



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Papel de las proteínas hemo oxigenasa-1 y ciclooxigenasas y del compuesto natural curcumina en la regulación de las funciones esteroideogénica y proliferativa de las células de Leydig.

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

TRINIDAD RAICES

Director de tesis: Dr. Omar Pedro Pignataro

Directora adjunta: Dra. María Fernanda Riera

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2022

Resumen

Papel de las proteínas hemo oxigenasa-1 y ciclooxigenasas y del compuesto natural curcumina en la regulación de las funciones esteroidogénica y proliferativa de las células de Leydig.

Las células de Leydig constituyen la principal población endocrina del testículo, cuyas funciones son reguladas por el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal y por múltiples factores locales presentes en el microambiente intersticial. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar los efectos de la hemo oxigenasa-1 (HO-1) y las ciclooxigenasas (COX), mediadores clave en procesos antioxidantes e inflamatorios responsables del mantenimiento de la homeostasis celular, y del compuesto natural curcumina, involucrado en la regulación de dichos procesos, sobre las funciones de las células de Leydig. Para tal fin, se utilizaron como modelo dos líneas celulares de Leydig: MA-10 y R2C. En primer lugar, el presente trabajo permitió describir que la inducción de HO-1 por hemina inhibe la esteroidogénesis de forma reversible y que dicho efecto es mediado parcialmente por el monóxido de carbono, que tiene un impacto negativo sobre la actividad de la enzima CYP11A1. Del mismo modo, la inducción de HO-1 inhibe reversiblemente la proliferación celular mediante el arresto del ciclo celular. A su vez, modifica la respuesta esteroidogénica y proliferativa a histamina. En cuanto al estudio de las COX, se observó que la isoforma inducible COX-2 modula negativamente la síntesis de esteroides y que la prostaglandina F_{2α} estaría

involucrada en dicha inhibición. Las isoformas de la COX no tienen un efecto sobre la proliferación o la viabilidad celular. Finalmente, al evaluar el efecto de la curcumina sobre las funciones de las células de Leydig, se observó un efecto estimulador sobre la esteroidogénesis mediado por la inducción de la proteína StAR. Este compuesto natural también inhibe la proliferación y reduce la viabilidad celular. Dichos efectos estarían mediados por el arresto en G2/M a través de la modulación de la expresión de ciclinas e inhibidores del ciclo celular. Por último, en un modelo singénico de tumores de células de Leydig, neoplasias endocrinas con complejas manifestaciones clínicas que no responden a terapias convencionales, la curcumina mostró un significativo efecto antitumoral, sin afectar el estado de salud general de los ratones. En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo amplían el conocimiento acerca de los mecanismos regulatorios de las funciones de las células de Leydig, los cuales podrían tener implicancias tanto en su fisiología como en escenarios patológicos.

Palabras claves: células de Leydig, esteroidogénesis, hemo oxigenasa-1, ciclooxigenasas, curcumina, proliferación, tumores de células de Leydig.

Abstract

Role of the proteins heme oxygenase-1 and cyclooxygenases and the natural compound curcumin in the regulation of Leydig cells steroidogenic and proliferative functions.

Leydig cells comprise the main endocrine population of the testis, whose functions are regulated by the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, as well as multiple local factors in the interstitial microenvironment. The aim of the present work was to study the effects of heme oxygenase-1 (HO-1) and cyclooxygenases (COX), key mediators in antioxidant and inflammatory processes that maintain cell homeostasis, and the natural compound curcumin, also known to modulate such processes, on Leydig cells functions. To this end, MA-10 and R2C Leydig cell lines were used as experimental models. Firstly, it is described that HO-1 induction by hemin reversibly inhibits steroidogenesis and this effect is partly mediated by carbon monoxide, which negatively affects CYP11A1 enzymatic activity. Likewise, HO-1 induction reversibly inhibits cell proliferation by means of cell cycle arrest. Besides, it modifies the steroidogenic and proliferative response to histamine. Regarding the study of COX, it is observed that the inducible isoform COX-2 negatively modulates steroid synthesis and that prostaglandin F_{2α} is involved in this inhibition. COX isoforms do not have an effect on proliferation or cell viability. Finally, when assessing the effects of curcumin on Leydig cells functions, a stimulatory effect on steroidogenesis mediated by StAR protein induction was

observed. This natural compound also inhibits proliferation and reduces cell viability. Such effects are mediated by G2/M cell cycle arrest through the regulation of cyclins and cell cycle inhibitors expression. Finally, in a syngeneic Leydig cell tumor model, endocrine neoplasia with complex clinical manifestations that do not respond to conventional therapies, curcumin showed a marked antitumor effect, without affecting the overall health status of the mice. To sum up, the results obtained in the present study help broaden the knowledge on the regulatory mechanisms that affect Leydig cell functions, which may have implications either in their physiology or in pathologic scenarios.

Key words: Leydig cells, steroidogenesis, heme oxygenase-1, cyclooxygenases, curcumin, proliferation, Leydig cell tumors.

Agradecimientos

A Omar, mi director, por darme un lugar, una línea y permitirme conocer este mundo y el de la docencia.

A Elba, por enseñarme, sobre todo de ciencia, pero también de la vida. Por las ideas para esta tesis. Por ser mi gran compañera.

A Carolina, por ofrecerme siempre su ayuda.

A Juan Carlos, por sus consejos y su calidez.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental, por brindar el espacio, el equipamiento y gran parte de los insumos utilizados en este trabajo. Especialmente, al laboratorio de “Estudios de la Fisiopatología del Ovario” por los CB6F1.

Al Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá”, especialmente a Silvina, por leer y corregir el manuscrito y a todo el equipo, Gustavo, Marina, Agustina, Cecilia y Noel por recibirme tan cálidamente y por la motivadora experiencia de trabajar con ustedes.

A Fernanda, mi directora adjunta, de quien recibí la mano más importante y desinteresada a lo largo de esta etapa. A Marilú y Belén por ser mis “directoras asistentes”. A Milena por haber estado atenta de principio a fin. A las cuatro, por alivianarme el camino y hacer que llegue hasta acá.

Por último, el agradecimiento más grande es para mi mamá, mi papá y mi hermana.

A la Dra. Elba Nora Pereyra

Mi amiga, jefa y mediadora.

Índice

Publicaciones	12
Abreviaturas.....	14
Introducción	17
1. Conceptos básicos de endocrinología.....	17
2. Los testículos.....	20
2.1. Túbulos seminíferos	22
2.2. Intersticio	25
3. La célula de Leydig	26
3.1. Ontogenia	27
3.2. Regulación endocrina: eje hipotálamo-hipofisario-testicular ...	30
3.3. Regulación local de la función esteroidogénica	35
4. Patologías asociadas a las células de Leydig.....	39
4.1. Tumores de células de Leydig.....	40
5. Sistema hemo oxigenasa.....	42
5.1. Hemo oxigenasas en el testículo.....	45
6. Ciclooxygenasas	46
6.1. Ciclooxygenasas y prostaglandinas en el testículo.....	49
6.2. Ciclooxygenasas en las células de Leydig.....	51
7. Curcumina	53
7.1. Usos etnobotánicos.....	53

7.2.	Naturaleza química.....	54
7.3.	Aspectos farmacológicos.....	55
7.4.	Curcumina: usos actuales y regulaciones.....	56
Hipótesis.....		59
Objetivos		61
Objetivo general.....		61
Objetivos específicos.....		61
Materiales y Métodos.....		62
1.	Materiales	62
2.	Modelos experimentales.....	63
2.1.	Línea celular MA-10	63
2.2.	Línea celular R2C	64
2.3.	Células de Leydig de rata.....	65
3.	Cultivo celular.....	65
3.1.	Cultivo de la línea celular MA-10	65
3.2.	Cultivo de la línea celular R2C	66
3.3.	Aislamiento, purificación y cultivo de células de Leydig	67
3.4.	Diseño experimental de los ensayos <i>in vitro</i>	69
4.	Ensayos <i>in vitro</i>	73
4.1.	Inmunocitoquímica: marcación de proteínas	73
4.2.	Radioinmunoensayo: determinación de progesterona	73
4.3.	Recuento celular en cámara de Neubauer.....	74

4.4.	Ensayo WST-1: proliferación y viabilidad celular	74
4.5.	Determinación de la incorporación de [³ H]-timidina.....	75
4.6.	Tinción con Azul de Tripán: viabilidad celular.....	75
4.7.	Citometría de flujo: análisis de las fases del ciclo celular	76
4.8.	TUNEL: análisis de la apoptosis celular	77
4.9.	Determinación de especies reactivas de oxígeno	77
4.10.	Western Blot: determinación de proteínas	78
4.11.	Bradford: cuantificación de proteínas totales	80
4.12.	RT-qPCR: determinación de los niveles de ARNm	80
5.	Ensayos <i>in vivo</i>	82
5.1.	Angiogénesis: ensayo de la membrana corioalantoidea.....	82
5.2.	Crecimiento tumoral: tumores de células de Leydig	83
6.	Análisis estadístico	87
Resultados – Capítulo 1		89
1.	Localización subcelular de la HO-1 en células de Leydig.....	90
2.	Efecto de la hemina sobre la esteroidogénesis	92
3.	Efecto del monóxido de carbono sobre la esteroidogénesis.....	96
4.	Efecto de la hemina sobre la proliferación de células de Leydig...	99
5.	Efecto del monóxido de carbono sobre la proliferación	102
6.	Efecto de la hemina sobre la progresión del ciclo celular	103
7.	Efecto de la hemina sobre la apoptosis	104
8.	Interacción entre HO-1 y HA: esteroidogénesis.....	105

9.	Interacción entre HO-1 y HA: proliferación.....	107
	Conclusiones parciales - Capítulo 1	108
	Resultados – Capítulo 2	109
1.	Localización subcelular de COX-1 y COX-2	110
2.	Efecto de COX-1 y COX-2 sobre la esteroidogénesis	111
3.	Efecto de las prostaglandinas sobre la esteroidogénesis	114
4.	Efecto de COX-1 y COX-2: proliferación y la viabilidad.....	116
5.	Efectos del meloxicam en presencia de hemina.....	117
	Conclusiones parciales - Capítulo 2	120
	Resultados – Capítulo 3	121
1.	Efecto de la curcumina sobre la esteroidogénesis.....	122
2.	Interacción entre la curcumina y HO-1 y COX-2	125
3.	Efecto de la curcumina sobre los niveles de ROS	127
4.	Efecto de la curcumina sobre la proliferación	128
5.	Efecto de la curcumina sobre la progresión del ciclo celular	129
6.	Efecto de la curcumina sobre la viabilidad y la apoptosis.....	131
7.	Efecto de la curcumina sobre la capacidad proangiogénica.....	133
8.	Efecto de la curcumina <i>in vivo</i> : tumores de células de Leydig	135
	Conclusiones parciales – Capítulo 3.....	141
	Discusión.....	142
	Bibliografía.....	169

Publicaciones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- *Heme oxygenase-1 arrests Leydig cells functions and impairs their regulation by histamine.* Raices T, Varela ML, Monzón CM, Correa Torrado MF, Pagotto RM, Besio Moreno M, Mondillo C, Pignataro OP, Pereyra EN. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2019 Oct;63(3):187-197. doi: 10.1530/JME-19-0063.
- *Curcumin Effects on Leydig Cell Functions and Potential Therapeutic Uses.* Raices T, Varela ML, Abiuso AMB, Pereyra EN, Mondillo C, Pignataro OP, Riera MF. 2022. En la última etapa de revisión para su publicación en la revista *Endocrine Oncology*.

También se publicaron artículos originales que surgieron de la colaboración en otros temas de la misma línea de investigación:

- *Histidine decarboxylase inhibitors: a novel therapeutic option for the treatment of leydigoma.* Abiuso AMB, Varela ML, Raices T, Irusta G, Lazzati JM, Besio Moreno M, Cavallotti A, Belgorosky A, Pignataro OP, Berensztein E, Mondillo C. *Journal of Endocrinology*. 2022 Oct 3;255(3):103-116. doi: 10.1530/JOE-21-0419.
- *Interaction between vitamin D and the histaminergic system as a potential therapeutic strategy in the treatment of Leydig cell tumors.* Varela ML, Abiuso AMB, Raices T, Jabłoński M, Besio Moreno M, Belgorosky A, Pignataro OP, Buffone M, Berensztein E, Mondillo M. En preparación.

Las siguientes publicaciones corresponden a trabajos en colaboración con otros grupos de investigación:

- *Metformin improves ovarian insulin signaling alterations caused by fetal programming.* Heber MF, Ferreira SR, Abruzzese GA, Raices T, Pignataro OP, Vega M, Motta AB. *Journal of Endocrinology*. 2019 1:JOE-18-0520.R1. doi: 10.1530/JOE-18-0520.
- *Impairment of renal steroidogenesis at the onset of diabetes.* Pagotto MA, Roldán ML, Molinas SM, Raices T, Pisani GB, Pignataro OP, Monasterolo LA. *Molecular and Cellular Endocrinol.* 2021 15;524:111170. doi: 10.1016/j.mce.2021.111170.

Abreviaturas

17β-HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
22R	22-R-OH colesterol
3β-HSD	3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Barrera hemato-testicular
BSA	Albúmina de suero bovino
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
CYP11A1	Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450 _{scc})
CYP17	P450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa
CYP19	Aromatasa
db-AMPc	Dibutilil adenosina monofosfato cíclico
DCF	Diclorofluoresceína
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidérmico

FMPH	2-[(3-trifluorometil)fenil] histamina
FSH	Hormona folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GTP/GDP	Guanosina trifosfato/difosfato
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HO	Hemo oxigenasa
HRH1/2/4	Receptor a histamina 1/2/4
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-1	Interleuquina-1
IP	Ioduro de propidio
IP3	1,4,5-inositol trifosfato
LH	Hormona luteinizante
LOX	Lipooxigenasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
P450c17	17-hidroxilasa/C17-20 liasa
P5	Pregnenolona
PBS	Buffer fosfato salino
PG	Prostaglandina
PKA	Quinasa dependiente de AMPc
PLC	Fosfolipasa C

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
TCL	Tumores de células de Leydig
TGF-α	Factor de crecimiento transformante tipo α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante tipo β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral de tipo α
UA	Unidades arbitrarias
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
ZnPPIX	Zinc protoporfirina IX
β-tub	β -tubulina

Introducción

1. Conceptos básicos de endocrinología

Del griego endo -ένδο- 'dentro', krino -(ἐκ)κρίνω- 'segregar' y -logiā -λογία 'estudio'

La principal función del **sistema endocrino** es mantener la homeostasis corporal. A su vez, regula el desarrollo, la madurez sexual y la función reproductiva propiamente dicha. El sistema endocrino no posee una localización anatómica definida, sino que está compuesto por grupos localizados de células especializadas distribuidas en distintas partes del cuerpo—las **glándulas endocrinas**—, las cuales reciben señales para la síntesis y secreción de mensajeros circulantes—las **hormonas**—, que ejercerán su efecto regulatorio sobre **células blanco** en diferentes tejidos y órganos.

La mayoría de las glándulas endocrinas [*gland(em) lat. 'bellota' + -ula(m) lat. 'pequeño'*] tienen origen epitelial y consisten en agregados de células epitelioides que se encuentran inmersas en el tejido conectivo. Sólo algunas glándulas o células endocrinas tienen origen mesenquimático y derivan de las crestas urogenitales (por ejemplo, las células de Leydig en el testículo y la corteza de la glándula adrenal). A pesar de que las estructuras endocrinas varían en tamaño, forma y localización, poseen características en común. La más notoria es la ausencia de conductos excretores; sus secreciones son liberadas hacia la matriz extracelular del tejido conectivo en las cercanías de capilares y, desde allí, son transportadas hacia la luz de vasos sanguíneos o linfáticos para su distribución hacia las distintas partes del cuerpo. Otra característica en común es la presencia de gránulos secretorios

especializados dentro de las células endocrinas, que almacenan grandes cantidades de hormonas para que las mismas sean exocitadas en respuesta a señales específicas. Usualmente, la síntesis de hormonas comienza con moléculas precursoras; por ejemplo, el colesterol, el cual es metabolizado para la síntesis de hormonas esteroideas. La biosíntesis de esteroides sexuales será abordada en las siguientes secciones.

La síntesis de hormonas es regulada por diversas señales bioquímicas; las fuentes más comunes de estas señales regulatorias son el sistema nervioso central y los órganos blanco. El hipotálamo y la hipófisis monitorean la concentración circulante de hormonas: liberan hormonas tróficas que activan vías específicas para la síntesis de la hormona por la célula endocrina. Por otro lado, la regulación por retroalimentación desde el órgano blanco ocurre cuando la respuesta a la estimulación hormonal tiene un efecto sobre la célula secretora; este efecto puede ser negativo, cuando la respuesta disminuye la síntesis hormonal o, más raramente, positivo, cuando la aumenta. El mecanismo regulatorio de la síntesis de hormonas dependerá de la naturaleza química de las mismas: la síntesis de hormonas peptídicas es regulada principalmente a nivel de la transcripción, mientras que la síntesis de hormonas esteroideas y aminas es controlada indirectamente mediante la regulación de la producción de enzimas claves de su vía de síntesis y por disponibilidad de sustrato.

La secreción de hormonas también se encuentra finamente regulada por otras múltiples señales que aseguran que los niveles circulantes sean los apropiados para provocar respuestas específicas en los tejidos blanco. Una característica distintiva de la secreción hormonal es la pulsatilidad: la tasa de liberación varía en relación con la actividad de osciladores hipotalámicos que regulan el potencial de membrana de neuronas y secretan oleadas de factores liberadores de hormonas

que actúan sobre la hipófisis y, como consecuencia, tienen efectos sobre otras células endocrinas del organismo. Estos pulsos llevan diferente información a los tejidos blanco que una única concentración estable de la hormona. Por otro lado, algunos tipos de hormonas—como las esteroideas—, son liberadas de forma continua por difusión. Como se mencionó, la regulación de la secreción de estas moléculas es ejercida a nivel de la síntesis: sobre las enzimas o proteínas que actúan en diferentes pasos biosintéticos. Un ejemplo de proteína reguladora es la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), cuyas propiedades y funciones serán analizadas en secciones posteriores.

Una vez sintetizadas y secretadas, las hormonas serán transportadas a través de la sangre. Los niveles circulantes dependerán de la tasa de secreción, de absorción y de degradación y, como se explicará a continuación, de la afinidad de la hormona por proteínas plasmáticas. Las hormonas hidrofílicas no tienen ningún impedimento para ser transportadas en su forma libre por el sistema circulatorio. Sin embargo, otras hormonas poseen muy baja solubilidad en agua (como las esteroideas) y, para su eficiente distribución sistémica, se unen a glicoproteínas transportadoras (como la globulina fijadora de esteroides sexuales o la albúmina). Estos complejos hormona-proteína transportadora, funcionan como reservorios y evitan que la hormona sea rápidamente inactivada o excretada. Las hormonas unidas a sus proteínas transportadoras presentan un equilibrio dinámico con cantidades muy pequeñas de hormona libre en plasma; esta fracción libre tiene actividad biológica dado que puede pasar al compartimento extravascular y atravesar la membrana de las células blanco. Este modo de transporte propone otro mecanismo para regular la biodisponibilidad de las hormonas: regular la expresión y secreción de las proteínas transportadoras.

La palabra hormona deriva del griego *hormaein* (ὁρμᾶν), que significa excitar, poner en marcha. Se trata de señales químicas que se secretan hacia el torrente sanguíneo y actúan sobre tejidos distantes, donde activan vías de señalización que regulan diferentes procesos celulares. En esta puesta en marcha, la hormona sería la llave que acciona la cerradura: receptores de membrana o intracelulares en las células blanco que poseen alta afinidad por la hormona y aportan especificidad a los mecanismos de regulación endocrina. La señalización paracrina—desde una célula hacia células adyacentes—, utiliza las mismas vías moleculares que las señales endocrinas, dado que la maquinaria de respuesta celular no diferencia el sitio de origen de la señal. Una de las diferencias clave entre la señalización endocrina y paracrina es que, como las señales endocrinas difunden por todo el cuerpo, deben ser sintetizadas en grandes cantidades en relación con la concentración requerida para su efecto en el sitio de acción.

