza + Número de machos cabríos que desplazan al individuo.

El IE de cada macho cabrío estuvo en el rango de 0 a 1. De acuerdo a su IE los animales se clasificaron en tres categorías:

1. Dominancia alta. Machos cabríos cuyo IE fue de 0.7 a 1.0.
2. Dominancia media. Machos cabríos cuyo IE fue de 0.69 a 0.31.
3. Dominancia baja. Machos cabríos cuyo IE fue de 0.30 a 0.

Con esta información se construyó una matriz de dominancia y en ella se pudo observar la linealidad de la jerarquía basada en rangos de dominancia.

#### Circunferencia escrotal

La circunferencia escrotal fue medida con una cinta métrica en la parte más ancha del escroto, con el animal de pie. La medición se realizó cada cuatro días.

#### Colección de semen

El semen fue colectado por vagina artificial cada cuatro días. Después de la colección, el eyaculado fue inmediatamente sumergido en un baño maría a 37° C para su estudio.

### Evaluación Seminal

Las características del semen fueron evaluadas inmediatamente después de su colección. Se revisó el color, el volumen, el movimiento en masa e individual con la ayuda de un microscopio óptico de luz SWIFT (Instruments International model M1000-D). El color fue evaluado inmediatamente después de su colección, y el volumen del eyaculado fue medido en el tubo colector (un tubo cónico graduado).

### Movimiento en masa

El porcentaje de espermatozoides móviles fue estimado observando una gota de semen colocada en un portaobjetos precalentado a 37° C conteniendo buffer fosfato salino (PBS) precalentado en una dilución 1:1 (v:v). Posteriormente fue evaluado en el microscopio de luz en los aumentos de 10X y 40X. La motilidad se clasificó de uno a cinco, siendo 1 la motilidad más lenta y 5 la motilidad en masa más rápida.

### Movimiento individual

La motilidad espermática se evaluó en una dilución de semen 1:4 (v:v) con PBS precalentado a 37° C y colocado en un portaobjetos precalentado que se cubrió con un cubreobjetos para ser observado a un aumento de 100X. Se evaluó el movimiento progresivo del espermatozoide, este movimiento fue estimado en valores de 0 a 100%.

### Concentración espermática

Fue medida usando una cámara de Neubauer y ajustando la concentración espermática a  $35 \times 10^6$  espermatozoides por ml (concentración A). Esta concentración fue usada para continuar con los análisis de viabilidad e integridad acrosomal.

### Viabilidad espermática

La viabilidad fue evaluada utilizando la tinción de eosina nigrosina, modificada por Bamba (1988). La eosina nigrosina se obtuvo del laboratorio Certistain® MERCK (Darmstadt, F.R. Germany). A  $10 \mu\text{l}$  de la concentración espermática A se le agregaron  $10 \mu\text{l}$  del colorante eosina nigrosina a  $37^\circ \text{C}$  (0.67 gramos de eosina amarilla, 5 gramos de nigrosina, 40 ml de glucosa al 5%, en 100 ml de agua bi-destilada). Posteriormente los frotis se colocaron en portaobjetos a  $37^\circ \text{C}$  y se secaron al aire. Se montaron en resina y se les colocó un cubreobjetos para realizar el conteo, donde 100 espermatozoides al azar fueron diferenciadas entre vivos (no teñidos) y muertos (parcial o totalmente teñidos), (Gutiérrez-Pérez et al., 2009).

### Integridad acrosomal

Para evaluar la integridad acrosomal, se utilizó el protocolo propuesto por Larson y Miller (1999). Para este propósito, se adicionaron  $20 \mu\text{l}$  de la concentración espermática A a  $20 \mu\text{l}$  de paraformaldehído 4% (v:v) y se incubó la suspensión por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron inmediatamente lavadas en dos ocasiones con PBS por centrifugación (735 g por 10 minutos, centrifuga Eppendorf S415C) y el pellet fue reconstituido en cloruro de amonio (50mM en PBS) para preparar los frotis.

Las preparaciones fueron secadas al aire y teñidas por inmersión con la tinción azul brillante de Coomasie (ABC) (AMRESCO, Solon, OH, USA), 0.22% de ABC, 50% de metanol, 10% ácido acético en agua bidestilada. Los frotis fueron lavados dos veces por inmersión en agua bidestilada para remover el exceso de la tinción, secados al aire y montados con resina y cubreobjetos para su posterior conteo en el microscopio de luz. Se contaron cien células y fueron clasificadas de acuerdo a la integridad del acrosoma como sigue: intactas (bien definidas, acrosomas altamente teñidos), dañadas (acrosoma difusamente teñido, con pérdida de la continuidad y/ o pérdida de material) y ausente (sin acrosoma detectado), (Gutiérrez-Pérez et al., 2009).

### **Análisis estadístico**

La información fue analizada usando Prism version 4.2003 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). La información es presentada como media  $\pm$  Error Estándar de la Media. Los valores de probabilidad  $p < 0.05$  fueron considerados como significantes.

#### Parte 1

El análisis estadístico para las concentraciones hormonales en suero fue realizado utilizando la prueba estadística de ANOVA y la no paramétrica Kruskal-Wallis post test.

La prueba de comparaciones múltiples de Dunn, y la prueba de T no pareada fue usada e para comparar las concentraciones de las diferentes dosis de Formestane contra el grupo control.

Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces y desarrollados por cuadruplicado.



## Parte 2

La información fue analizada usando análisis de varianza, la prueba t para muestras relacionadas y la prueba de Duncan.

Para analizar el comportamiento se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis and Mann-Whitney.

## RESULTADOS

### Parte 1

#### Concentraciones séricas de testosterona

Los resultados obtenidos muestran que no hubo cambios significativos en las concentraciones séricas de testosterona durante los primeros cuatro meses de vida, cuando fueron en promedio menores a 1 ng/ml. Se observó un pequeño pico a los 5 meses y otro más importante a los 10 meses, cuando alcanzaron valores de 5 ng/ml; subsecuentemente disminuyeron a 2.5 ng/ml a la edad de un año (Figura 4A).

#### Concentraciones séricas de 17 $\beta$ estradiol

Las concentraciones séricas de 17 $\beta$  estradiol fueron detectables y bajas desde el 0.5 mes a los dos meses, pero se presentó un pico significativo a los tres meses de edad ( $p < 0.05$ ). Hacia los 10 meses se presentó otro pico que alcanzó en promedio los 50 pg/ml, en coincidencia con el incremento en las concentraciones séricas de testosterona (Figura 4B).

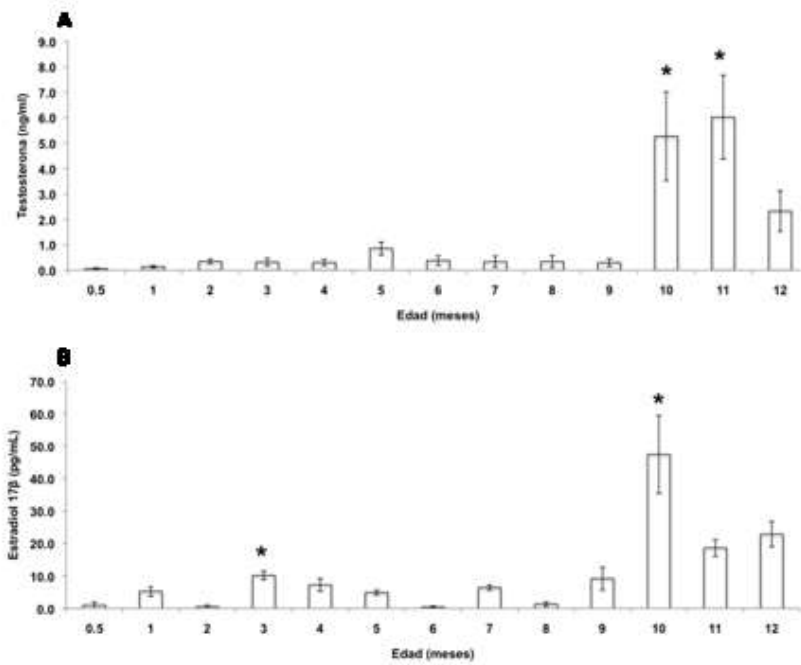


FIGURA 4. Concentraciones séricas de testosterona y 17β estradiol durante el desarrollo postnatal del testículo de macho cabrío. A) Concentraciones séricas de testosterona (ng/ml). B) Concentraciones séricas de 17β estradiol (pg/ml). Los datos son representados por la media ± EE. La muestra mensual fue de 12 machos cabríos. (\* P<0.05).

Síntesis de testosterona y estrógenos usando androstenediona tritiada como precursor

La incubación de  $^3\text{H}$ -Androstenediona con células testiculares obtenidas de machos cabríos de 4 meses de edad resultó en la transformación de: A) Testosterona tritiada (4 horas  $53.96 \pm 4.46$  y a las 24 horas  $57.3 \pm 1.83$ ). B)  $17\beta$  estradiol (4 horas  $2.55 \pm 0.63$  y a las 24 horas  $2.5 \pm 0.56$ ). Figura 5.

La transformación del precursor a testosterona fue mayor que a la de  $17\beta$  estradiol. No se detectó síntesis de estrona en ningún momento.

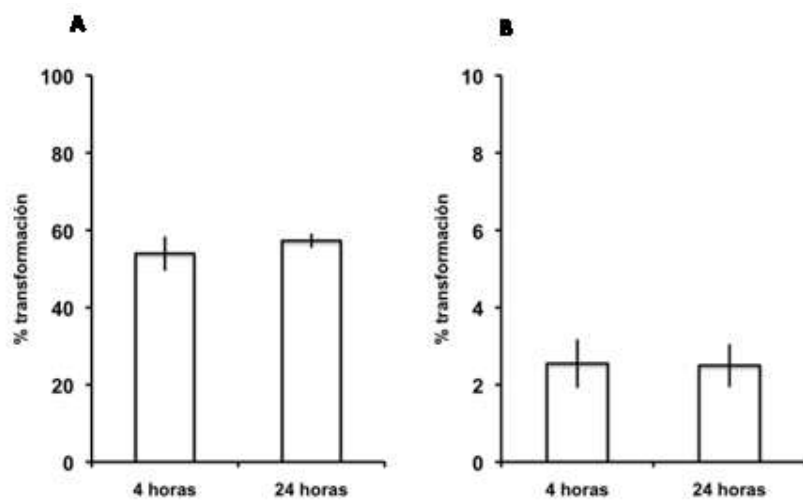


FIGURA 5. Síntesis de testosterona y estrógenos usando androstenediona tritiada como precursor. La síntesis de los metabolitos se expresa en porcentaje de transformación. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE.