Por último, a nivel de las células blanco, tanto el número de receptores por célula como las vías de señalización activadas pueden ser regulados, aportando el último nivel de control de la acción hormonal. Al activar sus receptores específicos, las hormonas ejercen acciones muy variadas que incluyen: modificar el metabolismo, alterar la actividad de canales iónicos, influir sobre el crecimiento celular, etcétera. La actividad concertada de todas las hormonas del cuerpo asegura el mantenimiento de la homeostasis (Barrett *et al.*, 2019; Melmed *et al.*, 2018; Ross & Pawlina, 2015).

2. Los testículos

Del latín testicūlus, diminutivo de testis, ‘testigo de virilidad’.

El sistema reproductor masculino está constituido por los testículos, los conductos genitales excurrentes, las glándulas sexuales accesorias —vesículas

seminales, próstata y glándula bulbouretral—, y los genitales externos, conformados por el pene y el escroto. En esta sección se hará una breve reseña de la anatomía, histología y citología de los testículos, los cuales tienen dos funciones principales: la producción de espermatozoides y la síntesis de hormonas sexuales.

Los testículos son órganos ovoides pares sostenidos en el canal inguinal por la cuerda espermática compuesta por un pedículo neurovascular, el conducto deferente y el músculo cremáster; están ubicados fuera de la cavidad abdominal dentro del escroto. Cada testículo está cubierto por una gruesa cápsula de tejido conectivo—la túnica albugínea—, cuya parte interna—la túnica vasculosa—, está formada por tejido conectivo laxo que contiene vasos sanguíneos. Cada testículo está dividido en, aproximadamente, 250 lóbulos a través de tabiques de tejido conectivo que se proyectan desde la cápsula. En la parte posterior del testículo, la túnica albugínea se engrosa y se proyecta hacia adentro, esta estructura forma el mediastino testicular, a través del cual entran y salen los vasos sanguíneos y linfáticos y los conductos excurrentes genitales.

Cada lóbulo testicular está constituido por dos compartimentos estructural y funcionalmente diferentes:

- El **compartimento tubular**, donde se encuentran las células de Sertoli y las células germinales en varias etapas del desarrollo, que representa entre el 80 y el 90% del volumen del testículo.
- El **compartimento intersticial**, correspondiente al estroma de tejido conectivo, se encuentra entre los túbulos seminíferos y está compuesto por las células de Leydig que secretan testosterona, células peritubulares mioideas, fibroblastos, células neurovasculares y macrófagos.

Dado que los testículos están localizados por fuera de la cavidad abdominal, están expuestos a temperaturas de aproximadamente 2°C por debajo de la temperatura central del cuerpo, lo cual es necesario para la espermatogénesis. La posición del testículo dentro del escroto y su temperatura son regulados por el músculo cremáster, así como también por el flujo sanguíneo (Melmed *et al.*, 2018; Barrett *et al.*, 2019).

2.1. Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos contienen un epitelio conformado por las células de Sertoli que rodean y sostienen a las células germinales que se encuentran en continua diferenciación y desarrollo para formar espermatozoides. Una vez liberados en el lumen, los espermatozoides son transportados por dentro de los túbulos seminíferos—que miden hasta 70 cm de largo y entre 150 y 250 µm de diámetro y están estrechamente enrollados dentro de los lóbulos testiculares—, luego hacia la *rete testis*, los conductos eferentes, el epidídimo y, finalmente, hacia el conducto deferente para su eyaculación (Figura I1).

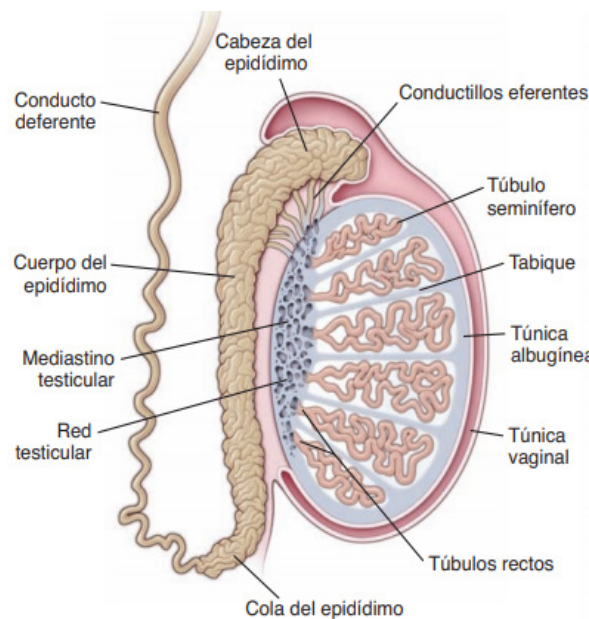


Figura I1. Corte sagital del testículo humano. Diagrama esquemático del testículo humano. Se observan los lóbulos testiculares separados por tabiques, con los túbulos seminíferos en su interior. También se muestra el sistema canalicular genital formado por

los túbulos rectos, la red testicular, los conductillos eferentes, el conducto del epidídimo y el conducto deferente. Obsérvese la cubierta conjuntiva gruesa (túnica albugínea) y la túnica vaginal que la rodea. Tomado de: Ross. *Histología: Texto y Atlas*. Pawlina W. (7ma ed.).

Los túbulos seminíferos están rodeados por una lámina basal compuesta por matriz extracelular que los separa del compartimento intersticial, les provee soporte estructural y regula la función de las células en contacto con la misma. Las células de Sertoli se extienden desde la lámina basal hasta la luz de los túbulos. Las células germinales indiferenciadas, llamadas espermatogonias, se encuentran en contacto con la lámina basal en la periferia de los túbulos, intercaladas entre las células de Sertoli. Las espermatogonias darán origen a los espermátocitos primarios, que iniciarán la meiosis para formar espermatógenos que maduran progresivamente (proceso conocido como espermiogénesis) hasta transformarse en espermatozoides. Entre las células de Sertoli adyacentes se forman uniones estrechas que dividen el túbulo en el compartimento basal—donde residen las espermatogonias y los espermátocitos que no han completado la meiosis I (hasta el estadio de preleptotene)— y el compartimento adluminal, el cual es ocupado por las células germinales que han completado la primera división meiótica: espermátocitos leptoténicos y espermatógenos en distintas etapas de maduración (Figura I2). El proceso a través del cual los espermatozoides son liberados hacia la luz se denomina espermiación.

Las uniones estrechas entre las células de Sertoli constituyen la barrera hemato-testicular (BHT), cuya función principal es restringir el flujo paracelular de sustancias (agua, electrolitos, iones, nutrientes, hormonas, factores paracrinos, entre otros) a través del epitelio de las células de Sertoli hacia el compartimento apical generando de esta manera un microambiente óptimo para el desarrollo de la espermatogénesis. Por la presencia de la BHT, únicamente las células presentes

en el compartimento basal son accesibles para los compuestos que llegan desde la circulación y/o desde las células del compartimento intersticial. Las células que ocupan el compartimento adluminal, por su parte, no son alcanzadas por dichos compuestos y dependen exclusivamente de la regulación ejercida por las células de Sertoli.

Las células peritubulares mioides, que rodean los túbulos seminíferos, son células contráctiles similares a las células del músculo liso y conforman la lámina propia (Figura I2). Su contracción promueve el transporte de los espermatozoides y del fluido testicular dentro de la luz tubular. También proveen integridad estructural al túbulo y secretan componentes de la matriz extracelular, entre otros factores. Tienen receptores de andrógenos y se considera que median algunos de los efectos paracrinos de la testosterona sobre las células de Sertoli, aunque su rol preciso en la fisiología testicular aún no ha sido completamente dilucidado (Melmed *et al.*, 2018; Barrett *et al.*, 2019).

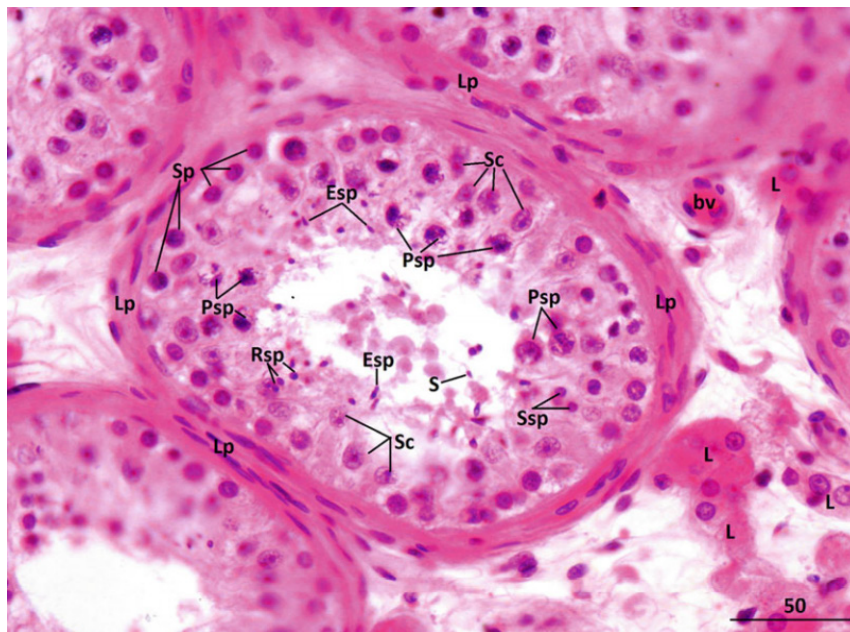


Figura I2. Sección transversal a través de varios túbulos seminíferos. La lámina propia (Lp) está formada por células peritubulares elongadas. Las células de Sertoli (Sc) pueden ser reconocidas por su núcleo ovoides con un nucleolo prominente. Las espermatogonias (Sp) conforman grupos heterogéneos de células. Los espermatozoides primarios (Psp) se originan a partir de las espermatogonias y llevan a cabo la primera división meiótica. Las

mismas dan origen a los espermatocitos secundarios (Ssp) que tienen una vida corta y se dividen para originar las espermatidas haploides redondas (Rsp). Éstas se diferencian y se transforman en espermatidas maduras alargadas (Esp). En ocasiones, pueden observarse espermatozoides (S) que han sido liberados hacia el lumen de los túbulos. En el intersticio, además de acúmulos de células de Leydig (L), pueden observarse muchos vasos sanguíneos pequeños (bV). La barra de escala representa 50 μm . Tomado de: Atlas on the Human Testis: Normal Morphology and Pathology. Jezek D. (1st Ed).

2.2. Intersticio

El compartimento intersticial contiene grupos de células de Leydig (Figura I3), las principales células productoras de esteroides del testículo, que representan aproximadamente el 5% de su volumen. Las células de Leydig producen testosterona, la cual actúa como regulador paracrino sobre las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis. La testosterona también es secretada hacia los capilares testiculares y hacia la circulación general para actuar como una señal endocrina sobre los órganos blanco de los andrógenos. En secciones posteriores, se ahondará sobre las características y funciones de las células de Leydig.

El compartimento intersticial también contiene macrófagos, que regulan la esteroidogénesis en las células de Leydig mediante la secreción de citoquinas y, también, tienen un rol en la fagocitosis de células en degeneración y de los restos celulares necróticos. El intersticio contiene arteriolas y una red de capilares que permiten la secreción de testosterona y otros productos hacia la circulación, y la llegada de los principales reguladores endocrinos de la función testicular, las gonadotrofinas (Melmed *et al.*, 2018). A su vez, en la proximidad de los vasos sanguíneos hay mastocitos, células pertenecientes al sistema inmune originadas a partir de células hematopoyéticas, que sintetizan, almacenan y secretan sustancias como heparina, citoquinas y monoaminas bioactivas como la serotonina, la dopamina y la histamina (Gaytan *et al.*, 1990).

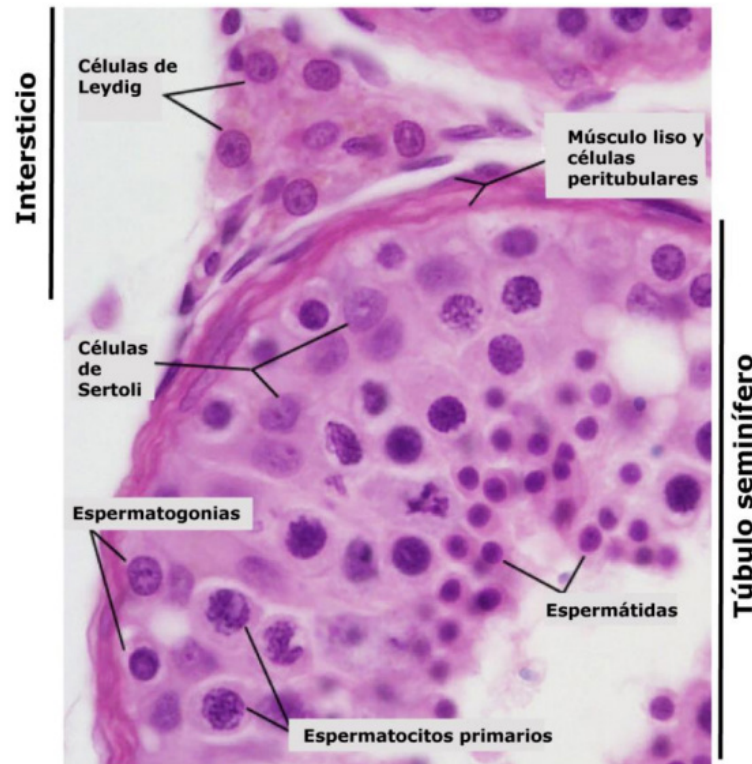


Figura I3. Acúmulo de células de Leydig en el compartimento intersticial del testículo. Corte histológico de testículo mostrando el epitelio seminífero y las células de Leydig intersticiales. Tomado de: Blue Histology - Male Reproductive System. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia.

3. La célula de Leydig

Franz von Leydig (Alemania, 1821-1908)

En 1850, Franz Leydig describió prominentes grupos de células en el testículo mamífero, las cuales resultaron ser la fuente de las hormonas testiculares que controlan la espermatogénesis, el desarrollo y funcionamiento del tracto reproductor, y el establecimiento y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios masculinos (Payne & Hardy, 2007). En esta sección se discutirá la formación de las diferentes poblaciones de células de Leydig a lo largo del desarrollo, su regulación y su función.

3.1. Ontogenia

Del griego óntos -ὄντος- ‘ser, ente’ y géneia -γένεια- ‘origen’

En los mamíferos, existen diferentes poblaciones de células de Leydig en el testículo en distintos periodos de la vida (Teerds & Huhtaniemi, 2015). En roedores, se han identificado dos poblaciones: una presente en el periodo fetal y otra en el adulto. En primates, incluyendo a los humanos, se ha descrito una población adicional de células de Leydig que aparece brevemente durante el período neonatal (Prince, 1990; Svechnikov *et al.*, 2010).

3.1.1. Células de Leydig fetales y neonatales

En el humano, sobre el final del desarrollo fetal y durante los seis primeros meses de vida puede observarse en circulación la presencia de testosterona, cuya liberación es atribuida a las células de Leydig fetales y neonatales (Figura I4). Los andrógenos producidos por las células de Leydig fetales en el período embrionario son cruciales para la masculinización del tracto genital masculino y del cerebro durante las primeras etapas del desarrollo (Griswold and Behringer, 2009). Más específicamente, los andrógenos producidos por las células de Leydig fetales en respuesta a la estimulación del receptor de la hormona luteinizante (LH), determinan la aparición del epidídimo y las vesículas seminales, y la virilización de los genitales externos (Klonisch, Fowler and Hombach-Klonisch, 2004). Cabe destacar que durante la vida fetal el receptor a LH puede ser activado por su ligando clásico LH, o por la gonadotrofina coriónica humana (hCG), proveniente de la placenta materna.

En cuanto a su origen, las células de Leydig fetales poseen diversos potenciales precursores: células de la cresta neural, poblaciones mesonéfricas que originan el sistema urogenital, y el primordio adrenogonadal, en este último caso

compartiendo células progenitoras con la población adrenocortical. Las células de Leydig adultas poseen un origen diferente ya que derivan de células madre de Leydig. En cuanto a su morfología, las células de Leydig fetales se caracterizan por su gran tamaño, citoplasma eosinófilo, núcleo esférico con cromatina densa, gran cantidad de gotas lipídicas, retículo endoplasmático liso altamente desarrollado y mitocondrias con numerosas crestas tubulares. La mayoría de estas características son indicios de una elevada actividad esteroideogénica (Bakalska *et al.*, 2003).

El estudio de la población fetal de células de Leydig presenta grandes desafíos ya que su desarrollo ocurre casi por completo durante la vida intrauterina. Por otro lado, en modelos animales como el murino, su estudio ha sido complejo debido a que los procesos que ocurren durante meses o años en el humano se reducen a períodos muy cortos, generalmente de días, en roedores (Griswold and Behringer, 2009).

Las células de Leydig neonatales producen un aumento breve en los niveles de andrógenos tras la reactivación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (etapa conocida como “mini-pubertad”). La función de este aumento es aún desconocida, pero podría ser importante en el *imprinting* de varios tejidos blanco de andrógenos, como la próstata, el riñón y el cerebro, y en el desarrollo genital (Kuiiri-Hänninen, Sankilampi and Dunkel, 2014). Las células de Leydig neonatales son morfológicamente similares a las fetales; es por esto que algunos autores consideran que se trata de células fetales “re-diferenciadas” (Yazawa *et al.*, 2019).

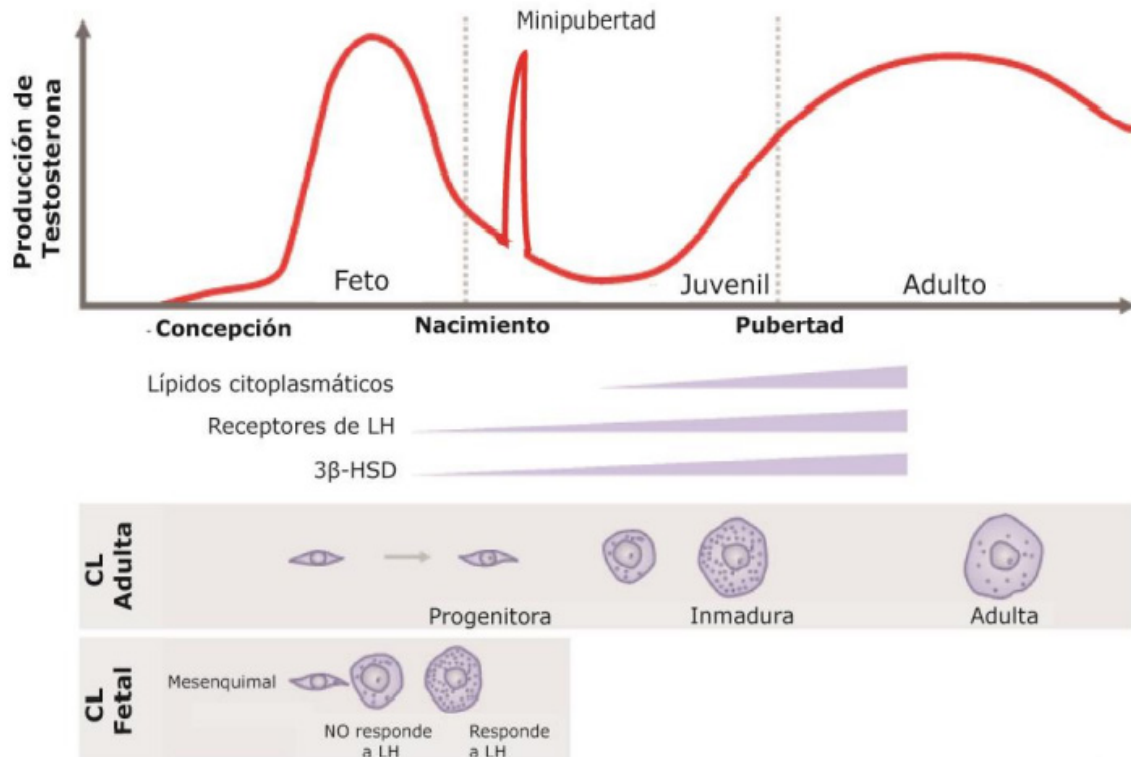


Figura I4. Niveles de testosterona circulante durante el desarrollo gonadal humano. Nótese un primer pico durante la vida fetal requerido para la diferenciación de los genitales masculinos y la masculinización del cerebro y un segundo pico durante los primeros meses de vida, en el período denominado mini-pubertad. Luego la testosterona aumenta conforme se desarrollan las CL adultas. LH: hormona luteinizante. Tomado y modificado de Zirkin *et al.*, 2018; con agregados basados en Kuirri-Hänninen *et al.*, 2014.

3.1.2. Células de Leydig adultas

Las células de Leydig adultas son las encargadas de producir andrógenos luego de la pubertad (Figura I4). Las mismas aparecen durante la pubertad y no se desarrollan a partir de las poblaciones previamente descritas, sino a partir de células madre de Leydig, las cuales están presentes durante la vida fetal y persisten en el testículo adulto (Svechnikov *et al.*, 2010). Las células madre presentan morfología ahusada y son negativas para marcadores típicos de células de Leydig adultas como la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y el receptor a LH (LHR), y positivas para el receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α) (Ge *et al.*, 2006).

El desarrollo de las células de Leydig adultas tanto humanas como murinas consiste en cuatro etapas sucesivas: las células madre de Leydig (“*stem cells*”) se diferencian en progenitoras, éstas en células inmaduras y, por último, en células adultas. Las células de Leydig progenitoras mantienen la forma ahusada de las células madre, pero modifican el patrón de expresión génica, son positivas para marcadores como LHR y 3 β -HSD. Las células de Leydig inmaduras son redondeadas, contienen numerosas inclusiones lipídicas y un retículo endoplasmático muy expandido, al igual que la población adulta. En esta población aumenta la expresión de enzimas esteroideogénicas como la 3 β -HSD y la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol dependiente de citocromo P450 (P450_{scc}, por su nombre en inglés: “*cholesterol side-chain cleavage P450*”; actualmente llamada CYP11A1), dando cuenta de un aumento en su capacidad de producir andrógenos. Las células adultas tienen más retículo endoplasmático liso y menos inclusiones lipídicas que las poblaciones que le dan origen y producen niveles superiores de andrógenos. A diferencia de las demás poblaciones aquí mencionadas, las células de Leydig adultas son posmitóticas y no proliferan (Teerds *et al.*, 1989). En este contexto, la población de células de Leydig inmaduras, que poseen capacidad proliferativa, cumple un rol central en el establecimiento del número de células de Leydig adultas, las cuales, a su vez, pueden regenerarse a partir de la población de células madre (Chen *et al.*, 2017; Davidoff *et al.*, 2004).

3.2. Regulación endocrina: eje hipotálamo-hipofisario-testicular

La función endocrina de las células de Leydig es regulada por la acción concertada de estructuras neuroendocrinas. El hipotálamo, por su parte, es una de las regiones más importantes y conservadas a lo largo de la evolución del cerebro mamífero. Permite el mantenimiento de la homeostasis mediante la producción de respuestas coordinadas tras la integración de señales sensoriales, señales del medio

interno y hormonas. En cuanto a su función en la regulación endocrina, el hipotálamo sintetiza y libera diversos factores que actúan sobre la adenohipófisis y regulan su función hormonal. Las hormonas hipofisarias a su vez actúan sobre diversos órganos endocrinos, cuyas secreciones pueden ejercer retroalimentación tanto positiva como negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis (Melmed *et al.*, 2018).

Entre los factores hipotalámicos previamente mencionados, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es la encargada de estimular a las células gonadotropas adenohipofisarias para la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). La LH llega a través del torrente sanguíneo al intersticio del testículo y se une a receptores específicos en la membrana de las células de Leydig. El receptor a LH pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. El receptor de LH también reconoce con alta afinidad a la hCG, secretada por la placenta (Barrett *et al.*, 2019; Ross & Pawlina, 2015).

Las proteínas G son heterotrímeros formados por las subunidades denominadas α , β y γ , cuya conformación y funcionalidad cambia de acuerdo con la naturaleza del nucleótido de guanina unido —ya sea guanosina difosfato (GDP) o trifosfato (GTP)—. El receptor a LH se acopla a la proteína G conocida como G estimuladora (Gs). En el estado inactivo, la subunidad α de esta proteína está unida a GDP, y asociada al dímero $\beta\gamma$. Cuando la LH o la hCG se unen a su receptor, la proteína Gs se activa al intercambiar el nucleótido GDP por GTP lo cual provoca un cambio conformacional en la proteína y el heterotrímero se disocia. Así, la subunidad α unida a GTP interactúa con y activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), produciéndose un aumento en los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) a partir de adenosina trifosfato (ATP). A su vez, la proteína G se

autorregula, ya que tiene actividad GTPasa. Al hidrolizar el GTP unido, pierde afinidad por la AC, se separa de ella y vuelve a formar el heterotrímero inactivo (Marinissen and Gutkind, 2001).

El AMPc producido actúa como segundo mensajero: se une a las subunidades regulatorias de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), liberándose a su vez las subunidades catalíticas. Así, se activa la PKA, que fosforila múltiples proteínas, entre las que se encuentran la proteína StAR (sigla proveniente de su nombre en inglés: “*steroidogenic acute regulatory protein*”) (Podesta, Dufau and Catt, 1976). La fosforilación de estas proteínas conduce a un aumento en la síntesis de andrógenos en las células de Leydig (Hansson, Skålhegg and Taskén, 2000). Este mecanismo se detiene al degradarse el AMPc por acción de diversas enzimas fosfodiesterasas (Soderling and Beavo, 2000).

Cabe aclarar que la regulación endocrina mediada por el eje hipotálamo-hipofisario-testicular también incluye a las células de Sertoli, las cuales expresan receptores específicos a FSH y andrógenos; y median la regulación de la espermatogénesis por acción de la FSH circulante proveniente de la hipófisis y la testosterona producida localmente por las células de Leydig en respuesta a la LH (Melmed *et al.*, 2018).

3.2.1. Camino esteroidogénico testicular

Los esteroides son sintetizados a partir del colesterol. Este precursor puede provenir de tres fuentes diferentes: de las lipoproteínas plasmáticas, de la síntesis *de novo* a partir de acetil-CoA y de las reservas de colesterol intracelular —en forma de ésteres. La importancia relativa de estas fuentes como precursores esteroidogénicos varía según el tejido, la especie y el grado de estimulación de la producción de esteroides (Payne & Hales, 2004).

Para dar comienzo a la síntesis de esteroides, el colesterol es transportado hacia el interior de la mitocondria por medio de la StAR, lo cual constituye el principal paso regulatorio de la vía biosintética de esteroides. Tras la estimulación de la célula esteroideogénica con hormonas tróficas, un precursor de la proteína StAR de 37 kDa es sintetizado en el citoplasma. El mismo se asocia a la membrana externa mitocondrial y favorece el transporte de colesterol mediante cambios en su conformación. Se cree que, a continuación, la proteína StAR es clivada para dar una forma madura de 30 kDa, deteniéndose así el transporte de colesterol (Stocco, 2000). Alternativamente, se han obtenido evidencias acerca del rol de la forma truncada de 30 kDa en el transporte de colesterol (Manna *et al.*, 2016). Una vez dentro de la mitocondria, el colesterol es convertido en pregnenolona a través de la escisión de su cadena lateral, proceso mediado por la enzima CYP11A1 o P450_{sc}, que se ubica en la cara interna de la membrana interna mitocondrial. Se considera que el transporte de colesterol hacia la mitocondria y su conversión a pregnenolona, son los pasos limitantes de la esteroideogénesis. Seguidamente, la pregnenolona difunde hacia el retículo endoplasmático donde es convertida a progesterona, a través de la acción de la enzima 3 β -HSD. A continuación, la progesterona es convertida a 17-hidroxiprogesterona, y ésta a su vez a androstenediona, a través de la acción de la enzima P450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa (P450 C17, denominación actual: CYP17). La androstenediona es luego transformada en testosterona a través de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa o 17 β -HSD (Payne & Hales, 2004). Cabe destacar que la vía descrita para la síntesis de testosterona es la Δ^4 , predominante en roedores. En humanos, predomina la vía Δ^5 . Además, la enzima aromatasa (CYP19) convierte mediante aromatización a los andrógenos en estrógenos: estrona y estradiol (Inkster, Yue and Brodie, 1995) (ver Figura I5).

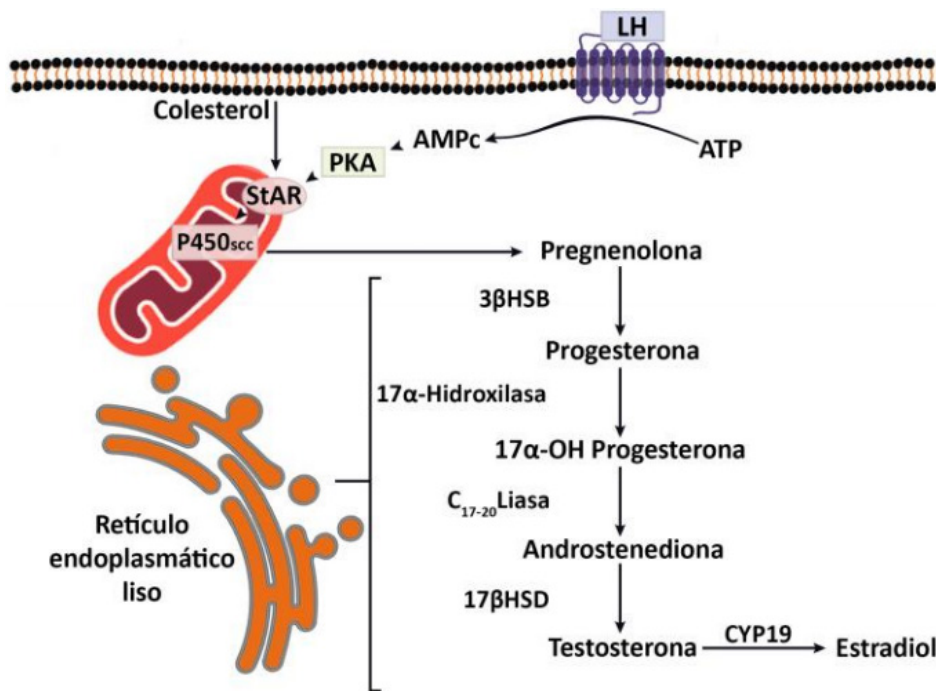


Figura I5. Esteroidogénesis en la célula de Leydig desencadenada por la hormona luteinizante. Se muestra un esquema simplificado de los metabolitos y enzimas involucrados en la esteroidogénesis en la célula de Leydig. Hormona luteinizante (LH), adenosina trifosfato (ATP), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), proteína quinasa A (PKA), proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), citocromo P450scc (CYP11A1), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD y C17-20 liasa), aromatasa (CYP19). Tomado de: Varela 2020.

3.2.2. Respuesta esteroidogénica a LH en función del tiempo

Pueden distinguirse dos tipos de respuesta de las células de Leydig a LH/hCG en función del tiempo: un efecto agudo, que se manifiesta desde los primeros minutos de exposición a la hormona; y efectos tardíos, diferentes al efecto agudo, que se observan horas después de la activación.

El principal efecto agudo para la síntesis de todas las hormonas esteroidogénicas (durante por lo menos las primeras 4 horas) consiste en una estimulación de los mecanismos de transporte de colesterol hacia la mitocondria, donde se encuentra la enzima CYP11A (ver Figura I5) (Privalle, Crivello and Jefcoate, 1983). Al respecto, se ha demostrado que LH/hCG estimula la síntesis de

la proteína StAR, la cual cumple una función indispensable para la biosíntesis de esteroides (Stocco & Clark, 1996; Stocco, 2001).

Los efectos tardíos involucran el aumento de la síntesis *de novo* por efecto de la LH/hCG de al menos algunas de las enzimas del camino esteroidogénico. La principal enzima que ha demostrado responder a este tipo de regulación es CYP11A (Anderson and Mendelson, 1985; Anakwe and Payne, 1987). También se ha descrito en la mayoría de las especies estudiadas que LH/hCG aumenta la expresión de los genes que codifican para las enzimas 3β -HSD y 17α -hidroxilasa/ $17,20$ liasa (Keeney & Mason, 1992; Payne & Sha, 1991).

3.3. Regulación local de la función esteroidogénica de las células de Leydig

Como se indicó previamente, el factor trófico fundamental para la regulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig es la LH hipofisaria. Sin embargo, desde hace años se han reunido vastas evidencias que indican que las diversas poblaciones celulares del testículo pueden ejercer una regulación fina sobre la síntesis de esteroides testiculares (Saez, 1994; Sriraman, Anbalagan and Rao, 2005; Heinrich and DeFalco, 2020). A continuación, se presentan algunos de los mecanismos regulatorios locales descritos.

Las células de Leydig y los macrófagos testiculares conviven en el compartimento intersticial. Sumado a esta cohabitación, existen evidencias acerca de la existencia de digitaciones intercitopasmáticas que conectan físicamente ambos tipos celulares (Hutson, 1992). Esta íntima intercomunicación resulta en una importante influencia de los factores liberados por los macrófagos sobre las funciones de las células de Leydig. Por ejemplo, los macrófagos secretan factor de necrosis tumoral de tipo α (TNF- α), interleuquina-1 (IL-1) y óxido nítrico (NO), todos ellos capaces de modular negativamente la esteroidogénesis (Del Punta, Charreau and Pignataro, 1996; Bornstein, Rutkowski and Vrezas, 2004). También

se ha descrito que los macrófagos producen 25-hidroxicolesterol, que puede ser metabolizado a testosterona por las células de Leydig, y también ejercer un efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis cuando se encuentra a altas concentraciones durante tiempos prolongados (Lukyanenko, Chen and Hutson, 2001). Como prueba adicional de la importancia de la relación entre los macrófagos y las células de Leydig, se ha reportado que la presencia de macrófagos es esencial para el normal desarrollo de la esteroidogénesis *in vivo* (Hales, 2002). Los ratones *knockout* para el factor estimulante de colonias de macrófagos (Csf1) presentan niveles reducidos de testosterona, oligozoospermia, libido disminuida y son infértiles (Rehman, Pacher and Haskó, 2021).

Las células de Sertoli, por su parte, además de ser fundamentales para el desarrollo fetal de las células de Leydig (Yao, Whoriskey and Capel, 2002; Brennan, Tilmann and Capel, 2003), afectan de forma directa sus funciones y son esenciales para el mantenimiento de la población adulta. Se ha descrito que factores secretados por las células de Sertoli, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante tipo α (TGF- α), la inhibina, la activina y el factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β) entre otros, modulan la respuesta de las células de Leydig a LH (Saez, 1994). Estudios que se valen de herramientas para la inhibición de la expresión génica de factores abundantemente expresados en las células de Sertoli también dan cuenta de esta interacción en la regulación de la esteroidogénesis. Por ejemplo, la delección del gen *Wt1*, que codifica la proteína tumoral de Wilms, encargada de la regulación de la polaridad de las células de Sertoli, tiene un impacto negativo sobre la esteroidogénesis en las células de Leydig ya que esta proteína también regula la expresión de factores paracrinos (Chen *et al.*, 2014). A su vez, la ablación de las

células de Sertoli resulta en una reducción en la población de células de Leydig, lo cual confirma la relación entre ambos tipos celulares (Rebourcet *et al.*, 2017).

Finalmente, debe tenerse en cuenta que algunos de estos factores locales regulatorios son producidos por las mismas células de Leydig y ejercen un efecto autocrino sobre la síntesis de esteroides. Por ejemplo, se ha observado que el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el TGF- β (Le Roy *et al.*, 1999), y el TGF- α (Millena *et al.*, 2004) secretados por las propias células de Leydig regulan su actividad esteroidogénica. También, la calretinina, proteína dependiente de calcio altamente expresada en células de Leydig, presenta un efecto autocrino positivo sobre la producción de esteroides (Xu *et al.*, 2018). Se ha propuesto incluso un importante rol de la actividad androgénica autocrina en la regulación de la esteroidogénesis (O'Hara *et al.*, 2015). Sin duda, la existencia de estas interacciones celulares locales, capaces de modular la acción gonadotrófica, provee un eficiente mecanismo para regular la fisiología testicular, evitando la generación de respuestas de tipo todo o nada y permitiendo a la glándula responder en forma fina y ajustada a los distintos estímulos.

3.3.1. Regulación local de las células de Leydig por histamina

La histamina (2-(4-imidazolil)etilamina) es una amina biógena endógena sintetizada a partir de la L-histidina exclusivamente a través de la actividad catalítica de la histidina decarboxilasa, una enzima ampliamente distribuida en el organismo (Ohtsu, 2010). Desde su descubrimiento a comienzos del siglo XX (Dale and Laidlaw, 1910), la histamina ha sido una de las moléculas biológicas más estudiadas en medicina y se le ha atribuido una gran variedad de efectos tanto fisiológicos como en contextos patológicos. Sus efectos son mediados por la unión a cuatro tipos de receptores acoplados a proteína G llamados H1, H2, H3 y H4, los cuales presentan un patrón de expresión típico en cada tejido (Parsons and

Ganellin, 2006). En cuanto a su expresión en el testículo, los receptores H1 y H2 han sido detectados en las células germinales y peritubulares, así como también en macrófagos y células de Leydig (Albrecht *et al.*, 2005; Khan & Rai, 2007; Mondillo *et al.*, 2005; Mondillo *et al.*, 2007, Mondillo *et al.*, 2009). El receptor H4 es el más recientemente descubierto, y ha sido detectado en el testículo (Nguyen *et al.*, 2001; O'Reilly *et al.*, 2002). Nuestro grupo ha descrito su expresión en células de Leydig (Abiuso *et al.*, 2014). Por otro lado, el receptor H3 se expresa casi exclusivamente en el sistema nervioso (Nieto-Alamilla *et al.*, 2016).

En cuanto al rol regulatorio de la histamina sobre las funciones de las células de Leydig, nuestro grupo ha realizado aportes en relación con sus efectos tanto sobre la esteroidogénesis como sobre la proliferación. A este respecto, se ha descrito que la histamina ejerce un efecto bifásico sobre la biosíntesis de esteroides en células de Leydig tumorales murinas MA-10 y cultivos primarios de células de Leydig de rata: potencia la esteroidogénesis basal y la estimulada por LH/hCG a concentraciones nanomolares, que corresponderían a la concentración fisiológica de la amina, y la inhibe a concentraciones suprafisiológicas (del orden micromolar) (Mondillo *et al.*, 2005). El efecto estimulador está mediado por la activación del receptor H2, que conduce a la activación de una proteína Gs y el aumento en la producción de AMPc, mientras que la reducción de los niveles de esteroides involucra la activación de los receptores H1 y H4. El receptor H1 se asocia a una proteína Gq la cual estimula la vía de la fosfolipasa C (PLC)/ 1,4,5-inositol trifosfato (IP3) y aumenta la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). El receptor H4, por su parte, se asocia a una proteína G inhibitoria (Gi) que, al activarse, inhibe la adenilato ciclasa (Abiuso *et al.*, 2014; Mondillo *et al.*, 2009). La participación de los receptores H1 y H2 en la modulación de la esteroidogénesis ha sido descrita también en otros modelos experimentales

(Albrecht *et al.*, 2005; Khan and Rai, 2007). Para respaldar la importancia de la histamina en la regulación de la esteroidogénesis en células de Leydig, se han realizado estudios que demuestran que tanto células de Leydig como ratones *knockout* para la enzima histidina decarboxilasa muestran una capacidad esteroidogénica comprometida en comparación con las células o ratones salvajes (Mondillo *et al.*, 2005; Mondillo *et al.*, 2007).