### Síntesis de esteroides a partir testosterona tritiada

La figura 6 muestra que se detectó  $17\beta$  estradiol (A), androstenediona (B) y estrona (C). También se encontraron niveles traza de estriol (menos de 1% de transformación; la información no se muestra) cuando las células de machos cabríos de 4 meses de edad se incubaron por 2 y 4 horas con  $^3\text{H}$ -Testosterona.

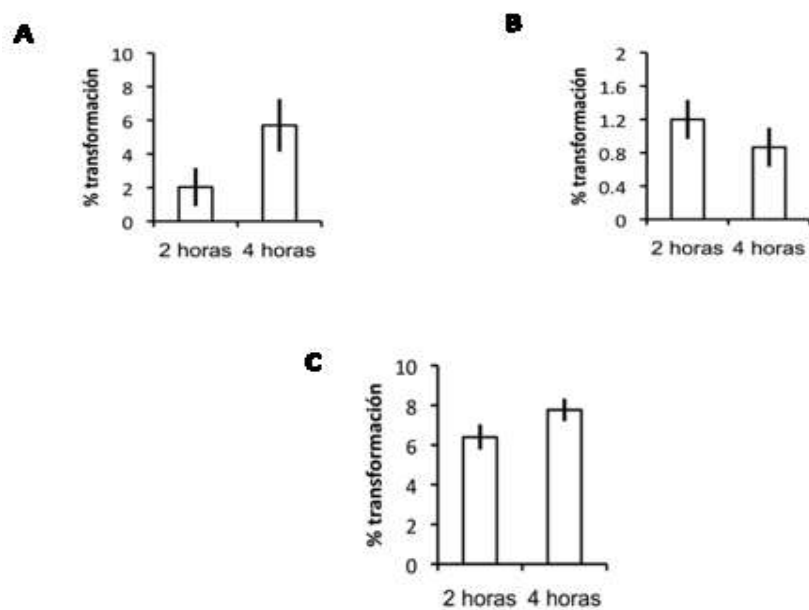
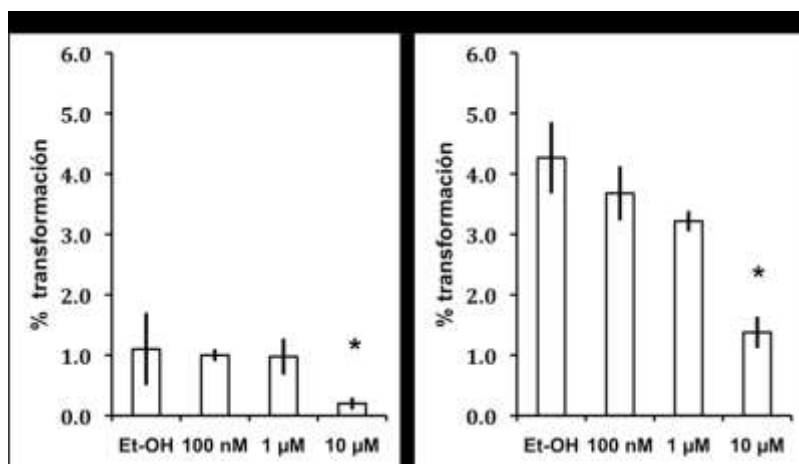


FIGURA 6. Síntesis de esteroides utilizando  $^3\text{H}$ -testosterona como precursor.

Síntesis de  $17\beta$  estradiol (A), estrona (B) y androstenediona (C) por células testiculares de macho cabrío de 4 meses de edad, después de 2 y 4 horas de incubación con  $^3\text{H}$ -Testosterona. La síntesis de los metabolitos se expresa en porcentaje de transformación. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE.

### Efecto del inhibidor de síntesis de estrógenos formestane

La incubación durante 24 horas de células testiculares de machos cabríos de 3 o 4 meses de edad en presencia del inhibidor formestane a diferentes dosis, redujo la síntesis de  $17\beta$  estradiol a partir de  $3\text{H}$ -Androstenediona, alcanzando significancia estadística a la concentración de  $10\mu\text{M}$  (Figura 7).



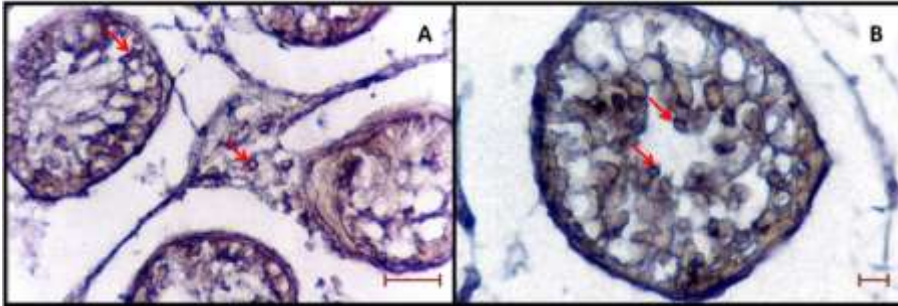
**FIGURA 7.** Efecto de formestane en la síntesis de  $17\beta$  estradiol por células testiculares de machos cabríos de 3 y 4 meses de edad. Las células fueron incubadas por 24 horas en DMEM en presencia de  $3\text{H}$  Androstenediona y diferentes dosis de formestane. A) Células testiculares de macho cabrío de 3 meses de edad. B) Células testiculares de macho cabrío de 4 meses de edad. La síntesis de los metabolitos se expresa en porcentaje de transformación. Los datos se representan con la Media  $\pm$  EE. ( $P < 0.05$  \*).

### Expresión del ARN mensajero de la P450 aromatasa en células testiculares de macho cabrío

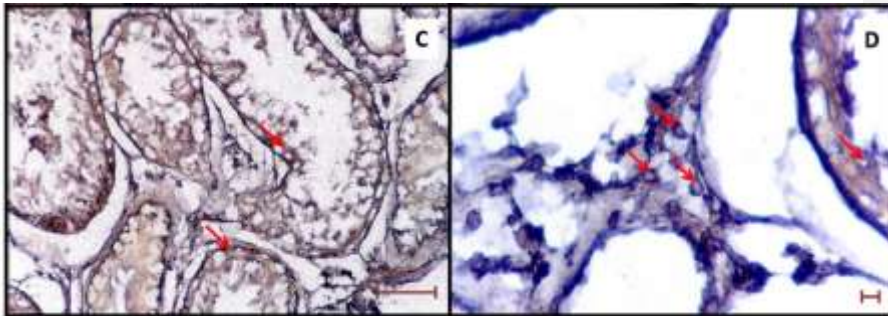
#### *RT-PCR In situ.*

La figura 8 (A y B) muestra la expresión del RNAm de la P450 aromatasa en células testiculares de machos cabríos de diferentes edades. La figura A muestra que a los tres meses de edad la señal se expresa en las células intersticiales y en el túbulo seminífero. En esta edad, la señal está localizada en las células parabasales del túbulo. En la figura B se muestra que a los 4 meses de edad la señal se extiende hacia la luz.

En las células testiculares de machos cabríos de 5 meses de edad (Figura 9 A y B), la señal fue más intensa en las células intersticiales (células de Leydig), y también estuvo presente en el túbulo seminífero (Figura C y D). Ambas figuras muestran a las células de Sertoli con expresión del RNAm de la P450 aromatasa cercano a la membrana basal del túbulo. No se encontró expresión en las espermatogonias.



**FIGURA 8.** Expresión del ARN mensajero de la P450 aromatasa en células testiculares de macho cabrío. Los tejidos fueron procesados por RT-PCR in situ. Las flechas indican células positivas a P450 aromatasa. A) 3 meses de edad, aumento 200X; la barra indica 50 $\mu$ m. B) 4 meses de edad, aumento 400X; la barra indica 10 $\mu$ m.

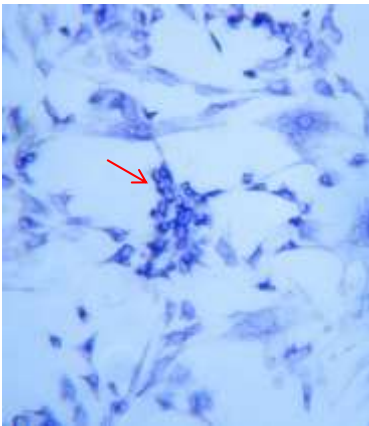


**FIGURA 9.** Expresión del ARN mensajero de la P450 aromatasa en células testiculares de macho cabrío. Los tejidos fueron procesados por RT-PCR in situ. Las flechas indican células positivas a P450 aromatasa. C) 5 meses de edad, vista panorámica; la barra indica 100 $\mu$ m. D) Detalle del espacio intersticial, aumento 400X; la barra indica 10 $\mu$ m.

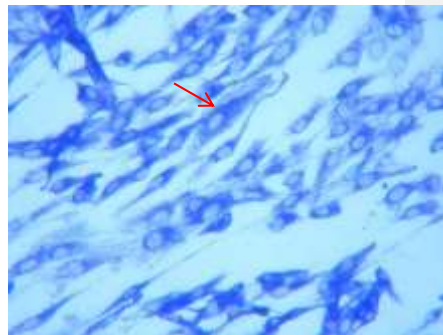


### Reacción histoquímica para detectar 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

La aplicación de la técnica histoquímica que identifica a las células esteroidogénicas mostró abundancia de gránulos azules en las células del espacio intersticial del testículo de cabra de 3 meses de edad en cultivo (Figura 10).



A) Células de Leydig, 200X.



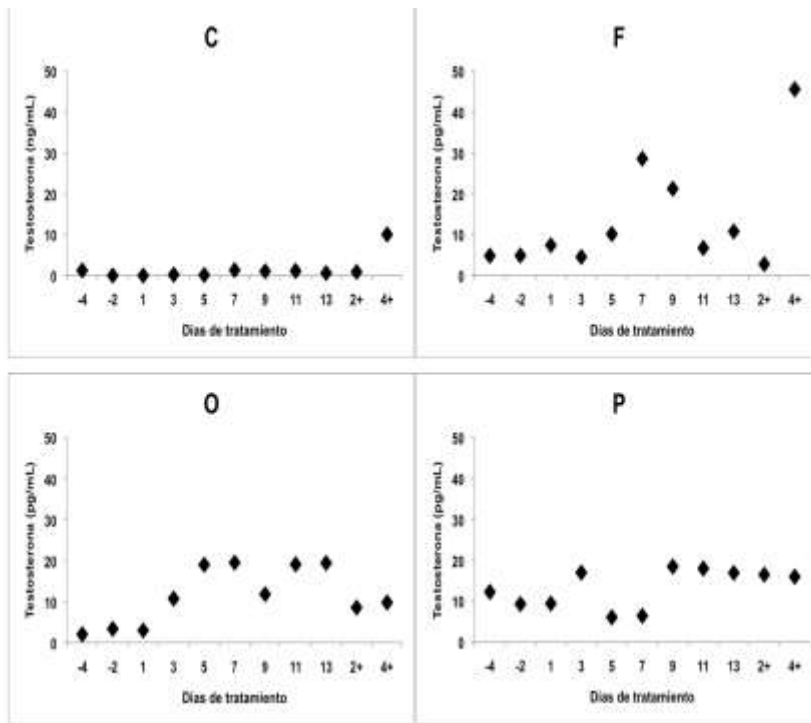
B) Células de Leydig, 400X.

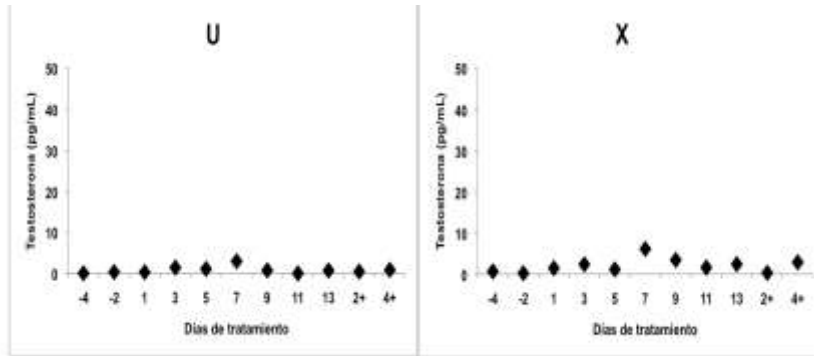
**Figura 10.** Células esteroidogénicas detectadas con la reacción histoquímica para 3 $\beta$ -hidroxi esteroide deshidrogenasa. Las células provenientes de testículo de cabrito de tres meses de edad se cultivaron y luego fueron sometidas a la técnica mencionada. Las flechas señalan a las células positivas a la reacción histoquímica.

## Parte 2

### Concentración sérica de testosterona por animal a lo largo del estudio con letrozol

Las concentraciones séricas de testosterona en el grupo control no fueron estadísticamente diferentes de los valores de letrozol antes del período de tratamiento y en los primeros dos días después del mismo (Figura 11). Sin embargo, en la mayoría de los animales se observó una tendencia a incrementar testosterona sérica después de 3 a 5 días de tratamiento.



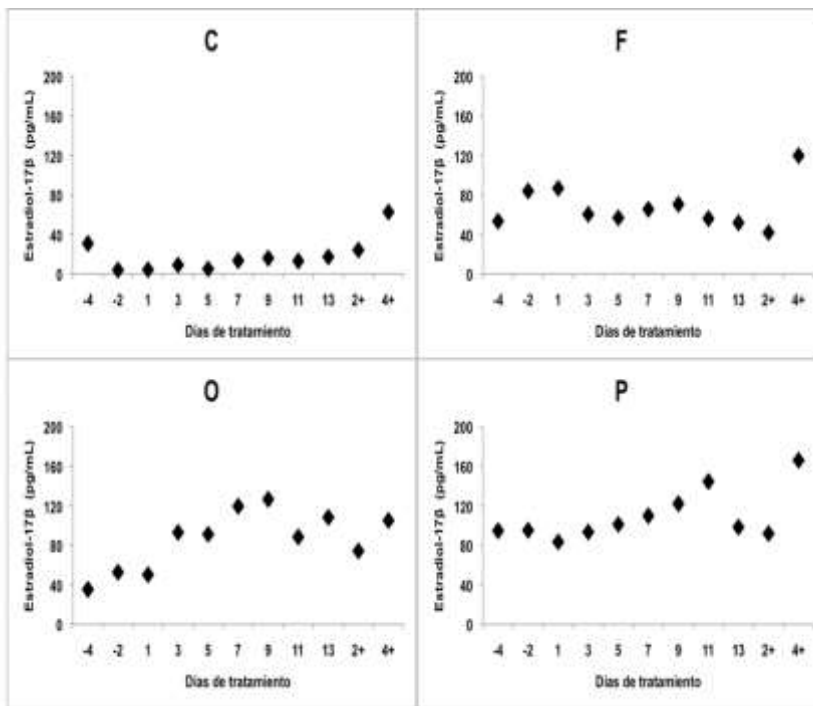


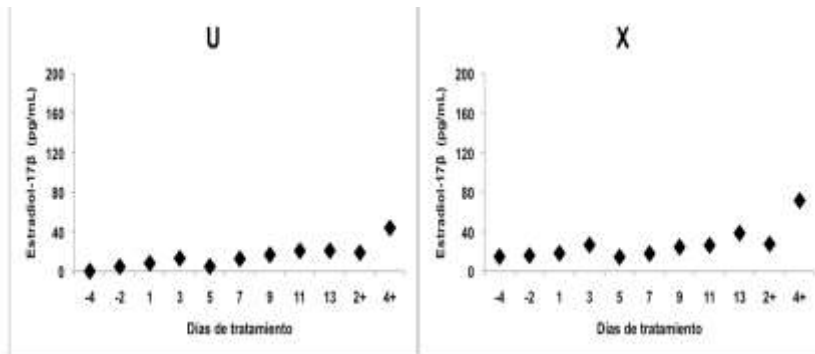
**Figura 11.** Efecto del letrozol en la concentración sérica de testosterona. Cada letra representa a cada uno de los machos cabríos utilizados en el estudio. Se muestran las concentraciones de cada animal obtenidas antes (-), durante y después (+) del tratamiento con letrozol. n=6 ( $P < 0.05$  \*).

Concentración sérica de 17β estradiol por animal a lo largo del estudio con letrozol

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de 17β estradiol durante el periodo de estudio (Figura 12). Esta hormona tuvo un comportamiento errático, pero se manifestó una tendencia a aumentar la concentración sérica cuando finalizó el tratamiento.

Eliminado:





**Figura 12.** Efecto del letrozol en la concentración sérica de 17β estradiol. Cada letra representa a cada uno de los machos cabríos utilizados en el estudio. Se muestran las concentraciones en cada animal obtenidas antes (-), durante y después (+) del tratamiento con letrozol. (n=6. P<0.05 \*).

Conductas agonistas promedio

La matriz de dominancia nos indica la frecuencia de comportamientos agresivos. En la figura 13B se observa el incremento de estas conductas después del tratamiento con Letrozol. En la matriz correspondiente a los animales después del tratamiento encontramos a cuatro machos cabríos clasificados de dominancia alta, cuatro de dominancia media y cuatro de dominancia baja. La mayoría de los machos cabríos mantuvieron el nivel de dominancia a lo largo del estudio, únicamente dos machos cambiaron su posición de nivel bajo a medio (macho cabrío M) y de medio a alto (macho cabrío F), respectivamente.

	N	R	A	F	X	U	O	C	M	T	P	D
N	■	2		7	4	1		3	2	7	3	1
R		■			1			1	1	5	1	
A			■				1					
F				■	2	3	1	2		2		4
X		3			■			2		1	1	2
U			1	1		■		1				2
O							■				1	1
C								■				1
M									■			
T									1	■		1
P											■	
D										1		■

Figura 13 (A) muestra la matriz de dominancia de los machos cabríos control y de los que después fueron tratados con letrozol en el período previo al tratamiento.

	N	A	R	X	F	U	O	M	C	P	D	T
N			2	4	8	1		3	3	3	3	7
A							1	2		3	1	2
R		1		1	1	2	2	3	3	2	1	5
X			3			1	2	1	2	2	3	1
F				3		3	2		2		4	3
U		1			1		1	1	2	1	3	1
O								3	1	2	3	
M										2	1	3
C										1	2	
P											1	
D												2
T								1			1	

Figura 13 (B). Muestra la matriz de dominancia de los machos cabríos controles y de los tratados con letrozol en el período posterior al tratamiento.

En la figura 14 se observó que hubo un incremento significativo en el número de interacciones agonistas en el grupo tratado comparando los períodos antes y después de aplicado el tratamiento en los mismos animales. Se observan diferencias estadísticamente significativas.

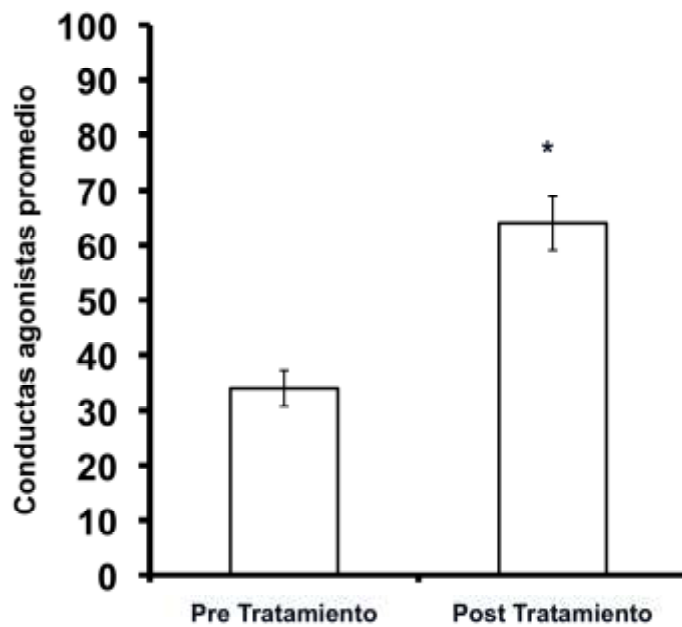


Figura 14. Conductas agonistas promedio antes y después del tratamiento con letrozol. El letrozol se administró durante 15 días y las conductas se registraron antes y después del tratamiento. n=6 (Media±ee). (P<0.05 \*).