En cuanto al rol de la histamina en la regulación de la proliferación de células de Leydig, hemos demostrado que células de rata normales progenitoras e inmaduras no exhiben una respuesta proliferativa en respuesta a histamina. Sin embargo, la histamina estimula la proliferación de células de Leydig tumorales MA-10 a través del receptor H2 y la inhibe a través del receptor H4, a concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas, respectivamente (Pagotto *et al.*, 2012; Abiuso *et al.*, 2014). Considerando que se trata de una línea celular tumoral, estas evidencias podrían ser relevantes en un contexto patológico.

4. Patologías asociadas a las células de Leydig

La desregulación de la población de células de Leydig puede dar origen a patologías testiculares; entre ellas, la hiperplasia y la hipoplasia de células de Leydig, la presencia de células de Leydig ectópicas y los tumores de células de Leydig. Las dos primeras están relacionadas con la proliferación benigna excesiva de las células de Leydig o con el desarrollo incompleto del testículo, respectivamente (Laue *et al.*, 1996; Akingbemi *et al.*, 2004). Las células de Leydig ectópicas aparecen fuera del intersticio testicular, generalmente dentro del túbulo seminífero u obstruyendo conductos deferentes. Esta condición es producto de alteraciones en la señalización durante el desarrollo gonadal y puede producir infertilidad (Jun *et al.*, 2008; Barsoum *et al.*, 2009). En la siguiente sección, se

describirán los tumores de células de Leydig y se discutirá su incidencia, manifestaciones clínicas y estrategias terapéuticas actuales.

4.1. Tumores de células de Leydig

Tal como ha sido postulado por Hanahan y Weinberg, un tumor es una masa de células con potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, y capacidad de evadir la apoptosis, mantener la angiogénesis y metastatizar. A esto se suma la desregulación del estado energético celular, la evasión a la inmunovigilancia, la inflamación y la inestabilidad genómica (Hanahan and Weinberg, 2011).

Los tumores de células de Leydig (TCL), también denominados leydigomas, son tumores endocrinos presentes predominantemente en el intersticio testicular. Sin embargo, existen numerosos reportes de casos clínicos que dan cuenta de la existencia de una incidencia relativamente alta de este tipo de tumores en ovario, siendo menor en cordón espermático y glándula adrenal (Hilton and Pollock, 1988; Lanzafame, Leonardi and Torrisi, 2004). Teniendo en cuenta los reportes de casos clínicos, aproximadamente del 2 al 4% de los tumores testiculares corresponde a TCL, sin embargo, el reciente avance en técnicas de diagnóstico por imágenes sugiere que su incidencia podría estar siendo subestimada (Leonhartsberger *et al.*, 2011). Los TCL presentan dos picos de incidencia, uno a edades tempranas, en pacientes pediátricos de 5 a 10 años, y otro en pacientes adultos de 25 a 35 años (Ahmed *et al.*, 2010). A nivel nacional, la Dirección de Estadísticas e Información en Salud del Ministerio de Salud de la Nación (<http://www.deis.msal.gov.ar>) ha reportado a la fecha un creciente aumento en el número de egresos y defunciones causadas por tumores testiculares en establecimientos hospitalarios argentinos, lo cual sugiere la necesidad de prestar mayor atención a este tipo de neoplasias. Esta misma tendencia ha sido observada

a nivel mundial (Vega *et al.*, 2012; Gheorghisan-Galateanu, 2014). En línea con estos datos, se ha registrado un aumento constante en el número de publicaciones acerca de TCL a lo largo de los últimos años (Fuente: PubMed).

En cuanto a las manifestaciones clínicas de esta patología, los TCL pediátricos se presentan como tumores indoloros, generalmente palpables, con síntomas como pseudo pubertad precoz y altos niveles de 17-cetoesteroides. Del 10 al 15% de estos pacientes puede presentar signos de feminización como la ginecomastia (Ahmed *et al.*, 2010). Los pacientes adultos suelen presentar oligozoospermia (densidad de espermatozoides en el eyaculado menor a 15×10^6 /ml), azoospermia (carencia de espermatozoides en el eyaculado), pérdida de la libido, ginecomastia, desórdenes endocrinos, infertilidad y/o atrofia testicular (Kim, Young and Scully, 1985; Ruf *et al.*, 2020).

En relación a los tratamientos empleados, las terapias convencionales en el caso de los tumores benignos consisten en la resección quirúrgica del o de los testículos afectados, y el posterior reemplazo hormonal, lo cual conduce, en algunos casos, no solo a la pérdida de las funciones reproductivas de los pacientes (Shaul *et al.*, 1997), sino también a trastornos psicológicos (Jonker-Pool *et al.*, 2004). En presencia de tumores bilaterales, se suelen realizar cirugías conservativas, pero este enfoque terapéutico resulta perjudicial si los tumores se han diagnosticado como benignos cuando no lo son (Ross, 2009).

Se ha reportado que un 12,5% de los TCL maligniza en pacientes adultos (Kim, Young and Scully, 1985; Conkey *et al.*, 2005). Los tumores malignos son resistentes a la radio y a la quimioterapia, lo cual conlleva a que los pacientes posean una sobrevivencia promedio de solamente dos años (Shinn *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos de malignización de los TCL, se procede a la resección de los nódulos linfáticos retroperitoneales, generalmente los primeros en ser afectados,

pero aun así la supervivencia es muy baja (Geminiani *et al.*, 2015). Además de los nódulos linfáticos, los órganos comúnmente afectados en el caso de TCL metastásicos son los pulmones, el hígado, los huesos y el riñón (Bokemeyer *et al.*, 1993).

En base al mal pronóstico para los pacientes con TCL malignos y la ineficacia de las terapias convencionales, los esfuerzos actuales están centrados en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

5. Sistema hemo oxigenasa

El hemo es un complejo hierro-protoporfirina con importantes funciones en los sistemas biológicos, dado que funciona como grupo prostético esencial para el correcto funcionamiento de proteínas como la hemoglobina, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), guanilato ciclasa, peroxidasa, óxido nítrico sintasa, la familia citocromo P450, entre otras. Sin embargo, el hemo en su forma libre puede contribuir al aumento del hierro ferroso y, como consecuencia, causar daño oxidativo. El hemo libre aumenta debido a eventos como la sobrecarga de hemo extracelular, aumento en la síntesis de hemo, ruptura acelerada de hemoproteínas o reducción de la incorporación del hemo a hemoproteínas. La vía de degradación es entonces crítica para la remoción del exceso de hemo que resulta tóxico para células y tejidos (Kumar and Bandyopadhyay, 2005; Wegiel *et al.*, 2014).

Por otro lado, los organismos vivos nos encontramos permanentemente expuestos a toxas tóxicas que producen estrés oxidativo, es decir, una alteración en el balance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) o radicales libres y las defensas antioxidantes (Betteridge, 2000). Este desbalance no es causado únicamente por el hemo libre sino por múltiples agentes tan diversos

como la radiación, la luz UV, la contaminación del aire, el alcohol, el envejecimiento, etcétera (Pisoschi and Pop, 2015). Dependiendo de la dimensión de este desbalance, pueden verse afectados procesos celulares como consecuencia del daño a importantes macromoléculas como el ADN y las proteínas. En este contexto, las células responden con mecanismos de protección frente al aumento de ROS que se basan en la activación de factores que son sensibles al estrés oxidativo. Entre ellos, el más relevante es el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2): factor de transcripción responsable de la regulación del balance redox celular y la protección antioxidante. Este factor se une a una secuencia consenso llamada “elemento de respuesta antioxidante” (ARE), presente en una batería de genes, e induce su expresión. Entre estos genes, se encuentran los de la glutamato-cisteína ligasa, la tiorredoxina reductasa, la NAD(P)H-quinona oxidoreductasa-1 y la hemo oxigenasa-1, proteínas encargadas directa o indirectamente del mantenimiento del balance redox y la protección contra el estrés oxidativo (Loboda *et al.*, 2016).

El sistema hemo oxigenasa (HO), cuya primera caracterización se remonta al año 1969 (Tenhunen, Marver and Schmid, 1969), está compuesto por enzimas microsomales que catalizan el paso limitante en la degradación del hemo y constituyen el mecanismo celular más importante para la reducción del hemo libre tóxico. En 1986, surgieron las primeras evidencias de la existencia de dos isoenzimas estructural y funcionalmente distintas, que son producto de diferentes genes: HO-1 y HO-2 (Cruse & Maines, 1988; Maines *et al.*, 1986). Dichas proteínas presentan una secuencia de 23 aminoácidos llamada “bolsillo de unión al hemo”. Por fuera de esta secuencia en común, la identidad de secuencia entre la HO-1 y HO-2 es solamente del 50% (Maines & Gibbs, 2005). Una tercera isoforma catalíticamente inactiva ha sido descrita (McCoubrey, Huang and Maines, 1997);

sin embargo, fue caracterizada en ratas como un pseudogén derivado de los transcritos de HO-2 (Hayashi *et al.*, 2004).

Entre las isoformas de la hemo oxigenasa, la HO-1 es la isoenzima más estudiada ya que se encuentra ubicuamente expresada en el organismo en niveles bajos y es inducible; es decir, su expresión se ve aumentada en una variedad de contextos fisiopatológicos, por una enorme cantidad de estresores y señales. Entre ellos podemos mencionar al hemo (su sustrato natural), los metales de transición, el peróxido de hidrógeno, las citoquinas, las prostaglandinas, las endotoxinas, el calor, la radiación, la hipoxia y la hiperoxia. La HO-2, por el contrario, se encuentra expresada generalmente de forma constitutiva en condiciones basales y se ha reportado su expresión en los testículos, el bazo, el hígado, el riñón y en los sistemas cardiovascular y nervioso (Ryter, Alam and Choi, 2006; Piotrkowski *et al.*, 2009; Muñoz-Sánchez and Chánez-Cárdenas, 2014). Como se ha mencionado, la función de estas enzimas es catalizar el paso limitante en el metabolismo del hemo, uniéndolo como grupo prostético y sustrato. La reacción involucra siete pasos, consume oxígeno molecular y NADPH, requiere la actividad de la enzima citocromo P450 reductasa y genera cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), Fe^{2+} y biliverdina. En mamíferos, la biliverdina es rápidamente reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa (Yoshida and Migita, 2000).

La HO-1 tiene actividad citoprotectora; pero no solamente por su importante rol en la eliminación del hemo libre, sino también por las propiedades beneficiosas de los productos de la reacción que cataliza. La bilirrubina, por un lado, es un potente antioxidante y modulador de las respuestas metabólicas durante la inflamación (Wegiel *et al.*, 2014). El hierro es conocido por facilitar la generación de ROS a través de la reacción de Fenton, lo cual nos llevaría a pensar que se trata de un producto tóxico; sin embargo, se ha demostrado que este metal une proteínas

reguladoras de hierro, induciendo la expresión de ferritina, una enzima protectora que secuestra iones hierro (Arosio *et al.*, 2015). El CO endógeno, por su parte, es un “gasotransmisor” con múltiples funciones beneficiosas: anti-apoptótica, antiinflamatoria, vaso-regulatoria, homeostática, etcétera. A su vez, tiene importantes funciones en la regulación del metabolismo, con la mitocondria como principal organela blanco: aumenta la síntesis de ATP, estimula la biogénesis mitocondrial, aumenta la fosforilación oxidativa, etcétera (Figueiredo-Pereira *et al.*, 2020).

5.1. Hemo oxigenasas en el testículo

Las primeras evidencias acerca de la presencia de un sistema hemo oxigenasa funcional en el testículo, que sentaron las bases para los vastos estudios posteriores, fueron aportadas por una serie de trabajos del grupo de Maines y colaboradores en los años ochenta y noventa. Los primeros estudios versaban sobre la actividad hemo oxigenasa en el testículo y su modulación por metales. En estos estudios, se postuló que la actividad hemo oxigenasa es más elevada en las células de Leydig que en las células de Sertoli (Maines, 1984; Maines *et al.*, 1982). A continuación, las isoformas HO-1 y HO-2 fueron detectadas en el testículo humano (Trakshel and Maines, 1988). También se caracterizó la localización de las isoenzimas HO-1 y HO-2 en el testículo de rata en condiciones basales y de hipertermia. En condiciones basales, HO-1 se encuentra presente en niveles bajos en las células de Sertoli únicamente, mientras que HO-2 se encuentra principalmente expresada en los espermatocitos, espermátidas y células de Leydig. Frente al estímulo por estrés, el patrón de expresión de HO-2 no se modifica, mientras que la expresión de la HO-1 aumenta en células de Sertoli y Leydig (Ewing and Maines, 1995). A partir de estas evidencias, se ha estudiado ampliamente la función hemo oxigenasa en el testículo, haciendo foco principalmente en su rol citoprotector frente a una

variedad de estresores y condiciones patológicas: varicocele (Shiraishi and Naito, 2005), isquemia-reperfusión por torsión-destorsión (Yang *et al.*, 2007), hipertermia (Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013), exposición a cadmio (Ji *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019), entre otros.

Nuestro grupo ha realizado aportes en un área poco explorada: las hemo oxigenasas en las células de Leydig y el efecto de la inducción de HO-1 sobre sus funciones. Hemos verificado la expresión de ambas isoenzimas en la línea de células de Leydig murina MA-10, su inducción por hemina (nombre farmacológico para el grupo hemo) y su efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis basal y estimulada por el segundo mensajero permeable dibutiril-AMPC (db-AMPC), mediante la disminución de la expresión de StAR y la inhibición de la actividad de la enzima citocromo P450_{scc} (Piotrkowski *et al.*, 2009). Sin embargo, la información sobre el rol de la hemo oxigenasa sobre las funciones de las células de Leydig continúa siendo escasa.

6. Ciclooxygenasas

Las ciclooxygenasas (COX) son enzimas que catalizan el paso limitante en la biosíntesis de prostaglandinas (PG). Las PG se forman por ciclación oxidativa de los cinco carbonos centrales de ácidos grasos poliinsaturados de veinte carbonos. La COX cataliza la conversión de ácido araquidónico u otros ácidos grasos de veinte carbonos a PGG₂. Luego, mediante un sitio activo peroxidasa, reduce un hidroperoxilo de PGG₂ a hidroxilo para formar PGH₂. PGH₂ es convertida por acción de sintasas y cetorreductasas, y reacciones de deshidratación e isomerización no enzimática a una variedad de eicosanoides que incluyen PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , PGI₂ y tromboxano A₂. Los ácidos grasos que sirven de sustrato a

COX se forman a partir de la hidrólisis de fosfolípidos (Mead *et al.*, 1986; Dubois *et al.*, 1998).

Las prostaglandinas, que se encuentran en la mayoría de los tejidos y órganos, son producidas por casi todos los tipos celulares, y la variedad de prostaglandinas producidas depende de la maquinaria enzimática presente en cada uno de ellos. Constituyen mediadores autocrinos o paracrinos para señalar cambios dentro de un determinado microambiente (Dubois *et al.*, 1998). Dado que el efecto de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como la aspirina es mediado por la supresión de la producción de prostanoides (prostaglandinas y tromboxano), estas moléculas han sido implicadas en los procesos inhibidos por estas drogas, incluyendo inflamación, fiebre y dolor. Sin embargo, los prostanoides también median procesos fisiológicos como la homeostasis vascular, la reproducción y la regulación de las funciones renal y gastrointestinal (Narumiya, 2007).

La COX también es conocida como prostaglandina H sintasa (PGHS) o prostaglandina endoperóxido sintasa (PTGS). Está presente en dos isoformas distintas, COX-1 y COX-2, codificadas por genes diferentes. Dependiendo del proceso biológico, las isoenzimas de la COX pueden actuar individual o concertadamente o, en casos donde alguna es insuficiente, de forma compensatoria (Smith and Langenbach, 2001). Recientemente se descubrieron nuevas variantes de COX, como COX-3 y PCOX-1, resultantes de cambios en el procesamiento del ARNm que afectan la región codificante de COX-1, así como también poliadenilaciones alternativas de COX y polimorfismos de nucleótido único (Simmons, Botting and Hla, 2004).

Las primeras evidencias acerca de la existencia de dos isoenzimas de COX surgieron cuando comenzó a observarse que, en ciertos escenarios, como en plaquetas activadas, la síntesis de prostaglandinas ocurría luego de unos pocos

minutos de la estimulación, pero, en otros casos, como en fibroblastos estimulados por mitógenos, la síntesis de prostaglandinas se evidenciaba luego de horas. Incluso un mismo tipo celular podía presentar un pico temprano y otro tardío en la inducción de su síntesis. Esto llevó a la conclusión de que existen dos tipos de regulación del sistema enzimático de síntesis de prostaglandinas, uno independiente de la síntesis proteica y otro que requiere de la traducción de la enzima ciclooxigenasa (Simmons, Botting and Hla, 2004). Estas dos actividades fueron un indicativo de la existencia de una enzima endógena constitutiva (COX-1), presente en la mayoría de los tipos celulares, y otra inducible (COX-2), que parece ser expresada únicamente en las etapas tempranas de diferenciación celular y replicación y en respuesta a variados estímulos como citoquinas y factores mitogénicos. La inducción de la COX-2 ha sido descrita en procesos fisiológicos y patológicos incluyendo inflamación, angiogénesis, absorción ósea, ulceración gástrica, enfermedades renales y desórdenes del tracto genital femenino (Katori and Majima, 2000). Además, la COX-2 se encuentra sobreexpresada en la mayoría de los tipos de tumores, incluyendo tumores de mama, colon, pulmón y próstata (Harris, 2009).

A pesar de la prevalencia de esta clásica noción de la existencia de una isoforma constitutiva y otra inducible, se ha reportado que, en determinados contextos, la expresión de COX-1 puede ser modulada. Por ejemplo, la COX-1 es regulada de forma positiva y de diferente modo respecto de la COX-2 en estadios tardíos de SIDA en distintas poblaciones celulares del cerebro de monos Rhesus (Depboylu, Weihe and Eiden, 2011). También, moléculas como citoquinas, TGF- β e IL-1 estimulan la síntesis de ARNm de la COX-1 en líneas celulares de fibroblastos y endoteliales (Jackson *et al.*, 1993). Otros escenarios en los que se ha observado que la expresión de COX-1 puede ser modulada es el desarrollo

embrionario temprano de humanos (Rheinlaender *et al.*, 2006) y en la zona medular del riñón en ratas hipertensas en respuesta al tratamiento con sal (Bernard *et al.*, 2000). El hecho de que la expresión de ambas enzimas sea modulable aumenta la relevancia del estudio de la participación de ambas isoformas de la COX en diferentes escenarios fisiopatológicos.

Las isoformas COX-1 y 2 participan en la misma reacción catalítica y tienen una estructura primaria similar. Sin embargo, la mayoría de los efectos inflamatorios o inducibles son mediados por COX-2, mientras que aquellos efectos constitutivos relacionados con la regulación homeostática son mayormente mediados por COX-1. Esta distribución de roles es consistente con sus patrones de expresión en los tejidos: casi todos los tejidos normales, en condiciones basales, expresan COX-1 con bajos niveles de COX-2 (Dubois *et al.*, 1998).