Evaluación del efecto de letrozol sobre la circunferencia escrotal y los parámetros del eyaculado

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el tamaño de la circunferencia escrotal al final del tratamiento del grupo control y el grupo tratado con letrozol. La administración de letrozol disminuyó significativamente la circunferencia escrotal comparándola con el grupo control (Figura 15).

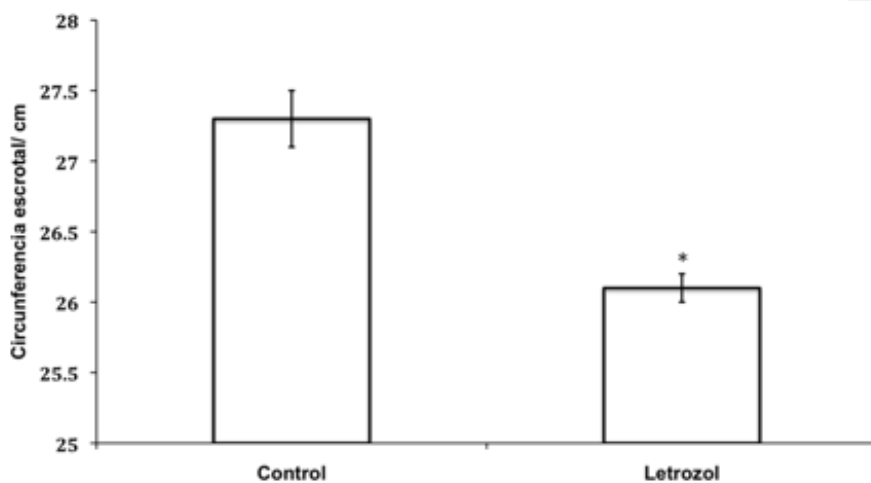


Figura 15. Efecto del letrozol sobre la circunferencia escrotal. Los datos expresan media  $\pm$  ee, n= 6 grupo control y n=6 grupo tratado con letrozol. ( $P < 0.05$  \*).

### Efecto del letrozol sobre el volumen del eyaculado

La administración de letrozol provocó que el volumen del eyaculado disminuyera significativamente comparándolo con el grupo control (Figura 16).

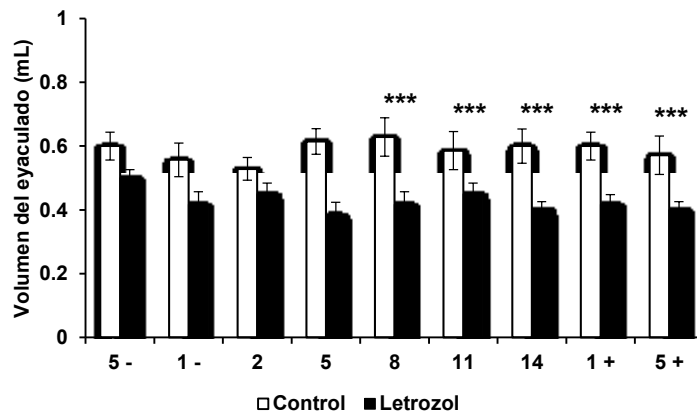


Figura 16. Efecto del letrozol sobre el volumen del eyaculado. Los datos expresan media  $\pm$  EE, n= 6 grupo control y n=6 grupo tratado con Letrozol ( $P < 0.0001$  \*\*\*).

### Efecto del letrozol sobre la concentración espermática

La administración de letrozol a los cabritos durante 15 días disminuyó significativamente la concentración espermática, comparándola con el grupo que sólo recibió placebo (Figura 17). El efecto comenzó a ser estadísticamente significativo a los 5 días de tratamiento.

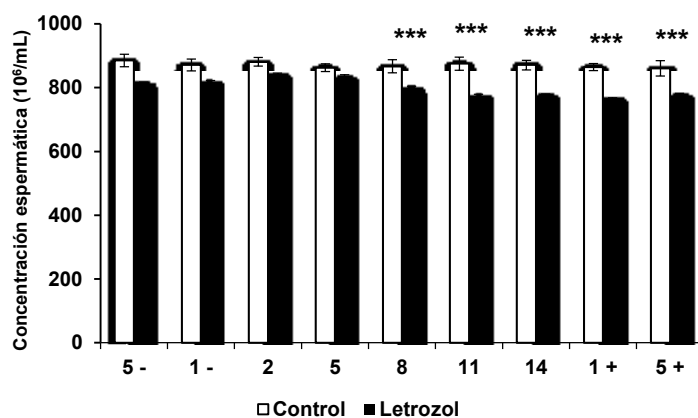


Figura 17. Efecto del letrozol sobre la concentración espermática. Los datos indican media  $\pm$  ee. (P<0.0001\*\*\*).

Efecto del letrozol sobre el movimiento en masa e individual de los espermatozoides

El movimiento en masa de los espermatozoides fue afectado por el tratamiento con letrozol después de la cuarta colección de semen. El movimiento individual de los espermatozoides también fue afectado por el tratamiento después de la quinta colección de semen.

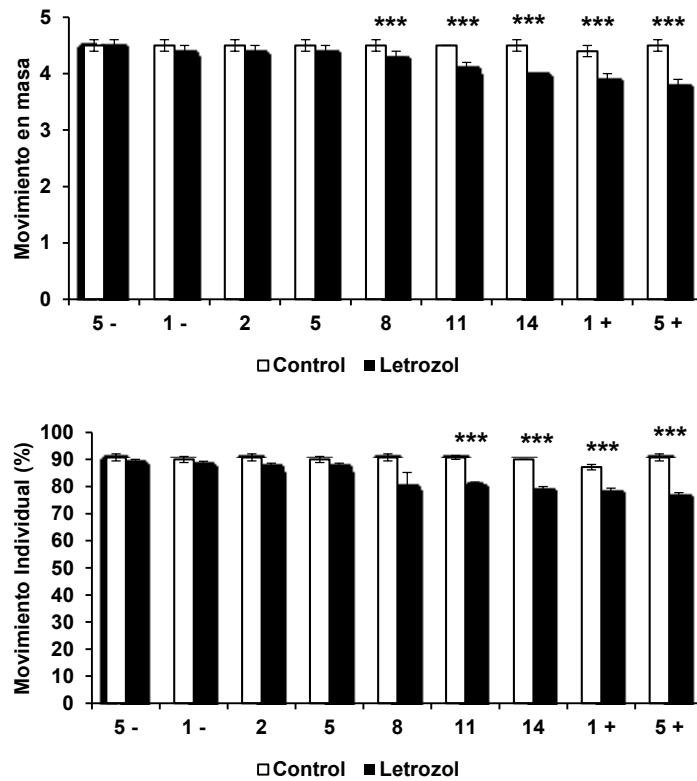


Figura 18. Efecto del letrozol sobre el movimiento en masa (A) e individual (B) de los espermatozoides. Los datos indican media  $\pm$  ee. ( $P < 0.0001$  \*\*\*).

### Efecto del letrozol sobre el número de espermatozoides vivos

La disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos fue significativa estadísticamente a partir de la colección de semen al día cinco del tratamiento con letrozol (figura 19).

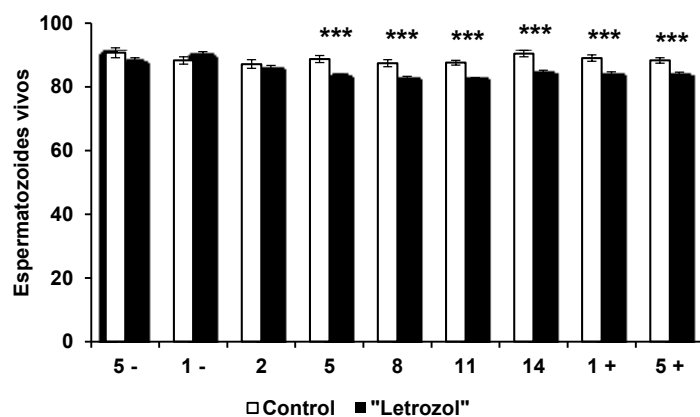


Figura 19. Efecto del tratamiento con letrozol sobre la viabilidad de los espermatozoides. La viabilidad de los espermatozoides fue evaluada mediante la tinción eosina-nigrosina. Los datos indican media  $\pm$  ee. ( $P < 0.0001$  \*\*\*).

### Efecto del letrozol sobre la integridad del acrosoma

La evaluación de la presencia de acrosomas intactos mediante la tinción de Coomassie mostró que el letrozol disminuyó significativamente el número de espermatozoides con el acrosoma intacto a partir de la quinta colecta. Sin embargo, los conteos de espermatozoides con acrosoma ausente no difirieron entre grupos (figura 20).

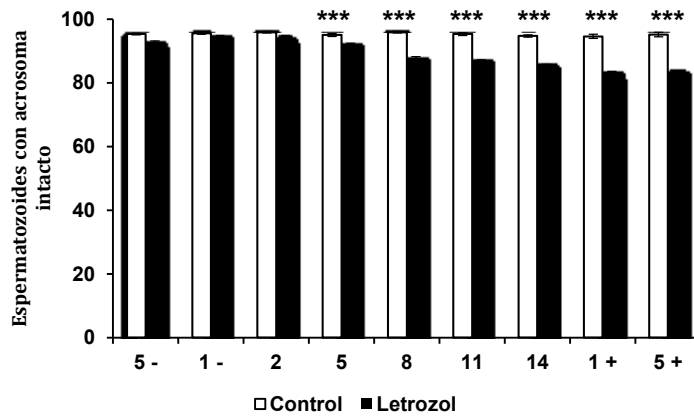


Figura 20. Efecto del letrozol sobre la integridad del Acrosoma. Tinción azul de Coomassie ( $P < 0.0001$ ). Los datos indican media  $\pm$  ee. ( $P < 0.0001$  \*\*\*).