6.1. Ciclooxygenasas y prostaglandinas en el testículo

Reportes acerca de la presencia de las isoenzimas de la ciclooxigenasa en los testículos de diferentes especies han mostrado ciertas discrepancias en cuanto a la localización y los niveles de expresión. En roedores, se ha reportado que tanto la COX-1 como la COX-2 se expresan de forma constitutiva en el testículo; específicamente, en las células de Leydig, de Sertoli y de la línea germinal (Neeraja *et al.*, 2003; Balaji, Ramanathan and Padmanabhan Menon, 2007; Winnall *et al.*, 2007). En alpacas y en perros, también se evidenció la expresión constitutiva de ambas isoformas en el testículo (Zerani *et al.*, 2011; Ogawa *et al.*, 2017). Sin embargo, ha habido estudios en ratones que no detectaron niveles basales de COX-2 (Yazawa *et al.*, 2019). En humanos, se ha reportado que los niveles basales de COX-1 y COX-2 en el testículo normal son bajos o nulos (Frungeri *et al.*, 2002; Matzkin *et al.*, 2019; O'Neill & Ford-Hutchinson, 1993). Por otro lado, se ha descrito que ambas isoformas se encuentran expresadas en espermatozoides

normales (Perrotta *et al.*, 2012). Estas diferencias entre los reportes podrían deberse a patrones de expresión especie-específicas o a la sensibilidad de las técnicas de detección utilizadas. Sin embargo, todos los reportes concuerdan en que los niveles de COX-2 testiculares aumentan en contextos inflamatorios y en escenarios patológicos (Frungieri *et al.*, 2002; Hase *et al.*, 2003; Perrotta *et al.*, 2012; Welter *et al.*, 2013).

Un estudio de ratones macho *knockout* para *Cox1* y *Cox2* mostró que los mismos no veían afectada su fertilidad (Langenbach *et al.*, 1999). A pesar de que estos resultados indican que el sistema COX/PG no sería crítico para la función testicular, estudios posteriores sugieren lo contrario. Se ha reportado que el paracetamol y algunos AINEs como la aspirina, la indometacina y el ibuprofeno inducen alteraciones endocrinas en el testículo humano fetal que interfieren con el descenso testicular y con la calidad espermática y la fertilidad (Mazaud-Guittot *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2020). A su vez, la PGD2 afecta la diferenciación de las gametas masculinas en el testículo fetal murino (Moniot *et al.*, 2014) y se ha propuesto que una isoforma de la PGD2 sintasa participa en la diferenciación de las células de Sertoli (Rossitto *et al.*, 2015).

En estudios sobre fertilidad, se descubrió una correlación positiva entre los niveles de IL-1 β y la expresión de COX-2 en testículos de pacientes infértiles. Esto llevaría a la inducción de la síntesis de prostaglandinas y a la inflamación local, pudiendo deteriorar la función testicular (Matzkin *et al.*, 2010). También se ha relacionado la sobreexpresión en espermatozoides de ambas isoformas de COX con la infertilidad masculina en pacientes con varicocele o diabetes mellitus (Perrotta *et al.*, 2012). A su vez, en un estudio comparativo entre tejidos de testículo normal y cáncer de testículo humanos, se encontró que la expresión de COX-1 y COX-2 estaría fuertemente aumentada en cáncer de testículo. También, mediante

el tratamiento con inhibidores de ambas isoenzimas, se determinó que son esenciales para la propagación de las células de cáncer de testículo (Hase *et al.*, 2003). Por otro lado, mediante el análisis de modelos de ratón con envejecimiento acelerado o retardado, se reportó que los testículos de ratones adultos con una mayor expectativa de vida presentan mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes y anti-apoptóticos entre los que se encuentran la expresión reducida de COX-2 y una menor producción de PGD₂ (Matzkin *et al.*, 2016). Se han reportado también algunos efectos beneficiosos de COX-2. En ratones con criptorquidia unilateral producida experimentalmente se observó un mecanismo que, a través de la expresión de COX-2, disminuye la apoptosis de células germinales inducida por esta patología. Asimismo, se describió que COX-2 podría tener un rol importante en la protección de espermatozoides frente al estrés por calor (Kubota *et al.*, 2011).

6.2. Ciclooxygenasas en las células de Leydig

Estudios relacionados con el rol del ácido araquidónico (AA), sustrato de las COX, en la esteroidogénesis en células de Leydig demostraron que la estimulación por hormonas tróficas induce la formación de AMPc y la liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos, y que estos dos compuestos son requeridos para la biosíntesis de esteroides en células de Leydig murinas tumorales MA-10 (Wang *et al.*, 2000). A su vez, se ha reportado que el AMPc y el AA actúan de forma sinérgica para aumentar la sensibilidad de la síntesis de esteroides frente a la estimulación de hormonas tróficas (Wang *et al.*, 2002). Esto ocurre mediante la estimulación de la síntesis de metabolitos del AA de la vía de la lipooxigenasa (LOX; HPETE y 5-HETE) por parte del AMPc, los cuales estimularán la expresión de StAR (Wang *et al.*, 2003).

Por otro lado, mediante ensayos desarrollados en células de Leydig de hámster sirio, una especie fotoperiódica, se describió un mecanismo regulatorio

esteroidogénico en el que se encuentra involucrada COX-2. Frente a una estimulación por LH/hCG y consecuente síntesis de esteroides, la testosterona actuaría como un factor regulatorio autocrino que impactaría sobre los receptores de andrógenos de la membrana plasmática (Matzkin *et al.*, 2009). Su activación llevaría a la fosforilación de ERK 1/2 aumentando la expresión de COX-2 y la síntesis de PGD2 y PGF2 α , las cuales actuarían sobre los receptores de PGs de tipo DP y FP, respectivamente. Mientras PGD2 tiene un efecto estimulador sobre la síntesis de testosterona basal en células de Leydig de hámster, PGF2 α ejerce un efecto inhibitorio sobre la proteína StAR y la enzima 17 β -HSD y la síntesis de testosterona estimulada por LH/hCG (Frungieri *et al.*, 2006; Schell *et al.*, 2007). Los receptores de PGs han sido detectados en diferentes poblaciones testiculares, incluyendo las células de Leydig, así como también las sintasas necesarias para la síntesis de PGD2 y PGF2 α a partir del ácido araquidónico (Baker and O'Shaughnessy, 2001; Schell *et al.*, 2007; Suzuki-Yamamoto *et al.*, 2007; Frungieri *et al.*, 2015)

Existen evidencias también de la participación de COX-2 en la disminución de la esteroidogénesis relacionada con la edad. Se reportó un aumento en la expresión de esta enzima en testículos de rata de edad avanzada, lo cual correlaciona con la disminución de la esteroidogénesis. Este efecto fue revertido mediante el tratamiento con inhibidores específicos de COX-2 (Wang *et al.*, 2005).

A partir de la información presentada en esta sección se hace evidente la relevancia de ahondar en el estudio del sistema COX/PG como mediador clave de procesos inflamatorios y su rol regulador de la función testicular y, en particular, de las células de Leydig.

7. Curcumina

El nombre cúrcuma es utilizado para referirse a la especia culinaria colorado, y también a la planta a partir de cuyo rizoma se extrae. La curcumina es uno de los principales fitoquímicos de la cúrcuma. En esta sección se discutirá su naturaleza química, aspectos farmacológicos, usos y regulaciones.

7.1. Usos etnobotánicos

El género *Curcuma*, compuesto por aproximadamente 120 especies de plantas, posee un amplio registro de aplicaciones medicinales (Akarchariya *et al.*, 2017; Dosoky and Setzer, 2018). Pertenece a la familia *Zingiberaceae*, la cual incluye otras plantas tropicales medicinales como el jengibre. Entre las diferentes especies, la *Curcuma longa L.* (conocida como cúrcuma o “turmeric” en inglés), cultivada en climas cálidos en muchas regiones en el mundo, es la más reconocida y una de las principales especies comerciadas a nivel mundial. Es originaria del Sudeste Asiático; en India se descubrieron los usos medicinales de su tallo subterráneo o rizoma y, desde hace milenios, es su mayor productor y consumidor, abasteciendo el 70% del mercado global, exportando únicamente un 10% de la cosecha (Funk, 2010).

Se estima que la dieta promedio en India contiene 2,5 g de rizoma de cúrcuma por día, de los cuales 100 mg son curcuminoides polifenólicos (ver siguiente sección) (Chainani-Wu, 2003). En los países occidentales, la cúrcuma es utilizada principalmente en la industria alimentaria (por ejemplo, como ingrediente de la mostaza) (Verger *et al.*, 1998). La cúrcuma medicinal es central en muchos sistemas de medicina tradicional de la India (Ayurveda, Siddha, Unani) y en parte de los sistemas de Asia Oriental (Medicina Tradicional China, el Kampo japonés, etcétera). Al igual que muchas otras especias, sus usos culinarios incluyen la preservación de alimentos, condimento y coloración. La cúrcuma es utilizada en

medicina tradicional de la India para tratar enfermedades de la piel (heridas, urticaria), del tracto respiratorio superior (rinitis, faringitis, tos), articulaciones (reumatismo) y del sistema gastrointestinal (digestivo, desórdenes hepáticos). Las investigaciones modernas sobre la cúrcuma, y particularmente de la curcumina, se han enfocado en su potencial utilización para tratar otras enfermedades, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, que son las principales causas de mortalidad en países occidentales (Funk, 2010).

7.2. Naturaleza química

A través del procesamiento de los rizomas de la *Cúrcuma longa*, se puede obtener la cúrcuma, un polvo dorado de composición química diversa, que varía dependiendo de la variedad de la planta, la localización y las condiciones de cultivo. Se han caracterizado más de 200 componentes, principalmente compuestos fenólicos y terpenoides. Entre ellos, los dos tipos principales de metabolitos secundarios son los curcuminoides y los aceites esenciales. Cada uno constituye aproximadamente el 3% del peso seco del rizoma y le otorgan protección a la planta por sus propiedades insecticidas, entre otras. Los aceites presentan estructura monoterpeno o sesquiterpeno, siendo estos últimos los mayoritarios y los que le otorgan a la especia su característico sabor y aroma. Los mismos suelen ser descartados como un subproducto en el proceso industrial de aislamiento de curcuminoides, que son los componentes con mayor bioactividad. A través de dicho proceso, se obtiene un producto conformado principalmente por tres compuestos polifenólicos: curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina. A pesar de que las proporciones relativas de estos componentes varían de acuerdo la región geográfica y la variedad de la planta a partir de la cual se cosechó el rizoma; la curcumina siempre predomina (50-70%),

y las cantidades relativas de los otros dos compuestos varía de forma significativa (Jayaprakasha, Jagan Mohan Rao and Sakariah, 2005; Gupta *et al.*, 2013).

La curcumina fue aislada por primera vez en 1815 y es el curcuminoide con mayor actividad biológica entre los componentes de la cúrcuma (Vogel and Pelletier, 1815). Se la conoce como 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona o, más sencillamente, curcumina I. Brevemente, la curcumina es un diferuloilmetano con un color naranja-amarillento y peso molecular de 368,39 g/mol, cuya fórmula química es $C_{21}H_{20}O_6$ (Figura I6). Exhibe tautomería ceto-enol, es decir, tiene forma ceto en soluciones neutras o ácidas, mientras que en estado sólido o soluciones alcalinas presenta la forma enol más estable. Es una molécula altamente hidrofóbica, lo cual presenta desafíos para su uso medicinal (Anand *et al.*, 2007).

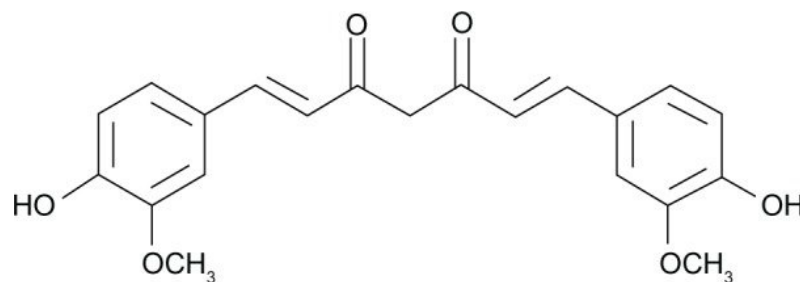


Figura I6. Estructura química de la curcumina.

7.3. Aspectos farmacológicos

A pesar de tratarse de un compuesto natural y de sus efectos pleiotrópicos sobre la salud, la eficacia *in vivo* de la curcumina se ve afectada por tener propiedades farmacocinéticas desfavorables, asociadas principalmente a su baja biodisponibilidad. Esto último se debe a numerosos factores, incluyendo su baja concentración libre sérica, la absorción tisular limitada, su vida media corta y su rápido metabolismo y eliminación. La mayor parte de la curcumina es rápidamente metabolizada (mediante reducción o conjugación mediante glucuronidación o sulfatación) en el hígado y el intestino, dejando un pequeño remanente en los

tejidos. La principal ruta de eliminación tras la administración oral es la fecal. La excreción urinaria de la curcumina y sus metabolitos es muy baja. La excreción biliar se observó sólo en ratas luego de la administración intravenosa e intraperitoneal (Anand *et al.*, 2007; Prasad, Tyagi and Aggarwal, 2014; Kotha and Luthria, 2019).

7.4. Curcumina: usos actuales y regulaciones

La curcumina ha ganado una enorme popularidad y, en la actualidad, es utilizada para la preparación de comidas, bebidas, cosméticos y numerosos productos para el cuidado de la salud. La industria farmacéutica representa más del 50% del mercado global de curcumina, seguida por la industria alimentaria y cosmética (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

La industria cosmética moderna tiende a aplicar componentes vegetales en la manufactura de los productos cosméticos. La curcumina es utilizada como componente activo de preparaciones para el cuidado de la piel, debido a su importante efecto antioxidante, antiinflamatorio y anti-envejecimiento (Plianbangchang, Tungpradit and Tiyaboonchai, 2007). A su vez, la curcumina ha sido autorizada por la Unión Europea como aditivo alimentario y ha tenido una amplia aceptación entre los consumidores debido a la creciente concientización acerca de las bondades de los productos naturales, en oposición a los colorantes y condimentos sintéticos. La curcumina suele incorporarse en las dietas en una dosis de entre 5 y 500 mg/kg. Su consumo está principalmente asociado a la utilización de la especia cúrcuma. Esta especia es también el principal componente del curry, otro condimento que consiste en una mezcla de entre 5 y 20 especias. En muchos países, son populares los estofados que utilizan esta especia como condimento principal y que reciben el mismo nombre.

Observando el extendido consumo de curcumina, los análisis acerca de su seguridad comenzaron hace más de 40 años. El Comité Científico de los Alimentos de Europa estableció mediante un estudio multigeneracional en ratas alimentadas con curcumina durante 24 semanas que el nivel de curcumina sin efecto adverso observable (NOAEL) es de 250-320 mg/kg de peso corporal por día. En base a esto, fijó el valor de ingesta diaria aceptable de curcumina en un valor de 3 mg/kg de peso corporal (61^o reporte del Comité Conjunto de Expertos FAO/WHO en Aditivos Alimentarios, 1995). En 2010, tras una evaluación de los niveles de ingesta de curcumina en países europeos, el Panel sobre Aditivos Alimentarios y Fuentes de Nutrientes determinó que la curcumina no es carcinogénica ni genotóxica. El 2013, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) incorporó a su listado de sustancias GRAS (“Generalmente Reconocido como Seguro”), un preparado compuesto por una mezcla de los tres curcuminoides mayoritarios de la cúrcuma (FDA, Oficina de Seguridad de Aditivos Alimentarios, Aviso GRAS No. 000460).

El interés de la industria farmacéutica en esta molécula se debe a sus múltiples efectos bioactivos relacionados con la promoción de la salud y la prevención de enfermedades. Es por esto que se encuentra en auge el uso de suplementos dietarios de venta libre de variada composición, los cuales no contienen curcumina pura sino una mezcla de los tres principales curcuminoides de la cúrcuma, siendo la curcumina el mayoritario (alrededor del 50%). En su mayoría, contienen entre 400 y 500 mg de curcuminoides (Funk *et al.*, 2006). A su vez, se han comenzado a realizar estudios farmacológicos que se enfocan principalmente en el potencial efecto anticancerígeno, antiinflamatorio y antioxidante de la curcumina (Xu *et al.*, 2018). Si bien la medicina tradicional ha utilizado a la cúrcuma desde hace muchos años, la realización de nuevos estudios en modelos experimentales con dosis

conocidas de curcumina contribuirá a dilucidar las principales acciones terapéuticas de este compuesto y los mecanismos asociados a dichas acciones.

Hipótesis

De acuerdo con los antecedentes descriptos previamente y los trabajos realizados por nuestro grupo de trabajo, se plantean las siguientes hipótesis:

- En primer lugar, postulamos que las acciones de la HO-1 sobre la esteroidogénesis aguda que describimos en trabajos anteriores pueden estar mediadas, al menos en parte por el CO, producto de su acción catalítica. Ello sería coincidente con los estudios previos sobre el sistema de las NOS (óxido nítrico sintasas) en el cual el NO inhibe la esteroidogénesis por unión al grupo hemo de la CYP11A1 (o P450_{scc}). A su vez, los trabajos sobre la histamina se han relacionado con el sistema NOS-NO ya que observamos que el efecto inhibitorio de la amina sobre la esteroidogénesis era por activación en la producción de NO. Por lo tanto, se propone que también puede haber una interacción de los sistemas HO-1-histamina sobre las funciones de la célula de Leydig. Por otro lado, en base a las evidencias presentadas, hipotetizamos que las acciones de la HO-1 no estarían restringidas a la regulación de la esteroidogénesis sino que también podrían tener un impacto sobre la proliferación de las células de Leydig (objetivo 1).
- Adicionalmente, así como la HO-1 es un reconocido mediador de procesos antioxidantes, las ciclooxigenasas lo son de los procesos inflamatorios. Hemos presentado evidencias acerca del rol de las ciclooxigenasas en el testículo, y particularmente, en la modulación de la función esteroidogénica en otros modelos experimentales. En este sentido, hipotetizamos que las isoenzimas COX-1 y/o COX-2 o alguno de sus productos podrían regular la síntesis de esteroides y la proliferación celular (objetivo 2).

- Finalmente, en base a la multiplicidad de efectos de la curcumina descritos en una gran variedad de modelos experimentales, relacionados fundamentalmente con su papel antioxidante, antiinflamatorio y antiproliferativo, es que proponemos que la misma puede afectar la funcionalidad de las células de Leydig. A su vez, postulamos que los tumores de células de Leydig podrían ser un blanco terapéutico de la curcumina, sumándose a la gran variedad de tumores sobre los que actúa este compuesto natural. Los resultados de esta sección no sólo representarían un aporte para la investigación básica, sino que podrían ser trasladables por sus aplicaciones en la clínica (objetivo 3).

Para la verificación de las hipótesis planteadas, se desarrollaron los objetivos descriptos a continuación.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo consiste en estudiar los efectos de la **hemo oxigenasa-1** y las **ciclooxigenasas**, mediadores endógenos claves en procesos antioxidantes e inflamatorios, y del compuesto natural **curcumina**, también vinculado con la modulación de dichos procesos, sobre las funciones de las células de Leydig.

Objetivos específicos

- Profundizar el estudio de los efectos de la inducción de la hemo oxigenasa-1 (HO-1) sobre la función esteroidogénica y la capacidad proliferativa de las células de Leydig y analizar el potencial impacto de la inducción de HO-1 sobre la regulación por histamina de dichas funciones.
- Estudiar el rol de las ciclooxigenasas 1 y 2 en la regulación de la función esteroidogénica y proliferativa de las células de Leydig, y evaluar una potencial interacción con la HO-1.
- Analizar el efecto de la curcumina sobre la función esteroidogénica y proliferativa de las células de Leydig, indagando también en su potencial efecto sobre las proteínas HO-1 y ciclooxigenasas.
- Evaluar el efecto *in vivo* de la curcumina sobre el crecimiento de tumores de células de Leydig.

Materiales y Métodos

1. Materiales

La hemina, el db-AMPC, la progesterona, la pregnenolona, el 22-R-OH colesterol, el FMPH, la amtamina y el VUF-8430 fueron comprados en Sigma-Aldrich Chemical Co., EE. UU. El meloxicam, el SC-560 y la curcumina, en Cayman Chemical, EE. UU.