## DISCUSIÓN

### Parte 1

Los resultados obtenidos cuando investigamos la concentración sérica de  $17\beta$  estradiol y testosterona en suero indican que el testículo del macho cabrío produce pequeñas cantidades de  $17\beta$  estradiol desde etapas tempranas del desarrollo posnatal (Fig. 4). Es interesante destacar que se encontraron dos picos de concentración sérica, uno a los 3 meses de edad y otro a los 10 meses de edad. El segundo pico coincide con otro de testosterona que aparece en el testículo del macho cabrío adulto joven. En contraste, la presencia del primer pico sérico de producción de  $17\beta$  estradiol no tiene una explicación tan clara, pero se sabe que en borregos Blackbelly y machos cabríos de la raza Tokara alrededor de los 90 días de edad se tiene un aumento del crecimiento testicular (Herrera-Alarcón et al., 2007; Nishimura et al., 2000), por lo tanto un fenómeno similar podría explicar el aumento en los niveles de  $17\beta$  estradiol en este período. Asimismo, en el borrego de la raza Blackbelly alrededor de los 100 días se estabiliza el número de células de Sertoli y se termina la diferenciación de las mismas (Herrera-Alarcón et al., 2007). Las concentraciones elevadas de  $17\beta$  estradiol encontrados en machos cabríos de 10 meses de edad en este estudio están comprendidas dentro de los valores encontrados en otras especies, donde se reportaron concentraciones séricas de 2 a 180 pg/mL (Setchell y Cox, 1982). Como se ha informado para la mayoría de las especies las concentraciones de  $17\beta$  estradiol fueron más bajas que aquellas de testosterona.

El patrón de secreción de testosterona es coincidente con resultados obtenidos por Delgado et al. (1999), que demostró que este patrón está relacionado con la estacionalidad reproductiva en esta especie, esto es de acuerdo al fotoperíodo de la temporada. Otros autores han mostrado que los

estrógenos también están involucrados en la regulación estacional de la espermatogénesis y la maduración espermática (Schön y Blottner, 2008).

La expresión del RNA mensajero de la P450 aromatasa en este estudio indica que antes de la pubertad la enzima está presente en las células del túbulo seminífero y también en el espacio intersticial, como ha sido descrito en algunos roedores macho (Abney, 1999). En contraste, en la rata, la expresión postnatal del RNAm de la P450 aromatasa es dependiente de la edad, encontrándose predominantemente en las células de Sertoli del testículo prepuberal, pero la expresión de la enzima en el adulto se encontró en las células de Leydig y las células germinales (Lambard et al., 2005). Se encontró que en el testículo del macho cabrío la expresión de la P450 aromatasa sigue presente en el túbulo seminífero a los 5 meses de edad (Figura 9C).

También se detectó la expresión y actividad del ARNm de la P450 aromatasa en las series espermáticas y células germinales, lo que ha sido descrito en varias especies, incluyendo las ratas, los búfalos y el corzo (Carreau et al., 2007; Tiwari et al., 2008).

Adicionalmente, los resultados obtenidos sobre la aromatización *in vitro* por las células testiculares indican que la enzima es activa y que los testículos de la cabra pre púber son capaces de producir pequeñas cantidades de  $17\beta$  estradiol, sugiriendo que los estrógenos tienen un papel durante el desarrollo testicular en esta especie. Al respecto se conoce que los estrógenos producidos por el testículo tienen un papel autocrino o paracrino en el desarrollo y funcionamiento de la gónada (Carreau et al., 2007; Hess et al., 2001).

La producción intratesticular de  $17\beta$  estradiol fue suprimida por el inhibidor de la P450 aromatasa el formestane, lo que sugiere que la P450 aromatasa



testicular tiene una estructura molecular similar a la descrita en humanos y roedores (Conley y Hinshelwood, 2001).

En el presente estudio, la síntesis de estrona se encontró en los testículos cuando la  $^3\text{H}$  testosterona fue usada como precursor (Figura 6), pero no cuando la androstenediona fue el precursor, sugiriendo que la síntesis de estrona a partir de androstenediona está ausente en el testículo del macho cabrío. El hallazgo de que la síntesis de estrona fue detectada cuando la testosterona fue usada como precursor sugiere que en el testículo esta hormona proviene de la conversión de  $17\beta$  estradiol a estrona por la  $17\beta$  hidroxí-esteroide deshidrogenasa como ha sido previamente descrito por Labrie et al., 1997 y Mizrachi y Auchus, 2009.

En la rata adulta macho y el ratón, los testículos no sintetizan androstenediona a partir de testosterona, siendo la ruta androstenediona-testosterona la dirección utilizada (Gower y Cooke, 1983). Sin embargo, en el presente estudio, la androstenediona fue detectada cuando las células testiculares del macho cabrío fueron incubadas con testosterona, sugiriendo la actividad de varias  $17\beta$  hidroxíesteroide deshidrogenasas como ha sido descrito en el hombre, la rata, el ratón, el cerdo y el cobayo, (Peltoketo et al., 1999).

Los cortes testiculares (presencia de lumen en el túbulo y probablemente células espermáticas) además de los pequeños picos de testosterona observados a los tres meses, sugieren que los cabritos estarían entrando a la pubertad en esa edad (Figura 8).

En el macho se ha demostrado que el cerebro produce pequeñas cantidades de estrógenos (Roselli et al., 1997), y en hembras de otras especies se ha encontrado producción por el tejido adiposo.

Aunque en la cabra no existe información al respecto, el aumento de grasa corporal que acompaña el desarrollo prepuberal podría ser una fuente de

estrógenos en el macho cabrío, lo que explicaría el pico prepuberal que se encontró en este estudio, se requiere investigar si efectivamente en esta especie la grasa corporal produce estrógenos.

La expresión de P450-RNA de los estudios aquí presentados indica que la enzima se expresa tanto en los túbulos seminíferos como en el espacio intersticial. La presencia de la enzima en este último es constante en las células de Leydig entre los 3 y 5 meses de edad, lo que sugiere un papel de los estrógenos en el desarrollo del testículo de esta especie. Al respecto, los datos obtenidos aquí con los estudios de síntesis de estrógenos *in vitro* en células testiculares sugieren que la enzima sería capaz de producir la proteína activa ya que mostraron la capacidad del testículo prepúber de sintetizar pequeñas cantidades de 17 $\beta$ -estradiol. El estrógeno producido intratesticularmente tendría probablemente un papel paracrino o intracrino en el desarrollo de la gónada. Es interesante el hecho de que la síntesis de 17 $\beta$ -estradiol disminuya con el inhibidor de aromatasa formestane lo que indica que la P450-aromatasa del testículo del macho cabrío es regulable artificialmente.

A diferencia de lo que ocurre con el ovario de la cabra prepúber en el que predomina la síntesis de estrona, solo se encontró esta hormona en el testículo del macho cabrío de 4 meses de edad y utilizando <sup>3</sup>H-Testosterona como precursor.

Después del nacimiento en la rata la expresión celular del RNA de P450-aromatasa es dependiente de la edad, encontrándose predominantemente en las células de Sertoli y en las células germinales del testículo prepuberal y sólo en las células de Leydig en la pubertad. A diferencia de los datos publicados en la rata en este trabajo se encontró expresión de P450-aromatasa desde los tres meses de edad, período en el que de acuerdo a nuestras observaciones ya se ha iniciado la pubertad del macho cabrío (Fig. 8 y 9).

## Parte 2

Al investigar el efecto del letrozol sobre la P450 aromatasa y contrario a nuestra hipótesis, la testosterona y el  $17\beta$  estradiol sérico en el grupo tratado no cambiaron significativamente después de 10 días de tratamiento (figura 11 y figura 12 respectivamente). La literatura relacionada a alteraciones séricas de los esteroides sexuales después de la administración de letrozol es influida por la especie en la que se aplica y por el tiempo de tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento con fadrozole, un inhibidor de la aromatasa no esteroideal (Browne et al., 1991) en primates machos, y letrozol en hombres resultó en un rápido incremento en los niveles plasmáticos de testosterona (Shetty G et al., 1998; Trunet et al, 1993, respectivamente). Sin embargo, este efecto no fue observado en el modelo de ratón.

Asimismo, en los estudios realizados por otros autores no se encontró una disminución de los estrógenos séricos después de la administración de los inhibidores de la P450 aromatasa. La falta de cambios en la testosterona y el  $17\beta$  estradiol séricos observada en nuestro estudio puede estar relacionada a la especie o bien al tiempo de tratamiento con letrozol. A pesar de la ausencia de cambios en los esteroides sexuales, se observaron alteraciones significativas en la espermatogénesis que fueron evidentes después de únicamente 10 días de tratamiento, sugiriendo que la función testicular fue rápidamente afectada.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de conductas agonistas observada antes y después del tratamiento con letrozol en los animales tratados (figura 14), un resultado que puede ser explicado por la tendencia a aumentar los niveles séricos de testosterona, la testosterona está relacionada con la conducta agonista en la cabra doméstica y los niveles de dominancia de los animales (Bouissou, 1983), los niveles séricos mostraron un incremento al no haber una retroalimentación negativa por parte del  $17\beta$

estradiol a nivel de hipófisis ya que fue inhibida su síntesis por el tratamiento de letrozol, otro papel importante de los estrógenos en el comportamiento sexual del macho (Simpson R y Davis, 2001). Tanto la testosterona y el  $17\beta$  estradiol tienen efecto en la retroalimentación negativa de testosterona. Se ha demostrado que los tratamientos largos con anti-aromatasa afectan el comportamiento sexual en el ratón provocando la incapacidad de monta a la hembra (Turner et al., 2000).

Adicionalmente, se ha observado que después de un reagrupamiento se incrementan los niveles de agresión ya que es una situación estresante para los animales, y los efectos negativos del reagrupamiento son causados por hormonas del estrés, ACTH y cortisol (Fernández et al., 2007). Sin embargo, en el presente estudio los animales no fueron reagrupados y permanecieron en el mismo corral, un hecho que puede explicar también los pequeños cambios observados en el comportamiento agresivo.

Aunque no se encontraron cambios significativos en la concentración sérica de testosterona y de  $17\beta$  estradiol, se observó un claro efecto en la producción de semen y en sus características (figuras 16 a 20). Como se planteó en la introducción, los estrógenos juegan un papel importante en la espermatogénesis. Estudios recientes han revelado que los estrógenos son importantes en el tracto reproductivo del macho de varias clases de vertebrados (Carreau et al., 2008). Adicionalmente, Gancarczyk et al., (2004) ha demostrado que los estrógenos controlan el desarrollo de las células germinales, especialmente la producción de espermatozoides y la maduración de espermatozoides en el epidídimo del topillo rojo. Los estrógenos ejercen además un efecto mitogénico en las células germinales, ya que en primates tratados por un largo período de tiempo con el inhibidor de aromatasa no esterooidal y de larga acción CGP 47645, se observa un bloqueo de la maduración espermática y una disminución de las células germinales (Shetty et al., 1998).