El anticuerpo anti-HO-1 fue comprado en Enzo Life Sciences, EE. UU. Los anticuerpos anti-COX-1 y anti-COX-2, en Cayman Chemical, EE. UU. El anticuerpo anti- β -tubulina fue comprado en Sigma-Aldrich Chemical Co. El anticuerpo secundario anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488, en Thermo Fisher, EE. UU. El anticuerpo secundario anti-IgG de conejo y de ratón biotinilados y el kit Vectastain ABC fueron comprados en Vector Laboratories, EE. UU. El anticuerpo anti-StAR fue producido y brindado por el Dr. Podesta (INBIOMED-CONICET, Argentina). El anticuerpo anti-progesterona fue provisto por el Dr. Bussman (IBYME-CONICET, Argentina). Los *primers* utilizados para las qPCR, cuyas secuencias se detallan en la sección correspondiente (4.12), fueron comprados en IDT, EE. UU.

La [1,2,6,7- ^3H]-Progesterona (250 μCi (9,25MBq) /0,25 ml de etanol y 101,3 Ci (3,57 TBq) /mmol) y la [^3H]-Timidina (1 mCi (37MBq) /1 ml de etanol:agua (7:3) y 20,0 Ci (740 GBq) /mmol) fueron obtenidas de New England Nuclear Radiochemicals PerkinElmer, EE.UU.

Los restantes reactivos utilizados fueron de la más alta calidad disponible.

2. Modelos experimentales

2.1. Línea celular MA-10

La línea celular MA-10 fue provista por el Dr. Mario Ascoli (Departamento de Farmacología, Universidad de Iowa, EE. UU.). Se trata de una línea clonal murina de células de Leydig tumorales, cuyo origen y manipulación han sido descritos (Ascoli, 1981). Al igual que las células de Leydig normales, las células MA-10 tienen la capacidad de convertir colesterol en hormonas esteroideas, y de responder a LH/hCG con un aumento en la biosíntesis de esteroides. La unión de LH/hCG a su receptor está mediada por la activación de la vía AC/AMPc/PKA (Ascoli, 1985). Además, tanto la afinidad como el número de receptores de LH/hCG son similares entre las células MA-10 y las células de Leydig normales. Estas características convierten a las células MA-10 en un excelente modelo dependiente de gonadotrofinas.

Sin embargo, existen dos diferencias principales, además del origen maligno, entre las células MA-10 y las células de Leydig normales. En primer lugar, debido a una disminución en la actividad de la enzima P450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa (P450 C17, denominación actual: CYP17), el principal esteroide producido es progesterona en lugar de testosterona (Ascoli & Puett, 1978) (Figura M1). La segunda diferencia consiste en que las células MA-10 ofrecen una respuesta mucho más marcada que las células de Leydig normales frente a estímulos esteroideogénicos (Mendelson, Dufau and Catt, 1975).

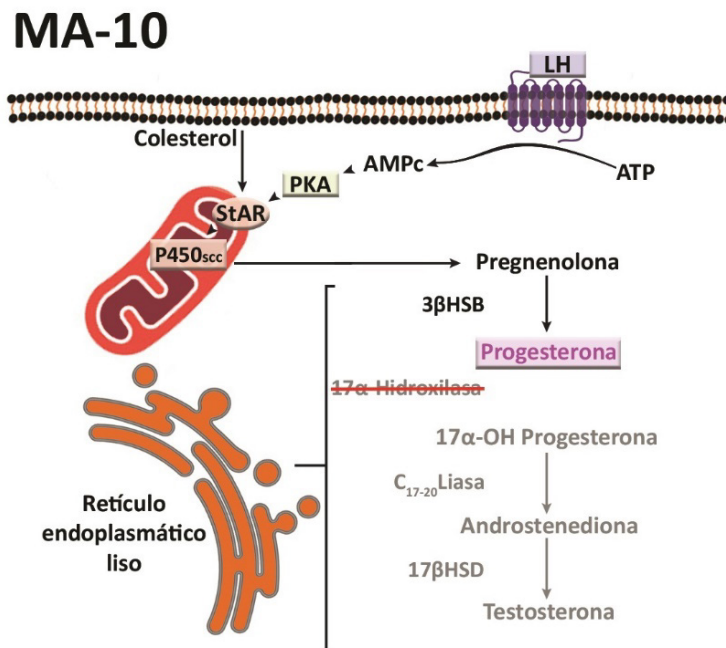


Figura M1. Camino esteroidogénico de las células de Leydig tumorales MA-10. Hormona luteinizante (LH), adenosina tri fosfato (AMP), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), proteína quinasa A (PKA), proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), citocromo p450_{scc} (CYP11A1), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HSD), 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β HSD). Tomado de Varela 2020.

2.2. Línea celular R2C

La línea tumoral de células de Leydig de rata R2C fue comprada a American Type Culture Collection (ATCC, EE. UU.). A diferencia de la línea MA-10, cuya máxima producción de esteroides se observa cuando es estimulada por hormonas tróficas o análogos del AMPc, la línea tumoral de rata R2C secreta elevados niveles de esteroides de forma constitutiva sin necesidad de ser estimulada, constituyendo un modelo experimental independiente de gonadotrofinas. Esto podría explicarse teniendo en cuenta los altos niveles de DAX-1 (proteína codificada por el gen responsable de la hipoplasia adrenal congénita ligada al cromosoma X) presentes en MA-10, pero no en R2C. DAX-1 es un receptor nuclear que regula negativamente la síntesis de esteroides mediante la inhibición de StAR (Jo and Stocco, 2004). Los bajos niveles de DAX-1 en R2C se han asociado con la activación

constitutiva de PKA (Song *et al.*, 2004). Otro factor al que también podría atribuirse la esteroidogénesis constitutiva es la captación aumentada de ésteres de colesterol en la membrana debido a una alta expresión del receptor SRB1 (“*scavenger receptor class B type 1*”) en comparación con la línea MA-10. Esto se sumaría a una mayor tasa de conversión a colesterol libre en el citoplasma debido a una alta expresión de colesterol esterasa y la movilización dentro de la mitocondria debido a los altos niveles de la proteína StAR (Rao *et al.*, 2003).

En ausencia de LH/hCG, las células de Leydig tumorales MA-10 poseen bajos niveles de AMPc y, por consiguiente, una PKA inactiva y bajos niveles de StAR. De manera tal que, en ausencia de LH/hCG presentan una producción casi nula de esteroides. Por su parte, la línea R2C, en ausencia de LH/hCG, presenta una PKA activa, con elevados niveles de StAR y CYP19. De este modo, estas células producen elevados niveles de esteroides de forma constitutiva.

2.3. Células de Leydig de rata

Células de Leydig normales fueron aisladas a partir de testículos de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 35 días de edad (ver sección 3.3).

3. Cultivo celular

3.1. Cultivo de la línea celular MA-10

Para el cultivo de las células MA-10, se utilizó medio de cultivo DMEM/Ham F-12 (DMEM/F12, Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) con 4,76 g/l de HEPES, 1,2 g/l de bicarbonato de sodio, 1 ml/l de gentamicina 50 mg/ml y suero de caballo al 15% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El pH se ajustó a 7,4 con NaOH 1N, y el medio se esterilizó por filtración y se guardó a una temperatura de 4° C.

3.1.1. Propagación Celular

La expansión de la población celular se llevó a cabo sembrando las células en frascos T-25 conteniendo 10 ml de medio de cultivo o en frascos T-75 conteniendo 20 ml de medio. El seguimiento del cultivo se realizó mediante la observación de los frascos al microscopio óptico. Los mismos se mantuvieron a 37° C, en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ hasta la confluencia celular (Pignataro & Ascoli, 1990).

3.1.2. Tripsinización de las células

Las células fueron separadas de la superficie de cultivo mediante tripsinización. Para ello, se aspiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con 2 a 4 ml de PBS estéril. Posteriormente, se agregó 1 ml de solución de tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), y la misma se dejó actuar durante 1 minuto. Luego, se aspiró la solución de tripsina, y los frascos se incubaron a 37° C durante 2 minutos. Finalmente, se verificó por microscopía la separación de todas las células de la superficie de cultivo y se agregó medio fresco. Una alícuota de la suspensión celular obtenida se utilizó para el recuento en cámara de Neubauer, y se eligió la cantidad de células apropiada según la superficie de cultivo y el ensayo a realizar.

3.2. Cultivo de la línea celular R2C

El medio de cultivo de crecimiento utilizado para esta línea es HAM's F-12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Para preparar el medio de crecimiento, se agregó suero fetal bovino (Natocor, Argentina) y suero equino a una concentración final del 2,5% y 12,5%, respectivamente. La propagación celular se llevó a cabo del mismo modo que para las células MA-10. El protocolo de

tripsinización fue similar, pero el tiempo de incubación con tripsina es de 5 a 15 minutos.

3.3. Aislamiento, purificación y cultivo de células de Leydig de rata

Las células de Leydig fueron preparadas según técnicas ya descritas (Pignataro *et al.*, 1983). Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (35 días) criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental bajo las siguientes condiciones: temperatura controlada (21 a 25°C), y períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron dieta balanceada y libre acceso a agua, respetándose en todo momento la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH). Las ratas fueron sacrificadas por asfixia utilizando una cámara de CO₂. Los testículos fueron extraídos y decapsulados. La dispersión del tejido se llevó a cabo por agitación (20 minutos, 80 ciclos/minuto, 34°C) en un tubo de plástico de 50 ml conteniendo solución enzimática (1 ml/testículo, 0,25 mg/ml de colagenasa) en Medio 199 (M199, suplementado con HEPES 20 mM; NaHCO₃ 1,2 g/l; BSA 0,1%; pH 7,4) (Li *et al.*, 1991). Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por dilución con M199 frío. Posteriormente, el tubo se agitó en forma rotatoria durante 3 minutos, a fin de lograr una mayor dispersión del tejido. Se dejó reposar otros 3 minutos para que decanten los túbulos seminíferos, y el sobrenadante fue filtrado a través de Nytex (malla de poro 50). Posteriormente, el filtrado con las células intersticiales se centrifugó durante 10 minutos a 700 x g. Para eliminar los glóbulos rojos presentes en la preparación, las células se resuspendieron en una solución isotónica de Tris-NH₄Cl (1,7 y 140 mM respectivamente, pH 7,2) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C con agitación constante. La lisis de los glóbulos rojos se detuvo por dilución con M199 frío y las células se centrifugaron nuevamente a 700 x g durante 10 minutos. Los macrófagos

se separaron de la preparación por adherencia diferencial a placas de Petri de plástico. Las células fueron incubadas en M199 durante 15 minutos a 37°C, bajo una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Se recuperó luego el medio con las células no adheridas, que fueron centrifugadas a 700 x g durante 10 minutos. Finalmente, las células de Leydig se purificaron por fraccionamiento en un gradiente de densidad discontinuo de Percoll de cinco fases: 21, 26, 34, 40 y 60% en M199. El gradiente se centrifugó a 800 x g durante 30 minutos, después de los cuales se recuperó la fracción enriquecida en células de Leydig (interfase 40-60). Dicha fracción se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos, y el pellet de células fue resuspendido en M199 suplementado con HEPES 20 mM, NaHCO₃ 1,2 g/l y BSA 0,1% a pH 7,4. La pureza de las preparaciones superó en cada aislamiento el 85%, y fue determinada mediante la tinción citoquímica para 3β- hidroxisteroide deshidrogenasa (3β-HSD), específica para células de Leydig (Hedger and Eddy, 1987).

Para la tinción de 3β-HSD, se agregaron 200 µl de la suspensión celular a 50 µl de una mezcla conteniendo 25 µl de dehidroepiandrosterona (5 mg/ml en propilenglicol), 25 µl de hCG (120 ng/ml), 100 µl de nitrobluetetrazolium (4 mg/ml) y 50 µl de β-NAD (16 mg/ml). La mezcla se incubó a 34°C durante 1 hora, y se observó una alícuota al microscopio óptico. Así, se determinó el número de células de Leydig por recuento de células azules (tinción positiva) (Payne, Downing and Wong, 1980) en cámara de Neubauer, obteniéndose en cada aislamiento aproximadamente 1 x 10⁶ células de Leydig viables por testículo.

Como control adicional, se llevaron a cabo ensayos de respuesta esteroideogénica. Para tal fin, la preparación de células de Leydig fue diluida en M199 suplementado con HEPES 20 mM y NaHCO₃ 1,2 g/l, conteniendo además IBMX 0,1 mM y BSA 0,5% (medio de ensayo) a fin de alcanzar una concentración

final de 10^6 células/ml. Posteriormente, las células fueron incubadas en tubos de plástico, a razón de 5×10^5 células/tubo en medio de ensayo. La incubación se llevó a cabo con agitación constante durante 5 horas a 34°C , y los tubos fueron luego transferidos a un baño de agua destilada a 90°C por 10 minutos. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a $800 \times g$ durante 5 minutos. El sobrenadante de cada tubo se conservó a -20°C para la posterior determinación de los niveles de progesterona (ver sección 4.2).

3.4. Diseño experimental de los ensayos *in vitro*

Para todos los ensayos *in vitro* llevados a cabo en las líneas MA-10 y R2C, las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO_2 . Fueron sembradas en los soportes correspondientes y mantenidas durante 48 horas en medio de cultivo. Para todos los ensayos, cumplidas las 48 horas, las células fueron mantenidas en condiciones basales (control) o tratadas con diferentes estímulos en el correspondiente medio sin suero.

En cuanto a los principales estímulos utilizados, se preparó una solución madre 10 mM de hemina en NaOH 0,1 N; el meloxicam y la curcumina, por su parte, se disolvieron inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración 10 mM y 100 mM, respectivamente. En todos los ensayos *in vitro*, para la condición “Control” se disolvió el vehículo en medio sin suero a la concentración que correspondiera.

3.4.1. Diseño experimental para la marcación de proteínas mediante inmunocitoquímica

Las células MA-10 y R2C fueron sembradas en cubreobjetos previamente polilisinados (solución 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para favorecer la adhesión celular a una densidad celular inicial de 5000 células por vidrio. Tras 48 horas, las células fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas durante 5 horas con hemina 20 μM ,

un inductor de la HO-1. Luego, fueron fijadas para comenzar el protocolo de incubaciones.

3.4.2. Diseño experimental para la evaluación de la esteroidogénesis

Las células MA-10 y R2C fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad inicial de $0,3 \times 10^6$ células por pocillo. Cumplidas 48 horas, las células fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas durante 5, 24 o 48 horas con el inductor de HO-1, hemina. Para probar la reversibilidad del efecto de hemina, las células fueron mantenidas durante 36 o 48 horas en medio fresco luego de la incubación durante 48 horas con hemina. A su vez, las células fueron tratadas durante 5 horas con diclorometano (DCM), una molécula utilizada para la generación de monóxido de carbono, o con 22R-OH-colesterol o pregnenolona, o con histamina o el agonista del receptor HRH2 a histamina (amtamina). Asimismo, las células fueron tratadas durante 5 horas con SC-560 (inhibidor de COX-1), meloxicam (inhibidor de COX-2) o Indometacina (inhibidor no selectivo de COX-1 y COX-2) o con las prostaglandinas PGF2 α o PGD2. Por último, las células fueron incubadas durante 5 o 24 horas con curcumina. Para el análisis de los niveles de esteroides, las incubaciones se llevaron a cabo en presencia o ausencia de db-AMPC, segundo mensajero que induce la esteroidogénesis. Las concentraciones y combinaciones para los tratamientos en cada ensayo se indican en las figuras. En los experimentos que involucraron inhibidores, los mismos fueron pre-incubados durante media hora.

3.4.3. Diseño experimental para la evaluación de la incorporación de [³H]-timidina, la metabolización del reactivo WST-1 y el contenido de ROS

Las células MA-10 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad inicial de 10.000 células por pocillo. Luego de 2 días, las células fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas con hemina durante 24 horas. Para evaluar la

reversibilidad del efecto, la incubación con hemina fue seguida por una incubación con medio fresco durante 48 horas. El efecto de la hemina sobre la incorporación de [^3H]-timidina también fue evaluado en células de Leydig normales de rata en suspensión en tubos de plástico (5×10^5 células/tubo) siguiendo el mismo protocolo. A su vez, las células MA-10 fueron incubadas durante 24 horas con histamina o amtamina. Asimismo, fueron incubadas durante 24 horas con SC-560 o Meloxicam o con curcumina. En todos los casos, se agregó un pulso de [^3H]-timidina pasadas las primeras 6 horas de incubación. El efecto de la curcumina sobre la viabilidad y la proliferación de células MA-10 fue evaluado también mediante el ensayo colorimétrico WST-1. En cada figura se indican las concentraciones y combinaciones de drogas empleadas para los diferentes ensayos. En los experimentos que involucraron inhibidores, los mismos fueron pre-incubados durante media hora.

Para la evaluación de los niveles de ROS intracelulares mediante el ensayo con dicloro-fluoresceína (DCF), las células fueron tratadas durante 24 horas con curcumina en ausencia o presencia de H_2O_2 .

3.4.4. *Diseño experimental para el recuento celular en cámara de Neubauer*

Tanto para la determinación de la proliferación como para la evaluación de la incorporación del colorante Azul de Tripán, las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad inicial de $0,3 \times 10^6$ células por pocillo. Luego de 2 días de crecimiento, las células fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas durante 24 horas con SC-560 o Meloxicam. Asimismo, fueron tratadas durante 5 o 24 horas con curcumina. En cada figura se indican las concentraciones empleadas para cada ensayo.

3.4.5. Diseño experimental para la evaluación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular

Las células MA-10 fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad inicial de $0,3 \times 10^6$ células por pocillo. Tras 48 horas de crecimiento, las células fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas durante 24 horas con hemina o curcumina a las concentraciones que se indican en cada figura. A continuación, se analizó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular mediante tinción con ioduro de propidio y citometría de flujo.

3.4.6. Diseño experimental para la determinación de la apoptosis

Para la determinación de apoptosis mediante el ensayo de TUNEL por citometría de flujo, las células MA-10 fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad inicial de $0,3 \times 10^6$ células por pocillo. Luego de 2 días, las células fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas durante 24 horas con hemina a las concentraciones que se indican en la figura. Para la determinación de apoptosis mediante TUNEL por el método colorimétrico, las células MA-10 fueron sembradas en cubreobjetos previamente polilisinados (solución 50 $\mu\text{g/ml}$) para favorecer la adhesión celular a una densidad celular inicial de 5000 células por vidrio. Tras 48 horas, fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas durante 24 horas con curcumina a las concentraciones que se indican en la figura.

3.4.7. Diseño experimental para la determinación de proteínas mediante Western Blot y de los niveles de expresión génica mediante RT-qPCR

Las células MA-10 o R2C fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad inicial de $0,3 \times 10^6$ células por pocillo. Tras 48 horas de crecimiento, las células fueron mantenidas en condiciones basales o tratadas durante 5 horas con hemina, Meloxicam, SC-560 o curcumina a las concentraciones y combinaciones que se indican en cada figura. Para la determinación de los niveles de ARNm

mediante RT-qPCR, las células fueron tratadas durante 5, 12 o 24 horas con curcumina.

4. Ensayos *in vitro*

4.1. Inmunocitoquímica: marcación de proteínas

Las células MA-10 o R2C fueron fijadas con formaldehído 4% en PBS y luego de tres lavados de 5 minutos con PBS se procedió a la permeabilización con Tritón X-100 0,25% en PBS. Se repitieron los lavados y se utilizó suero normal de cabra al 10% en PBS como solución de bloqueo (30 minutos de incubación). Posteriormente, las células fueron incubadas durante la noche con el anticuerpo primario anti- COX1 (1:200), anti-COX2 (1:200) o anti-HO-1 (1:200); se repitieron los lavados y luego se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:500) durante 1 hora en oscuridad. Se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Se tiñeron los núcleos con yoduro de propidio 1:2000 en agua destilada por 5 minutos. Por último, se colocaron los cubreobjetos en líquido de montaje (Dako North America Inc., EE.UU.). Los controles negativos se realizaron con suero normal de conejo. Se tomaron imágenes representativas con microscopio confocal (Nikon C1). Se evaluó la intensidad de las marcas inmunes específicas de la proteína HO-1 en el núcleo y el citoplasma con el programa Photoshop 5.5 y se analizaron al menos 50 células por tratamiento.