El estudio actual sugiere que un corto bloqueo de la síntesis de estrógenos compromete la espermiogénesis y no la espermatocitogénesis. Una señal de falla en la espermiogénesis y la maduración de los espermatozoides encontrada en este estudio fue la reducción de la motilidad espermática, la viabilidad y la integridad del acrosoma en el grupo tratado con letrozol en comparación con el grupo control (figuras 18, 19 y 20). Dada la presencia de la P450-aromatasa en las células germinales (relativamente más en las espermátides que los espermatoцитos en paquitenos) demostrada en roedores (Nitta et al., 1993), la inhibición de esta enzima por letrozol podría explicar las alteraciones espermatogénicas encontradas en este estudio. Se ha propuesto que los estrógenos producidos por las células germinales tienen un papel en la expresión de los genes de las células espermatogénicas y en la función de las células epiteliales del epidídimo (Nitta et al., 1993; Eddy et al., 1996).

Estos hallazgos podrían indicar que los cambios en la motilidad espermática y la concentración del inhibidor de la aromatasa en los machos cabríos tratados son debidos a la disminución en la síntesis de estrógenos por las células de Sertoli y las células germinales. Adicionalmente debe ser considerado el papel de los receptores de estrógenos que han sido encontrados por varios autores en las células de Sertoli (Lin et al., 1981), así como en el epitelio del epidídimo (Ergiın et al., 1997).

La literatura indica que cuando se bloquea la acción de los estrógenos en anfibios ocurre una falla en la función testicular, con atrofia de las células intersticiales, (Walker y Nogues, 1994) disrupción de la función del epitelio seminífero (Tsutsumi et al., 1987; Eddy et al., 1996), disminución de la función espermática (Eddy et al., 1996; Clancy et al., 1995). Dichos hallazgos indican que la exposición en anfibios a xenobióticos capaces de inhibir a la aromatasa puede resultar en efectos reproductivos adversos (Olmstead et al., 2009).

Sin embargo, en hombre infértiles, el letrozol mejora los parámetros espermáticos (conteo total de espermatozoides móviles, cuenta de motilidad espermática y volumen del eyaculado) (Saylam et al., 2011). También en

hombres y ratas adultas tratadas con anastrozol por 9 semanas se producen cambios significativos en el peso de los testículos, ya que el peso de los mismos sufre un incremento (Turner et al., 2000).

Es posible que a bajas dosis, los estrógenos estén involucrados en la activación de la espermatogénesis, mientras que a dosis elevadas, estos esteroides puedan tener un efecto inhibitorio en el tracto reproductivo del macho, mientras que simultáneamente inducen la diferenciación de espermatogonias en células progenitoras y en espermatozoides.

Para clarificar el funcionamiento operativo de los estrógenos en el testículo, se observaron varios casos de deficiencia de estrógenos debido a una mutación inactivante del gen CYP 19 donde se describen parámetros espermáticos de tres pacientes que muestran decremento en la motilidad. (Carany et al., 1997; Herrmann et al., 2002; Maffei et al., 2004). Se ha reportado el caso de un hombre infértil con un volumen normal de semen y azoospermia e hipospermatogénesis observados en una biopsia testicular, que ingirió por 4 meses el letrozol generándole una modificación de su perfil hormonal incrementando los niveles séricos de testosterona, LH y FSH y la restauración a una espermatogénesis normal en una biopsia testicular subsecuente (Patry et al., 2009). Por otra parte, el tratamiento de ratas (Bonsall et al., 1992) y monos (Zumpe et al., 1993) con fadrozol, disminuyó el desempeño eyaculatorio y la motivación sexual.

## CONCLUSIONES

### Parte 1

El macho cabrío produce pequeñas cantidades de  $17\beta$  estradiol desde los primeros meses de vida posnatal, con dos picos en la circulación, uno pequeño a los tres meses de edad y un pico prominente a los diez meses de edad.

La detección del ARNm de P450 aromatasa indica que la enzima se expresa en el túbulo seminífero y también en el espacio intersticial (células de Leydig) de cabritos de tres meses de edad, y continúa presente en ambos compartimentos hasta los cinco meses de edad.

La síntesis testicular de  $17\beta$  estradiol y estrona tritiada a partir de  $^3\text{H}$  androstenediona fue regulada por el inhibidor formestane.

### Parte 2

El tratamiento de machos cabríos con letrozol por 10 días no causó cambios significativos en las concentraciones séricas de testosterona y  $17\beta$  estradiol. En la conducta de los machos cabríos el tratamiento con letrozol provocó un incremento de la conducta agonista, dicho incremento no provocó alteraciones en las mediciones de semen realizadas. Sin embargo, se encontró una importante alteración en la producción de semen y en el movimiento espermático indicando que la espermatogénesis del macho cabrío es profundamente dependiente de la síntesis de estrógenos. Nuestros resultados nos permiten aseverar que incluso una inhibición corta de la síntesis de estrógenos puede resultar en cambios importantes en la espermatogénesis.

## **CONCLUSIÓN GENERAL**

En el macho cabrío se encuentra desde temprana edad la expresión de P450 aromatasa y la capacidad de síntesis de estrógenos que puede ser regulada por fármacos inhibidores de la síntesis de estas hormonas y la inhibición de la síntesis de estrógenos por un fármaco no esteroideo, como letrozol, afecta profundamente la calidad y cantidad de los espermatozoides producidos en esta especie, lo que permite plantear que estas hormonas son fundamentales para mantener la salud reproductiva del macho cabrío.



## **PERSPECTIVAS**

El patrón de secreción de hormonas esteroideas (testosterona y  $17\beta$  estradiol) están regulados por el fotoperíodo en el macho cabrío, será interesante realizar estudios relacionados con letrozol durante la estación no reproductiva de la especie.

Al comprobar los efectos del letrozol sobre los parámetros reproductivos del macho cabrío a nivel celular, nos hace pensar que probablemente hayan cambios a nivel molecular, por lo que será muy importante llevar a cabo los experimentos de western-blot e inmunohistoquímica con el fin de poder detallar más a profundidad los efectos del letrozol en un organismo adulto.

## LITERATURA CITADA

- Abney T. The potential roles of estrogen in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids*. 1999;64:610-617.
- Adamopoulos D, Lawrence DM, Vassilopoulos P, Kapolla N, Kontogeorgos L, MCGarrigle HH. Hormone levels in the reproductive system of normospermic men and patients with oligospermia and varicocele. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:447-452.
- Akingbemi BT. Review: estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:51.
- Amann RP, Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci* 1983;57(Suppl 2):380-403.
- Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, Rago V, Ando S. Estrogen receptor (ER) alpha and beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:1443-1451.
- Bhatnagar AS, Batzl C, Hausler A, Schieweck K, Lang M, Trunet PF. Pharmacology of non-steroidal aromatase inhibitors. In: Pasqualini JR, Katzenellenbogen BS (eds) *Hormone-dependent cancer*. Marcel Dekker, New York, 1996:155–168.
- Bhatnagar AS, Brodie AMH, Long BJ, Evans DB, Miller WR. Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;76:199–202.
- Becerro M. Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *RAMD*, 2008; 1:22-36.
- Bilinska B, Schmalz-Fraczek B, Kotula M, Carreau S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178:189-198.

- Bilinska B, Kotula-Balak M, Gancarczyk M, Sadowska J, Tabarowsky Z, Wojtusiak A. Androgen aromatization in cryptorchid mouse testis. *Acta Histochem* 2003; 105: 57-65.
- Bobes RJ, Pérez-Martínez M, Gómez Y, Romano MC. Metabolism of progesterone to estrogens and androgens by individual follicles of the goat ovary. *Small Ruminant Res* 2003;47:233-242.
- Bobes RJ, Miranda C, Pérez M, Luu-The V, Romano MC. Isolation and characterization of goat ovarian aromatase cDNA: assessment of the activity using an intact cell system and placental expression. *Theriogenology* 2004;62:532-543.
- Bonsall RW, Clancy AN, Michael RP. Effects of the nonsteroidal aromatase inhibitor, fadrozole, on sexual behavior in male rats. *Horm Behav* 1992;26(2):240-254.
- Bouissou MF. Androgens, aggressive behaviour and social relationship in higher mammals. *Horm Res* 1983;18:43-61.
- Brodie A, Lu Q, Liu Y, Long B. Aromatase inhibitors and their antitumor effects in model systems. *Endocr Relat Cancer* 1999;6:205–210.
- Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R, Lam EWF. Steroid receptor action. *B Prac R Clin Obst Gyn* 2004; 18:265-283.
- Browne LJ, Gude C, Rodriguez H, Steele RE, Bhatnager A. Fadrozole hydrochloride: a potent, selective, nonsteroidal inhibitor of aromatase for the treatment of estrogen-dependent disease. *J Med Chem* 1991;34(2):725–736.
- Bruchovsky N, Wilson JD. The conversion of testosterone to 5 $\alpha$ -androstane-17 $\beta$ -3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* 1968;243:2012-2021.
- Bujan L, Mieuisset R, Audran F, Lumbroso S, Sultan C. Increased oestradiol level in seminal plasma in infertile men. *Hum Reprod* 1993;8:74-77.

- Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann W, Nabholz JM. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole and exemestane. *Cancer* 2002;95:2006-2016.
- Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997;337:91–95.
- Carpino A, Pezzi V, Rago V, Bilinska B, Ando S. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. *Tissue Cell* 2001; 33:349-353.
- Carpino A, Romeo F, Rago V. Aromatase immunolocalization in human ductuli efferents and proximal ductus epididymus. *J Anat* 2004;204:217-220.
- Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 1999;22:211-223.
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:35.
- Carreau S, Delalande C, Silandre D, Bourguiba S, Lambard S. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 2006;246:65-68.
- Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, Galeraud-Denis I, Delalande C. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:761-768.
- Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Denis I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv Med Sci* 2008;53(2):139-144.
- Carreau S, Hess RA. Review: oestrogens and spermatogenesis. *Phil Trans R Soc B* 2010;365:1517-1535.

- Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. Glucocorticoids and their actions. An Introduction. *Ann NY Acad Sci* 2004;1024:1-8.
- Chrousos GP, Kino T. Glucocorticoid signaling in the cell. *Glucocorticoids and Mood. Ann NY Acad Sci* 2009;1179:153-166.
- Clancy AN, Zumpe D, Michael RP. Intracerebral infusion of an aromatase inhibitor, sexual behaviour and brain estrogen receptor-like immunoreactivity in intact male rats. *Neuroendocrinology* 1995;61(2):98–111.
- Clark BJ, Stocco DM. StAR - A tissue specific acute mediator of steroidogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 1996;7:227-233.
- Claus R, Schopper D, Hoang-Vu C. Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. *Acta Endocrinol* 1985;109:281-288.
- Claus R, Dimmick MA, Gimenez T, Hudson LW. Estrogens and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in the semen and blood plasma of stallions. *Theriogenology* 1992;38:687-693.
- Conley AJ, Corbin CJ, Hinshelwood MM, Liu Z, Simpson ER, Ford JJ, Harada N. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biol Reprod* 1996;54:497-505.
- Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases. *Reproduction* 2001;121:685-695.
- Conley AJ, Corbin CJ, Hughes AL. Adaptive evolution of mammalian aromatases: lessons from suiformes. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2009;331(5):346-357.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:339-355.
- Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by

ER $\alpha$  and ER $\beta$ . J Steroid Biochem Mol Biol 1999;69:165-175.

- Danzo BJ, Eller BC, Judy LA, Trautman JR, Orgebin-Crist MC. Estradiol binding in cytosol from epididymides of immature rabbits. Mol Cell Endocrinol 1975;2:91-105.
- Danzo BJ, Wolfe MS, Curry JB. The presence of an estradiol binding component in cytosol from immature rat epididymides. Mol Cell Endocrinol 1977;6:271-279.
- Danzo BJ, Sutton W, Eller BC. Analysis of [<sup>3</sup>H] estradiol binding to nuclei prepared from epididymides of sexually immature intact rabbits. Mol Cell Endocrinol 1978;9:291-301.
- Danzo BJ, St. Raymond PA, Davies J. Hormonally responsive areas of the reproductive system of the male guinea pig. III. Presence of cytoplasmic estrogen receptors. Biol Reprod 1981;25:1159-1168.
- Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D, Malpoux B. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats in subtropical northern México. Theriogenology 1999;52:727-737.
- Dufaure JP, Mak P, Callard IP. Estradiol binding activity in epididymal cytosol of the turtle, *Chrysemys picta*. Gen Comp Endocrinol 1983;51:61-65.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. Endocrinol 1996;137:4796-4805.
- Eiler H, Graves C. Oestrogen content of semen and the effect of exogenous oestradiol-17 $\alpha$  on the oestrogen and androgen concentration in semen and blood plasma of bulls. J Reprod Fertil 1977;50:17-21.
- Ergiin S, Ungefroren H, Holstein AF, Davidoff MS. Estrogen and progesterone receptors and estrogen receptor related antigen (ER-D5) in

human epididymis. *Mol Reprod Dev* 1997;47:448–445.

- Fernández-Presas AM, Valdez RA, Willms K, Romano MC. The key steroidogenic enzyme 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (WFU) *Parasitol Res* 2008;103:847-852.
- Fernández M, Alvarez L, Zarco L. Regrouping in lactating goats increases aggression and decreases milk production. *Small Ruminant Res* 2007;70:228-232.
- Fowler KA, Gill K, Kirma N, Dillehay DL, Tekmal RR. Overexpression of aromatase leads to development of testicular Leydig cell tumors. *Am J Pathol* 2000;156(1):347-353.
- Free MJ, Jaffe RA. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biol Reprod* 1979;20:269-278.
- Furbass R, Vanselow J. An aromatase pseudogene is transcribed in bovine placenta. *Gene* 1995;194:287-291.
- Gancarczyk M, Paziewska-Hejmej A, Carreau S, Tabarowski Z, Bilinska B. Dose- and photoperiod dependent effects of 17 $\beta$ -estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoexpression in immature bank voles. *Acta Histochem* 2004;106:269–278.
- Ganjam VK, Amann RP. Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. *Endocrinology* 1976;99:1618-1630.
- Gómez OS, Gutiérrez AAM, Valenzuela P EL. Corticoids: 60 years later a pending subject. *Rev Cienc Salud* 2007; 5:58-69.
- Gómez Y, Solano C, Valdez R, Larralde C, Romano MC. Sex steroids and parasitism: *Taenia crassiceps cisticercus* metabolizes exogenous androstenedione to testosterone *in vitro*. *J Steroid Biochem* 2000;74(3):143-147.

- Gower DB, Cooke GM. Review: regulation of steroid-transforming enzymes by endogenous steroids. *J Steroid Biochem.* 1983;19(4):1527-1556.
- Graddy LG, Kowalski AA, Simmen FA, Davis SLF, Baumgartner WW, Simmen RCM. Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000;73:49-57.
- Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testis and the male reproductive tract. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM and Larsen PR. *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia: Saunders; 1998;9:19-875.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002;346:340-352.
- Guillemette C, Bélanger A, Lépine J. Review: Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview. *Breast Cancer Res* 2004;6(6):246-254.
- Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda ML, Uribe S, Trujillo M. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 2009;58:287-292.
- Haynes BP, Dowsett M, Miller WR, Dixon JM, Bhatnagar AS. The pharmacology of letrozole. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;87(1):35-45.
- Herrera-Alarcón J, Villagómez-Amezcuca E, González-Padilla E, Jiménez-Severiano H. Stereological study of postnatal testicular development in Blackbelly sheep. *Theriogenology.* 2007;68:582-591.
- Herrmann BL, Saller B, Janssen OE, Gocke P, Bockisch A, Sperling H, Mann K, Broecker M. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation of the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5476-5484.
- Hess RA, Bunick D, Bahr JM. Sperm, a source of estrogen. *Environ Health Perspect* 1995;103 (Suppl 7):59-62.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB.



A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997;390:509-512.

- Hess RA, Bunick D, Bahr J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178:29-38.
- Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:52.
- Hess MN, Roser JF. Immunocytochemical localization of cytochrome P450 aromatase in testis of prepubertal, pubertal, and postpubertal horses. *Theriogenology* 2004;61:293-299.
- Hinshelwood MM, Liu Z, Conley AJ, Simpson ER. Demonstration of tissue-specific promoters in non primate species that express aromatase P450 in placentae. *Biol Reprod* 1995;53:1151-1159.
- Hunter MG, Biggs C, Pickard AR, Faillace LS. Differences in follicular aromatase activity between Meishan and Large-White hybrid gilts. *J Reprod Fertil* 1994;101:139-144.
- Janulis L, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janssen S, Asawa Y, Bahr JM. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J Androl* 1996a;17:111-116.
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Bunick D. P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *J Androl* 1996b;17:651-658.
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bunick D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl* 1998;19:65-71.
- Jenster G, vander Korput,, HAGM, van Vroonhoven C, vander Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 1991;5:1396-1404.

- Kamal N, Agarwal AK, Jehan Q, Setty BS. Biological action of estrogen on the epididymis of prepubertal rhesus monkey. *Andrologia* 1985;17:339-345.
- Kishida M, Callard GV. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 2001;142:740-750.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinol* 1997;138:863-870.
- Kwon S, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janulis L, Osawa Y, Bahr JM. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biol Reprod* 1995;53:1259-1264.
- Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton R, Bélanger A. The key role of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*. 1997;62:148-158.
- Lambard S, Galeraud-Denis I, Saunders PT, Carreau S. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *J Mol Endocrinol*. 2004;32:279-289.
- Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S, Carreau S. Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. *J Steroid Biochem* 2005;95:63-69.
- Larson LJ, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm for several species. *Mol Rep Dev* 1999;52:445-449.
- Lee KH, Yoo MS, Choi HS, Kwon HB, Soh J. Retinoic acids up-regulate steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Cell Endocrinol* 1999;148:1-10.
- Lee KH, Hess RA, Bahr JM, Lubahn DB, Taylor J, Bunick D. Estrogen

receptor  $\alpha$  has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod* 2000; 63:1873-1880.

- Lefevre A, Rogier E, Astraudo C, Duquenne C, Finazz C. Regulation by retinoids of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor, cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5-4-isomerase and 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P-450 messenger ribonucleic acid levels in the K9 mouse Leydig cell line. *Mol Cell Endocrinol* 1994;106:31-39.
- Levallet J, Carreau S. In vitro gene expression of aromatase in rat testicular cells. *C R Acad Sci III* 1997;320:123-129.
- Levallet J, Bilinska B, Mittre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 1998;58:919-926.
- Levallet J, Mittre H, Delarue B, Carreau S. Alternative splicing in the coding region of the cytochrome P450 aromatase gene in male rat germ cells. *J Mol Endocrinol* 1998;20:305-312.
- Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*. 2002;67:471-475.
- Lin T, Muroso EP, Osterman J, Nankin HR. Direct inhibition of rat leydig cell function by tamoxifen. *Metabolism* 1981;30:156-159.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11162-6.
- Maffei L, Murata Y, Rochira V, Tubert G, Aranda C, Vazquez M, Clyne CD, Davis S, Simpson ER, Carani C. Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate and estradiol treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:61-70.

- Makinen S, Makela S, Weihua Z, Warner M, Rosenlund B, Salmi S, Hovatta O, Gustafsson JK. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol Hum Reprod*. 2001;7:497-503.
- McLachlan JA, Newbold RR, Bullock B. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science* 1975;190:991-992.
- McTernan PG, Anderson LA, Anwar AJ, Eggo MC, Crocker J, Bennett AH, Stewart PM, Kumar S. Glucocorticoid regulation of P450 aromatase activity in human adipose tissue: gender and site differences. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1327-1336.
- Mizrachi D, Auchus RJ. Review: androgens, estrogens and hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;301:37-42.
- Mondragón JA, Ocadiz-Delgado R, Miranda C, Valencia J, Rosales AM, Gariglio P, Romano MC. Expression of P450-aromatase in the goat placenta throughout pregnancy. *Theriogenology* 2007;68:646-653.
- Munetsuna E, Hojo Y, Hattori M, Ishii H, Kawato S, Ishida A, Kominami SAJ, Yamazaki T. Retinoic acid stimulates 17 $\beta$ -estradiol and testosterone synthesis in rat hippocampal slice cultures. *Endocrinology* 2009;150:4260:4269.
- Murphy JB, Emmott RC, Hicks LL, Walsh PC. Estrogen receptors in the human prostate, seminal vesicle, epididymis, testis, and genital skin: a marker for estrogen-responsive tissues? *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:938-948.
- National Research Council. Nutrient requirements of goats: angora, dairy and meat goats in temperate and tropical countries. National Academy Press, Washington, D.C. 1981.
- Nilsson S, Kela SM, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson GR, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565.