4.2. Radioinmunoensayo: determinación de progesterona

Para cuantificar la producción de progesterona, se empleó la técnica de radioinmunoensayo (RIA). El dosaje se realizó en alícuotas del medio de incubación de células MA-10 o R2C, o de células de Leydig aisladas de testículos de rata.

Brevemente, alícuotas de 100 µl del medio de incubación (o de la dilución adecuada) fueron transferidas a tubos de plástico, donde se agregaron 100 µl de [³H]-progesterona y 100 µl del anticuerpo anti-progesterona. Las muestras fueron incubadas durante 16 horas a 4° C. Finalizada la incubación, la hormona libre se separó de la unida al anticuerpo mediante el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón-dextrano (0,5% P/V y 0.05% P/V, respectivamente) en buffer RIA (Na₂HPO₄ 40 mM, NaH₂PO₄ 30 mM, NaCl 150 mM, azida sódica 0,01% y gelatina 0,1% a pH 7,0), y la posterior incubación a 4°C durante 10 minutos y centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales de conteo, a los que se agregó 1,5 ml de líquido centelleante (Optiphase Hisafe III, Wallac, Inglaterra). La radiactividad se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR. Las variaciones intraensayo e interensayo fueron 7,3% y 13,2%, respectivamente. Se realizó una curva de calibración utilizando progesterona fría para luego interpolar los valores de radiactividad obtenidos para cada muestra.

4.3. Recuento celular en cámara de Neubauer

El conteo de células es un método directo para la determinación de la proliferación celular. Luego de los tratamientos, las células fueron lavadas con 500 µl de PBS, tripsinizadas, levantadas en medio con suero y contadas en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico.

4.4. Ensayo WST-1: determinación de proliferación y viabilidad celular

El reactivo WST-1 contiene sal de tetrazolio, que es convertida por la deshidrogenasa mitocondrial en formazán, un reactivo coloreado. La cantidad de producto generado es proporcional a la cantidad de deshidrogenasa mitocondrial y, por ende, al número de células vivas. Por lo tanto, este método mide actividad

metabólica, y da información sobre la actividad proliferativa de las células y, además, sobre su viabilidad.

El ensayo se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, sin retirar el medio de cultivo, se agregaron 10 µl de WST-1 (Sigma-Aldrich Chemical Co., EE. UU.) durante 4 horas. Al finalizar la incubación se determinó la absorbancia a 490 nm empleando un lector de placas (Microplate Reader, Bio-Rad, EE.UU.).

4.5. Determinación de la incorporación de [³H]-timidina

Este método se basa en incubar las células con un análogo de timidina marcado radiactivamente de manera tal que las células que sinteticen nuevo ADN, o sea, aquellas que ingresen en la fase S, emplearán este sustrato, permitiendo la medición de la radiactividad como indicador de la proliferación celular.

Para llevar a cabo el ensayo, se agregaron los tratamientos indicados en cada figura en medio sin suero y se incubaron durante 24 horas. Se agregó el pulso de [³H]-timidina a razón de 0,5 µCi por pocillo durante las últimas 18 horas de cultivo. A continuación, las células fueron lavadas dos veces con PBS. Se agregaron 50 µl de tripsina por pocillo y se incubó 10 minutos a 37°C. Una vez finalizada la incubación, las células se cosecharon por aspiración al vacío sobre filtro de fibra de vidrio. Se transfirieron los filtros a tubos donde se agregó el líquido de centelleo (Optiphase Hisafe III, Wallac, Inglaterra). La radiactividad se midió en un contador beta (Tri-carb 1600TR, Packard).

4.6. Tinción con Azul de Tripán: determinación de la viabilidad celular

El colorante vital Azul de Tripán permite diferenciar a las células vivas de las células muertas por su capacidad de excluir el colorante. Se asume que una célula viable posee una membrana plasmática intacta; por ende, excluye el colorante y su

citoplasma se observa de color claro al microscopio óptico. Las células no viables, por el contrario, muestran un citoplasma azul.

Para desarrollar esta técnica, finalizado el tiempo de tratamiento, se descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS y se agregaron 150 µl de una solución 20 mg/ml de Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se incubó en agitación constante durante 5 minutos y se aspiró la solución. Luego, se tripsinizaron las células y se levantaron en medio con suero para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico. Los resultados se muestran como porcentaje de células viables respecto del total.

4.7. Citometría de flujo: análisis de las fases del ciclo celular

Para evaluar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, las células fueron lavadas con 300 µl de medio sin suero, tripsinizadas y levantadas en medio con suero. Luego, se centrifugaron tres veces a 500 x g durante 5 minutos en PBS frío. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en etanol 70% v/v frío por goteo y en permanente agitación. Se incubaron las células durante toda la noche a -20°C para su fijación. Al día siguiente, se realizaron 3 centrifugaciones a 850 x g durante 5 minutos. Los pellets se resuspendieron en una solución de yoduro de propidio en PBS (yoduro de propidio 40 µg/ml, citrato de sodio 3,8 mmol/l y RNasa A 100 µg/ml) a una concentración de 10^5 a 10^6 células cada 100 µl. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para luego medir la concentración intracelular de yoduro de propidio analizando 10.000 eventos por muestra utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, EE. UU.). El análisis de datos se llevó a cabo con el software FloJo (BD Biosciences, EE. UU.). En cada experimento, se realizó una evaluación de la viabilidad celular por la tinción con yoduro de propidio.

4.8. TUNEL: análisis de la apoptosis celular

Para evaluar la apoptosis *in vitro*, se utilizó el ensayo de TUNEL (“*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*”), el cual se basa en la presencia de cortes en el ADN genómico que pueden ser identificados por la terminal deoxinucleotidil transferasa o TdT, una enzima que catalizará la adición de dUTPs marcados secundariamente con fluoresceína. Se emplearon dos kits comerciales: APO-BRDU, Sigma-Aldrich, EE. UU. y Promega DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System, Fischer Scientific, EE. UU., siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Para el primer método, se analizó el porcentaje de células apoptóticas utilizando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, EE. UU.) y los datos fueron procesados utilizando el software FloJo (BD Biosciences, EE. UU.). Para el segundo método, las células MA-10 fueron cultivadas en cubreobjetos, se siguieron los pasos de tinción y los cortes fueron deshidratados y fijados con bálamo para ser observados bajo microscopio óptico y fotografiados.

4.9. Determinación de especies reactivas de oxígeno

El contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue determinado mediante el monitoreo de la oxidación de la sonda 2',7'-dicloro dihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA; Invitrogen Co., EE.UU.) en el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Luego de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con H2DCF-DA 25 μ M en medio sin suero en oscuridad durante 30 minutos a 37°C. Luego, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con un buffer de lisis hipotónico (KCl 7,5 mM) mediante una incubación de 1 h a 37°C. Se centrifugaron los lisados celulares mediante centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La intensidad de fluorescencia se midió en un fluorómetro FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) (kex:

485/12 nm; λ_{exc} : 520 nm). Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la concentración total de proteínas obtenida mediante el ensayo Bradford (ver 4.11).

4.10. Western Blot: determinación de proteínas

Para llevar a cabo este ensayo, se cosecharon las células mediante la adición de 500 μ l de PBS a cada pocillo. Las células fueron despegadas mediante raspado con rastrillo, y transferidas a tubos eppendorf. Luego, fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10000 x g. A continuación, se descartaron los sobrenadantes y el precipitado en cada tubo fue resuspendido en buffer de lisis (Tris- HCl 10 mM pH 8, Tritón X-100 1 %, EGTA 0,5 mM, Leupeptina 10 μ g/ml, PMSF 2,5 mM). Se disgregaron los precipitados mediante agitación y se realizaron 15 pasajes por jeringa con aguja 25G x 16 mm. Tras otra centrifugación de 10 minutos a 10000 x g se recuperó el sobrenadante. A partir de los extractos celulares obtenidos se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Luego, los extractos se diluyeron al tercio en buffer de siembra (Tris-HCl 0,06 M; pH 6,8, glicerol 25 % V/V, SDS 2 % P/V, azul de bromofenol 0,01 % P/V, β -mercaptoetanol 5 % V/V) y se incubaron en un baño a 95°C durante 5 minutos.

Las proteínas de los extractos celulares fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo empleando un sistema discontinuo, con dos tipos de gel: un gel concentrador (5% de acrilamida-bisacrilamida en buffer Tris-HCl 0,5 mM; pH 6,8), y un gel separador (12,5 % de acrilamida-bisacrilamida en buffer Tris-HCl 1,5 mM; pH 8,8). El buffer utilizado para la corrida fue Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1 % P/V, pH 8,3. La misma se desarrolló a voltaje constante (70 V para el gel concentrador y 100 V para el gel separador), empleando el dispositivo Miniprotean III de Bio-Rad.

Finalizada la corrida electroforética, el gel fue equilibrado en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 150 mM, metanol 20% V/V) durante 15 minutos. Las proteínas fueron luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa, previamente equilibrada en el mismo buffer. El proceso se desarrolló a voltaje constante (15 V) durante 45 minutos. Posteriormente, se recuperó la membrana de nitrocelulosa y la misma se tiñó con una solución de Rojo Ponceau-ácido acético (0,2-0,5%) para verificar la transferencia de las proteínas. El colorante fue luego removido mediante sucesivos lavados con PBS-Tween 0,1%.

Con la finalidad de bloquear posibles sitios de unión inespecífica del anticuerpo, la membrana de nitrocelulosa fue incubada con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 3% en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, se realizó una incubación con anticuerpos específicos en agitación durante la noche a 4°C: anti-COX1 (1:200), anti-COX2 (1:500), anti-HO-1 (1:2000), anti-StAR (1:200). Para normalizar las muestras por control de carga proteica se utilizó un anticuerpo anti β -tubulina (1:5000). Luego de sucesivos lavados con PBS-Tween (PBS con adición de 0,1% de Tween 20), la membrana fue incubada por 30 minutos en presencia de un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o ratón biotinilado (1:2500). Finalmente, el revelado se llevó a cabo con el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, EE. UU.) según indicaciones del fabricante.

Las membranas fueron escaneadas y la intensidad de las bandas inmuno-específicas fue cuantificada utilizando el software ImageJ 1,49v (NIH, EE. UU.). Los valores de las bandas correspondientes a las proteínas de interés se relativizaron a la densidad óptica del fondo. Los niveles de β -tubulina fueron utilizados como control de carga proteica en las distintas calles. La expresión de las

proteínas de interés en cada muestra se obtuvo mediante la relativización de su densidad óptica a la de β -tubulina.

4.11. Bradford: cuantificación de proteínas totales

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó mediante el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). A las muestras y el buffer de lisis (control negativo) en diluciones adecuadas se les agregó el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se realizó simultáneamente una curva estándar utilizando una solución de BSA 1 mg/ml para luego interpolar los resultados. Las lecturas de absorbancia a 620 nm se realizaron en un lector de placas (Bio-Rad Microplate Reader).

4.12. RT-qPCR: determinación de los niveles de ARNm

El ARN total fue extraído utilizando el reactivo Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las especificaciones del proveedor y luego utilizado para la técnica de síntesis de ADN copia (ADNc). La cantidad de ARN obtenido en cada muestra fue determinado espectrofotométricamente a 260 nm.

El ADNc fue sintetizado a partir de 2 μ g de ARN total utilizando 125 ng de cebadores aleatorios (*random primers*), 0,5 mM de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 200 U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un volumen final de 20 μ l. Luego de la retrotranscripción, las muestras fueron diluidas hasta un volumen final de 40 μ l.

La RT-qPCR (retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) fue realizada utilizando el equipo Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems, EE.UU.). La mezcla de reacción fue preparada usando 12,5 μ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), una concentración adecuada (400-900 nM) de los *primers* sentido y antisentido específicos y 4 μ l de la

dilución de ADNc de cada muestra en un volumen final de reacción de 25 μ l. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos seguidos de una hibridación y extensión a 60°C por 1 minuto. La fluorescencia fue medida al final de cada ciclo. Luego de la amplificación, la especificidad del producto de PCR obtenido fue determinada mediante una curva de fusión. En todos los ensayos se realizaron curvas estándar para confirmar una adecuada pendiente y eficiencia de amplificación, utilizando una muestra control. Se utilizó el método de curva estándar relativa para obtener los resultados que fueron normalizados con GAPDH como genes controles.

Los *primers* sentido y antisentido específicos de cada gen fueron diseñados utilizando el programa Vector NTI; se verificó que los pares de *primers* no formaran dímeros o estructuras secundarias y se evitaron las secuencias con una alta tasa de repetición de bases C y G en el extremo 3'. Asimismo, se intentó buscar que los fragmentos amplificados tuvieran un tamaño entre 75 y 150 pares de bases, que estuviesen formados por regiones de más de un exón y que no formasen estructuras secundarias. Una vez seleccionados los pares de *primers*, se verificó su especificidad utilizando el programa NCBI-PrimerBLAST y la amplificación de un único producto a través de la técnica de RT-qPCR. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los *primers* diseñados para cada gen analizado.

Tabla 1. Secuencia de los *primers* específicos de ratón para RT-qPCR.

Gen	Secuencia del <i>primer</i> (5' \rightarrow 3')		Tamaño amplicón (pb)
	Sentido	Antisentido	
GAPDH (<i>Gapdh</i>)	GGGTGTGAACCACGAGAAAT	ACTGTGGTCATGAGCCCTTC	135
STAR (<i>Star</i>)	CCGGAGCAGCGTGGTGTCA	CAGTGGATGAAGCACCATGC	63
p21 ^{Cip1}	GTCTTGCACTCTGGTGTCTCA	GCACTTCAGGGCTTTCTCTT	147

(<i>Cdkn1a</i>)			
Cyclin D1	CTACCGCACAAACGCACTTTC	AAGGGCTTCAATCTGTTCCTG	151
(<i>Ccnd1</i>)			
p27 ^{Kip1}	TTCGACGCCAGACGTAAAC	TTCAATGGAGTCAGCGATATG	126
(<i>Cdkn1b</i>)			
VEGF (Vegfa)	CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG	GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC	119

5. Ensayos *in vivo*

5.1. Angiogénesis: ensayo de la membrana corioalantoidea

Con el objetivo de determinar la capacidad proangiogénica de los factores secretados *in vitro* por las células tumorales MA-10, y la capacidad de los tratamientos de modular esta secreción, se empleó el ensayo de angiogénesis *in vivo* de la membrana corioalantoidea de codorniz (*Coturnix coturnix*) tal como ha sido descrito (Parsons-Wingenter *et al.*, 1998).

Para llevar a cabo dicho ensayo, se obtuvieron medios condicionados de células MA-10 sembradas en placas de 12 pocillos ($0,3 \times 10^6$ células por pocillo), crecidas durante 24 horas en 1 ml de medio de crecimiento y tratadas según se indica en la figura. Finalizado el tiempo de tratamiento, los sobrenadantes fueron colectados y mantenidos a -20°C hasta el día del ensayo.

Huevos de codorniz fertilizados con 48 horas de puesta fueron incubados en estufa a 37°C por 48 horas. Pasado este tiempo, fueron exovados, es decir, los embriones vivos fueron obtenidos a través de una pequeña abertura en la cáscara del huevo y colocados en placas de 6 pocillos estériles, de manera tal que el embrión quede posicionado hacia arriba. De este modo, fueron incubados nuevamente a 37°C por 5 días. Transcurrido este período, los embriones fueron incubados con discos de papel de filtro embebidos en medios condicionados y colocados

suavemente sobre la membrana corioalantoidea. Los embriones fueron mantenidos a 37°C durante 48 horas con los tratamientos y luego, sacrificados por congelamiento a -20 °C por 2 horas. La membrana corioalantoidea se fijó mediante exposición a glutaraldehído 2% y formaldehído 2% por 48 horas. Finalmente, la membrana fue recortada e invertida para visualizar la vascularización sobre el disco de filtro. Los discos fueron observados bajo lupa estereoscópica para la obtención de fotografías con una magnificación de 20x. En cada disco se cuantificó el número de bifurcaciones y la cantidad de vasos entrantes en el disco de papel. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ y se tomó el área del disco (5 mm de diámetro) como referencia. En la Figura R34A de la sección de Resultados se pueden observar fotografías de un embrión recién exovado en un pocillo de la placa, un embrión con 7 días de crecimiento y un embrión con 11 días de crecimiento luego de la colocación de los discos de papel de filtro. En la Figura R34B se muestran fotografías representativas de los discos fijados, sobre los cuales se realizó la cuantificación.

Antecedentes del laboratorio demostraron que las células R2C liberan factores proangiogénicos y que su medio condicionado aumenta el número de bifurcaciones por unidad de área en la membrana corioalantoidea de embriones de codorniz (Abiuso *et al.*, 2018), con lo cual medios condicionados de células R2C fueron utilizados como control positivo en este experimento.

5.2. Crecimiento tumoral: modelo singénico de tumores de células de Leydig

Se utilizaron ratones macho de 8 semanas de edad de la progenie obtenida a partir de la cruce entre hembras C57BL/6 y machos BALB/c. Esta cepa se conoce comercialmente como CB6F1. Los ratones fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental y donados por el laboratorio de la Dra. Parborell (Laboratorio de Estudios de Fisiopatología de Ovario, IBYME-

CONICET) y alimentados con dieta normal *ad libitum*. El protocolo presentado en el presente trabajo de tesis fue aprobado por el comité de ética del IBYME (N°: 08/2020).

Ratones de la cepa especificada (12 en total, 6 por grupo experimental) fueron mantenidos en un ambiente de 22 °C y humedad controlada, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Células MA-10 murinas (40.000 células en 100 µl de PBS estéril) fueron inoculadas en ambos flancos de cada ratón, utilizando agujas de calibre 27G. Al cabo de 12 a 14 días, cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 50 mm³, se inició el protocolo de tratamientos. La curcumina fue disuelta en DMSO 10% en aceite de maíz a una concentración 20 mg/kg y mantenida fuera del alcance de la luz. Se inyectaron 100 µl de esta solución de forma intraperitoneal día por medio durante 15 días con agujas de calibre 27G. Los ratones control recibieron inyecciones de DMSO 10% en aceite de maíz. En la Figura M2A, se puede observar un esquema del protocolo de generación de los tumores y de tratamientos. En la Figura M2B y M2C se muestra el aspecto macroscópico de los tumores.