- Nishimura S, Okano K, Yasukouchi K, Gotoh T, Tabata S, Iwamoto H. Testis developments and puberty in the male Tokara (Japanese native) goat. *Anim Reprod Sci* 2000;64:127-131.
- Nitta H, Bunick D, Hess RA, Janulis L, Newton SC, Millette CF, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K, Bahr JM. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 1993;132(3):1396-1401.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. The complete primary structure of human estrogen receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and its heterodimerization with ER  $\alpha$  in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;243:122-126.
- Okano T, Murase T, Tsubota T. Spermatogenesis, serum testosterone levels and immunolocalization of steroidogenic enzymes in the wild male Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *J Vet Med Sci* 2003;65:1093-1099.
- Olmstead A, Kosian P, Korte J, Holcombe G, Woodis K, Degitz S. Sex reversal of the amphibian, *Xenopus tropicalis*, following larval exposure to an aromatase inhibitor Aquat *Toxicol* 2009;91:143-150.
- Osborne CK, Zhao H, Fuqua SAW. Selective estrogen receptor modulators: structure, function and clinical use. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18:3172-3186.
- Overpeck JG, Colson SH, Hohmann JR, Applestine MS, Reilly JF. Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: a literature survey. *J Toxicol Environ Health* 1978;4:785-803.
- Patry G, Jarvi K, Grober E, Lo K. Use of the aromatase inhibitor Letrozole to treat male infertility. *Fertil Steril* 2009;92(2):829.e1-829.e2.

- Pelletier G, El-Alfy, M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4835-4840.
- Peltoketo H, Luu-The V, Simard J, Adamski J. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol.* 1999;23:1-11.
- Pereyra-Martinez AC, Resko JA, Roselli CE. A comparison of the distribution of cytochrome P450arom in testis and epididymis of rhesus monkeys using different riboprobes. Aromatase 2000 and the 3rd Generation, Port Douglas, November 3 -7, Abstract. 2000.
- Pérez-Martínez M, Mendoza ME, Romano MC. Exfoliative vaginal cytology and plasma levels of estrone and estradiol-17 $\beta$  in young and adult goats. *Small Ruminant Res* 1999;33:153-158.
- Peters MA, Mol JA, Van Wolferen ME, Oostelaken-Dijksterhuis MA, Teerds KJ, Van Sluijs FJ. Expression of the insuline-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumor. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:22.
- Robaire B, Fan X. Regulation of apoptotic cell death in the rat epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1998;53:211-214.
- Rommerts FF, de Jong FH, Brinkmann AO, van der Molen HJ. Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 1982;65:281-288.
- Roselli CE, Abdelgadir SE, Resko JA. Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. *Brain Res Bull* 1997;44:351-357.
- Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR. Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 1998;156:R13-R17.

- Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR. Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod*. 2001;7:227-236.
- Saunders PT, Millar MR, Macpherson S, Irvine DS, Groome NP, Evans LR, Sharpe RM, Scobie GA. ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2706-2715.
- Saylam B, Efesoy O, Cayan S. The effect of aromatase inhibitor letrozole on body mass index, serum hormones, and sperm parameters in infertile men. *Fertil Steril* 2011;95(2):809-811.
- Schleicher G, Khan S, Nieschlag E. Differentiation between androgen and estrogen receptor mediated effects of testosterone on FSH using androgen receptor deficient (Tfm) and normal mice. *J Steroid Biochem* 1989;33:49-51.
- Schön J, Blottner S. Estrogens are involved in seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Gen Comp Endocr* 2008;159:257-263.
- Schwarz JM, McCarthy MM. Review: cellular mechanism of estradiol-mediated masculinization of the brain. *J Steroid Biochem* 2008;109:300-306.
- Seralini GE, Tomilin A, Auvray P, Nativelle-Serpentini C, Sourdain P, Moslemi S. Molecular characterization and expression of equine testicular cytochrome P450 aromatase. *Biochim Biophys Acta* 2003;1625:229-238.
- Setchell BP. The flow and composition of lymph from the testes of pigs with some observations on the effect of raised venous pressure. *Comp Biochem Physiol A* 1982;73:201-205.
- Setchell BP, Cox JE. Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. *J Reprod Fertil Suppl*

1982;32:123-127.

- Setchell BP, Laurie MS, Flint AP, Heap RB. Transport of free and conjugated steroids from the boar testis in lymph, venous blood and rete testis fluid. *J Endocrinol* 1983;96:127-136.
- Sharpe RM. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrin Met* 1998;9(9):371-377.
- Sharpe RM, Rivas A, Walker M, McKinnell C, Fisher JS. Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *Int J Androl* 2003;26:26-36.
- Shetty G, Krishnamurthy H, Krishnamurthy HN, Bhatnagar AS, Moudgal NR. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). *Steroids* 1998;63:414-420.
- Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood, MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K, Mendelson CR. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1997;52:185-214.
- Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr-Relat Cancer* 1999;6:131-137.
- Simpson ER, Davis SR. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis - some new perspectives. *Endocrinology* 2001;142(11):4589-4594.
- Stocco C. Review: aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids* 2008;73:473-487.
- Tekpetey FR, Amann RP. Regional and seasonal differences in concentrations of androgen and estrogen receptors in ram epididymal tissue. *Biol Reprod* 1988;38:1051-1060.



- Tiwari A, Singh D, Kumar OS, Sharma MK. Expression of cytochrome P450 aromatase transcripts in buffalo (*Bubalus bubalis*)-ejaculated spermatozoa and its relationship with sperm motility. *Domest Anim Endocrin* 2008;34:238-249.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette Jr LJ, Jégou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Müller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104:741–803.
- Trunet PF, Mueller P, Bhatnagar AS, Dickes I, Monnet G, White C. Open dose-finding study a new potent and selective nonsteroidal aromatase inhibitor, CGS 20 297, in healthy male subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77(2):319-323.
- Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994;63:451-486.
- Tsubota T, Howell-Skalla L, Nitta H, Osawa Y, Mason MJ, Meiers PG, Nelson RA, Bahr JM. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *J Reprod Fertil* 1997;109:21-27.
- Tsutsumi I, Fugimori F, Nakamura RM, Mather JP, Ono T, diZerega GS. Disruption of seminiferous epithelial function in the rat by ovarian protein. *Biol Reprod* 1987;36(2):451–461.
- Turner KJ, Morley M, Atanassova N, Swanston ID, Sharpe RM. Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *J Endocrinol* 2000;164:225-238.
- Turner KJ, Macpherson S, Millar MR, McNeilly AS, William K, Cranfield M, Groome NP, Sharpe RM, Fraser HM, Saunders PT. Development and

validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J Endocrinol* 2002;172:21-30.

- van der Molen HJ, Brinkmann AO, de Jong FH, Rommerts FF. Testicular oestrogens. *J Endocrinol* 1981; 89:33P-46P.
- Vanselow J, Zsolnai A, Fésüs L, Furbass R, Schwerin M. Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle. *Eur J Biochem* 1999;265:318-324.
- Vanselow J, Furbass R, Zsolnai A, Kalbe C, Said HM, Schwerin M. Expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;79:279-288.
- Vanselow J, Furbass R, Rehbock F, Klautschek G, Schwerin M. Cattle and sheep use different promoters to direct the expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene, *CYP19*, during pregnancy. *Domest Anim Endocrin* 2004;27:99-114.
- Velázquez PN, Peralta I, Bobes RJ, Romano MC. Insulin stimulates proliferation but not 17 $\beta$ -estradiol production in cultured chick embryo ovarian cells. *Poultry Sci* 2006;85:100-105.
- Waites GM, Einer-Jensen N. Collection and analysis of rete testis fluid from macaque monkeys. *J Reprod Fertil* 1974;41:505-508.
- Walker VJ, Noguez V. Changes induced by treatment with aromatase inhibitors in testicular Leydig cells of rats and dogs. *Exp Toxic Pathol* 1994;46(3):211-213.
- Warner M, Wang L, Weihua Z, Cheng G, Sakaguchi H, Saji S, Nilsson S, Kiesselbach T, Gustafsson JA. Analysis of estrogen receptor expression in tissues. *Methods in Enzymology* (DW Russell, DJ Mangelsdorf, Eds.) Academic Press 2003:448-463.
- West NB, Brenner RM. Estrogen receptor in the ductuli efferentes, epididymis, and testis of rhesus and cynomolgus macaques. *Biol Reprod* 1990;42:533-538.

- Wickenheisser KJ, Nelson-DeGrave VL, Hendricks KL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM. Retinoids and retinol differentially regulate steroid biosynthesis in ovarian theca cells isolated from normal cycling women and women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4858-4865.
- Wiseman LR, McTavish D. Formestane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the management of breast cancer and prostatic cancer. *Drugs*. 1993;45(1):66-84.
- Wiseman LR, Goa KL. Formestane. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of postmenopausal breast cancer. *Drugs Aging*. 1996;9(4):292-306.
- Wistuba J, Brinkworth MH, Schlatt S, Chahoud I, Nieschlag E. Intrauterine bisphenol exposure leads to stimulatory effects on Sertoli cell number in rats. *Environ Res* 2003;91:95-103.
- Younes M, Evans BA, Chaisiri N, Valotaire Y, Pierrepoint CG. Steroid receptors in the canine epididymis. *J Reprod Fertil* 1979; 56:45-52.
- Younes MA, Pierrepoint CG. Estrogen steroid-receptor binding in the canine epididymis. *Andrologia* 1981;13:562-572.
- Zhou Q, Clarke L, Nie R, Carnes K, Lai LW, Lien YH, Verkman A, Lubahn D, Fisher JS, Katzenellenbogen BS, Hess RA. Estrogen action and male fertility: Roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4132-4137.
- Zirilli L, Rochira V, Diazi C, Caffagni G, Carini C. Human models of aromatase deficiency. *J Steroid Biochem* 2008;109:212-218.

## **ANEXOS**