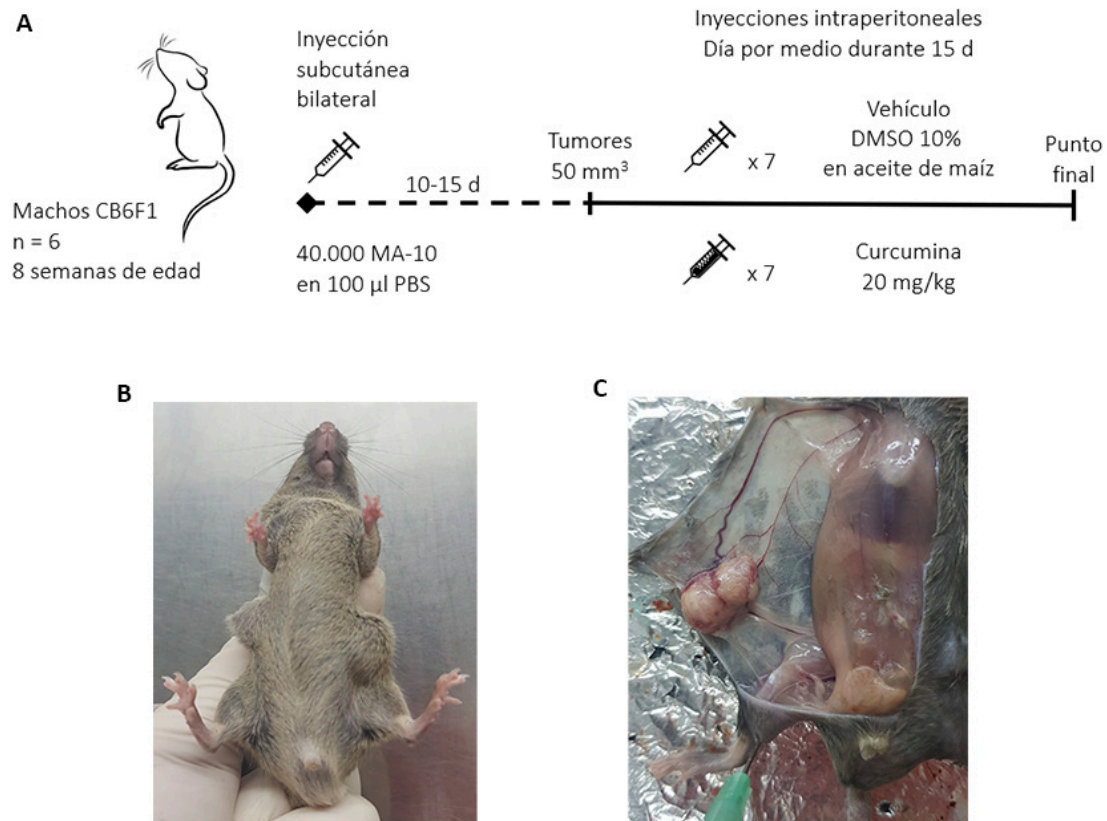


Figura M2. Esquema de tratamientos en el modelo murino de tumores de células de Leydig. (A) Esquema de inyecciones de ratones CB6F1 con tumores desarrollados con células MA-10. (B) y (C) Aspecto general de los tumores.

La determinación de las dosis de curcumina se realizó a partir de ensayos preclínicos disponibles en la bibliografía, y se corroboraron a través de la aplicación de la conversión de valores de EC50 (concentración requerida para producir el 50% del efecto máximo) obtenidos *in vitro* a valores *in vivo* según: “Guidance document on using *in vitro* data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity” del NIH (Lindl *et al.*, 2005). En este trabajo, a partir del análisis de 347 compuestos obtienen la siguiente ecuación: $\log(LD50 [mmol/kg]) = 0,435 \times \log(IC50 [mmol/l]) + 0,625$ (siendo LD50 la dosis letal 50 e IC50 la concentración inhibitoria 50).

El tamaño tumoral fue medido con un calibre. Se determinó el largo y el ancho de cada tumor los mismos días en que se aplicaban las inyecciones, y se

estimó el volumen tumoral a través de la ecuación $[\text{Ancho}^2 \times \text{Largo}/2]$. A punto final, los tumores fueron pesados. Para el cálculo del peso corporal se pesó cada ratón y a ese valor se le restó el peso de ambos tumores. Para el cálculo de los índices somáticos se pesaron hígado, bazo y testículos. Cada índice se calculó con la siguiente ecuación: $[\text{Peso del órgano}/ \text{Peso corporal} \times 100]$.

Los ratones fueron sacrificados por decapitación, lo cual permitió obtener muestras de sangre troncal en el anticoagulante EDTA 500 mM. La misma fue centrifugada a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C para la extracción de plasma a fin de cuantificar la concentración de progesterona. Dicha determinación fue llevada a cabo empleando la plataforma Architect i4000 (Abbott, EE. UU.).

5.2.1. Análisis histológico

Muestras de tumores, testículos e hígados fueron analizados histológicamente. Los tejidos fueron fijados con formol 4% v/v en PBS durante 24 horas y luego trasvasados a alcohol 70° como conservante e incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μm , los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo microscopio óptico. Para la determinación de la altura del epitelio germinal se utilizaron fotografías con una magnificación de 200x y para la medición se consideró la distancia desde la membrana basal hasta las espermátidas.

5.2.2. Determinación de apoptosis

Secciones de tumores del grupo Control (n=6) y Curcumina (n=6) se fijaron en formol 4% v/v y se incluyeron en parafina. Para cada testículo, se seleccionaron 2 secciones (3-5 μm) distantes entre sí por al menos 50 μm . Las secciones fueron bloqueadas con una dilución de suero de caballo (1/500). De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se llevó a cabo la técnica TUNEL empleando el kit “*In Situ Cell Death*” (Roche Applied Science, EE.UU.). Brevemente, las secciones se incubaron con la mezcla de reacción de TUNEL durante 60 minutos a 37 °C en

una cámara húmeda. Luego, las secciones se lavaron e incubaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y se montaron los cubreobjetos utilizando medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, EE.UU.). La obtención de imágenes se realizó mediante microscopía de epifluorescencia con un microscopio A1 Axio (Zeiss, Alemania) y una cámara de color AxioCam 503 (Zeiss). Los controles negativos se realizaron con la mezcla de reacción TUNEL sin transferasa terminal. En cada sección de tejido se realizó el recuento de las células TUNEL positivas y células totales utilizando el software Image J. Se contaron dos secciones por tumor, con un mínimo de 10 campos en 40x seleccionados al azar en cada sección de tejido. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células TUNEL positivas.

5.2.3. RT-qPCR

Secciones de tumores del grupo Control (n=6) y Curcumina (n=6) fueron utilizadas para la determinación de los niveles de ARNm de VEGF tal como se detalla en el apartado 4.12 (RT-qPCR: determinación de los niveles de ARNm). El ARNm fue extraído utilizando Tri-Reagent (Sigma-Aldrich), previa disgregación del tejido en un homogeneizador.

6. Análisis estadístico

Todos los experimentos *in vitro* fueron repetidos al menos tres veces en ensayos independientes, utilizando células pertenecientes a diferentes pasajes (no más de ocho pasajes en total), y con múltiples réplicas por ensayo. Cada figura de la sección Resultados muestra el promedio \pm EEM (error estándar de la media) de experimentos independientes. En el caso del estudio de la proliferación celular mediante el ensayo WST-1 e incorporación de [³H]-timidina se realizaron 8 réplicas intra-ensayo por placa. En los experimentos restantes se realizaron 2 a 4 réplicas intra-ensayo. Los ensayos de angiogénesis *in vivo* se realizaron en los embriones viables obtenidos a partir de 30 embriones iniciales (teniendo en cuenta

un 60-70 % de viabilidad). En todos los casos, el análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism (Versión 8.0.2, GraphPad Software, EE. UU.). Los experimentos con más de dos grupos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de contraste de Tukey para múltiples comparaciones. Para comparar medias de solamente dos grupos se empleó la prueba t de Student.

El ensayo *in vivo* de inoculación de células de Leydig para la generación de tumores se realizó una vez, con seis animales por grupo experimental. En cuanto al análisis estadístico, se realizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguido la prueba de Holm-Sidak para múltiples comparaciones. En el caso de las áreas bajo la curva, el análisis se llevó a cabo utilizando la prueba t de Student. Las curvas de crecimiento se ajustaron a una regresión no lineal y se puso a prueba la hipótesis de que todas ajusten a la misma curva. Del rechazo de esa hipótesis se obtuvo una curva para cada tratamiento y su correspondiente tiempo de duplicación. En todos los casos, un valor de p menor a 0,05 fue considerado significativo.

Resultados – Capítulo 1

Como fuera mencionado en la introducción, la hemo oxigenasa-1 (HO-1) es una enzima inducible por desbalances oxidativos y cataliza el paso limitante en la degradación del hemo para la formación de monóxido de carbono, hierro ferroso y biliverdina/bilirrubina. Dichos productos, junto con las funciones propias de la HO-1, contribuyen sustancialmente con el mantenimiento del estado oxidativo y la homeostasis celular (Dunn *et al.*, 2014; Loboda *et al.*, 2016). A propósito de su acción antioxidante, numerosos trabajos han descrito el relevante papel citoprotector de la HO-1 en la preservación de la función testicular en presencia de agentes tóxicos (Maines and Ewing, 1996; Shiraishi and Naito, 2005; Bae *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2021). Sin embargo, hasta el momento, no se ha profundizado en el estudio del efecto directo de la inducción de HO-1 sobre las funciones de las células de Leydig. Es por esto que se planteó como primer objetivo evaluar los efectos de la inducción de HO-1 sobre la función esteroidogénica de las células de Leydig y su capacidad proliferativa. Asimismo, considerando que las funciones de la histamina en la regulación de la esteroidogénesis y proliferación de las células de Leydig han sido ampliamente estudiadas por nuestro grupo de trabajo, se propuso analizar el potencial impacto de la inducción de HO-1 sobre la regulación por histamina de dichas funciones.

Para desarrollar este objetivo y los subsiguientes, se utilizó la línea de células de Leydig MA-10: un modelo murino dependiente de gonadotrofinas, que exhibe una respuesta esteroidogénica frente a la estimulación con LH/hCG o con el segundo mensajero AMPc. Este modelo reproduce las características de las células de Leydig en un contexto testicular fisiológico. A su vez, para la evaluación de la esteroidogénesis, se utilizó la línea de células de Leydig de rata R2C: un modelo independiente de gonadotrofinas con sobreproducción constitutiva de esteroides, que representa un fenotipo de la célula de Leydig que podría observarse en ciertas condiciones patológicas (Rao *et al.*, 2003; Jo and Stocco, 2004; Song *et al.*, 2004).

1. Localización subcelular de la HO-1 en células de Leydig

En primera instancia, se determinó la expresión de HO-1 en las dos líneas celulares mediante inmunocitoquímica. La enzima HO-1 fue detectada en las células de Leydig MA-10 (Figura R1A) y en las células R2C (Figura R2A). En la Figura R1B y R2B se muestra la cuantificación de las marcas inmunes específicas.

Se observó que las células MA-10 expresan niveles similares de la enzima HO-1 en el núcleo y el citoplasma en la condición basal. Tras un tratamiento de 5 h con hemina 20 μ M, sustrato e inductor de la enzima HO-1, se observan mayores niveles de marca citoplasmática que de marca nuclear. En las células R2C, los niveles proteicos de HO-1 en el núcleo fueron mayores que los niveles citoplasmáticos en la condición basal. Luego del tratamiento con hemina, al igual que en las células MA-10, la marca citoplasmática fue mayor que la nuclear.

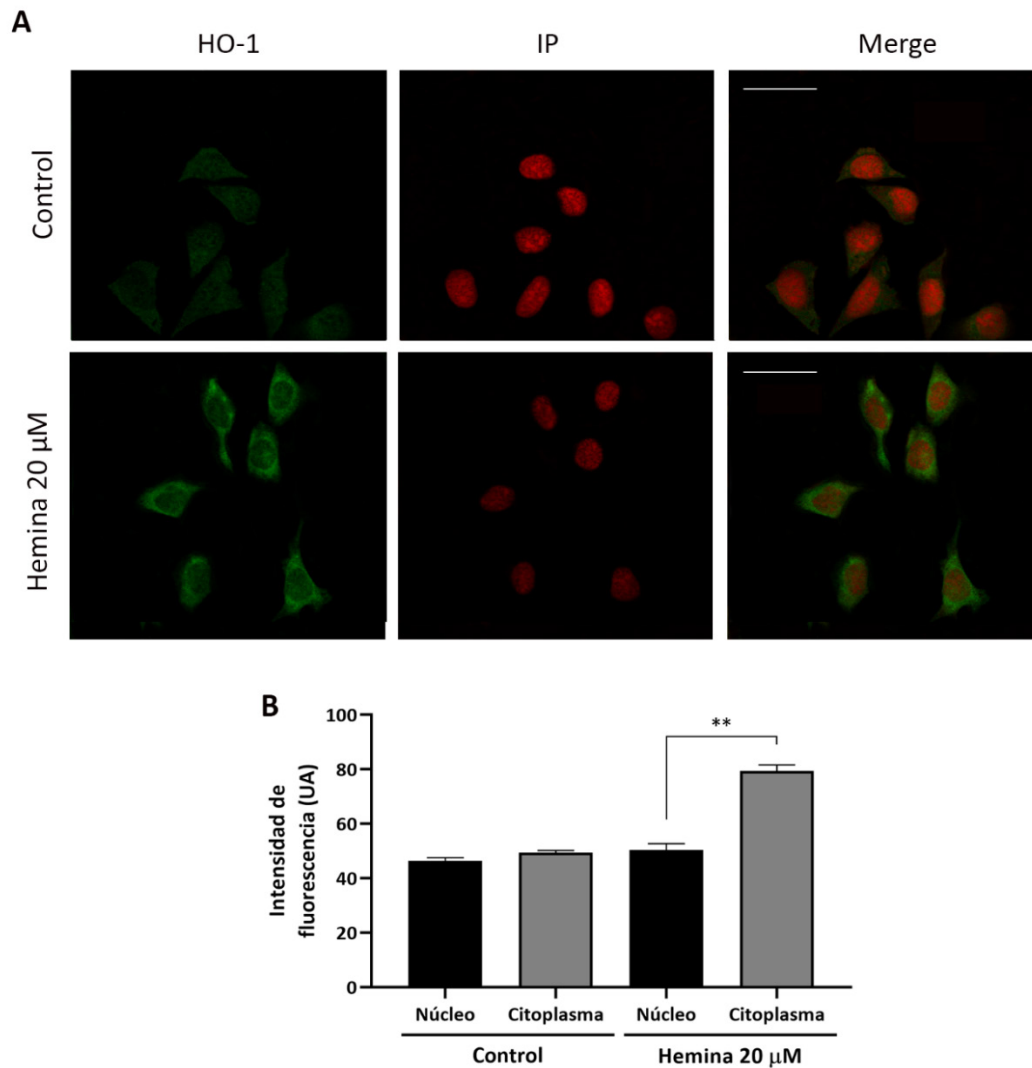


Figura R1. Detección, localización subcelular e inducción por hemina de HO-1 en células de Leydig MA-10. (A) Las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h en ausencia o presencia de hemina 20 μM. Luego, fueron marcadas con anticuerpos específicos anti-HO-1 (marca verde). Los núcleos fueron coloreados con yoduro de propidio (IP, marca roja). Se muestran fotografías representativas. Las barras de escala representan 50 μm. (B) La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada y se expresa en unidades arbitrarias (UA). Las barras representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **, $p < 0,01$.

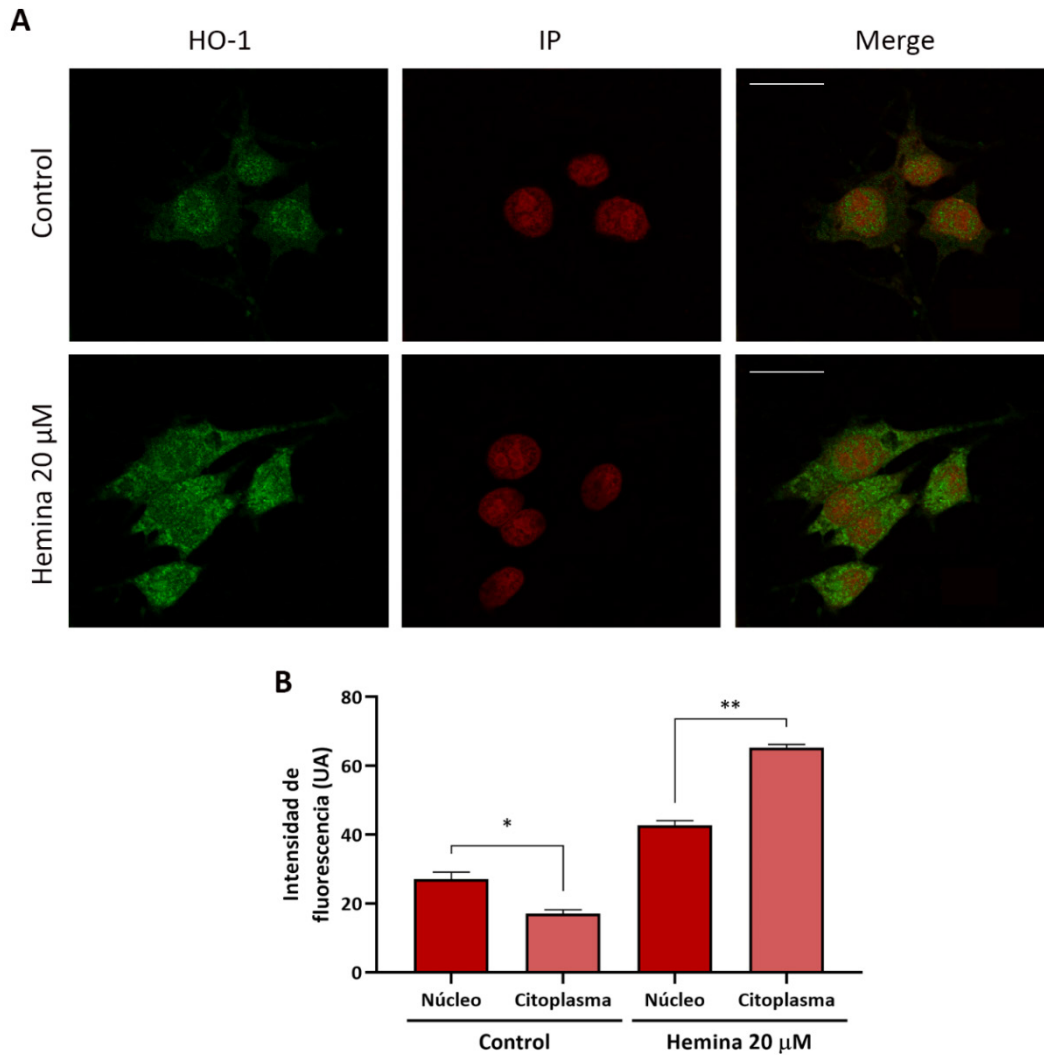


Figura R2. Detección, localización subcelular e inducción por hemina de HO-1 en células de Leydig R2C. (A) Células R2C fueron incubadas durante 5 h en ausencia o presencia de hemina 20 μ M. Luego, fueron marcadas con anticuerpos específicos anti-HO-1 (marca verde). Los núcleos fueron coloreados con yoduro de propidio (IP, marca roja). Se muestran fotografías representativas. Las barras de escala representan 20 μ m. (B) La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada y se expresa en unidades arbitrarias (UA). Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

2. Efecto de la hemina sobre la esteroidogénesis en células de Leydig

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado previamente que la inducción de HO-1 por un tratamiento de 5 h con hemina inhibe la esteroidogénesis basal y estimulada por hCG o análogos permeables del AMPc en células de Leydig MA-10 (Piotrkowski *et al.*, 2009). Para evaluar si este efecto inhibitorio se observa también

en las células R2C, ambas líneas celulares fueron incubadas durante 5 h con hemina 10, 20 y 40 μM para comparar los efectos. Como ya se mencionó, las células R2C producen altos niveles de esteroides de forma constitutiva y, por lo tanto, presentan mayores niveles basales de progesterona que las células MA-10. Esto puede observarse en la Figura R3B, así como también el efecto inhibitorio de la hemina sobre los niveles de progesterona a partir de la concentración 20 μM . En las células MA-10 (Figura R3A), esta inhibición fue significativa para todas las concentraciones ensayadas (concentraciones iguales o mayores a 10 μM). Para corroborar que el efecto observado de la hemina sobre la esteroidogénesis aguda estuviera mediado por la acción de la HO-1, las células MA-10 fueron co-incubadas durante 5 h con hemina 10 μM y el inhibidor selectivo de la HO-1, zinc protoporfirina IX (ZnPPIX), a una concentración 5 μM . Tal como se observa en la Figura R3C, el inhibidor ZnPPIX revierte de forma significativa el efecto inhibitorio de la hemina sobre los niveles de progesterona.

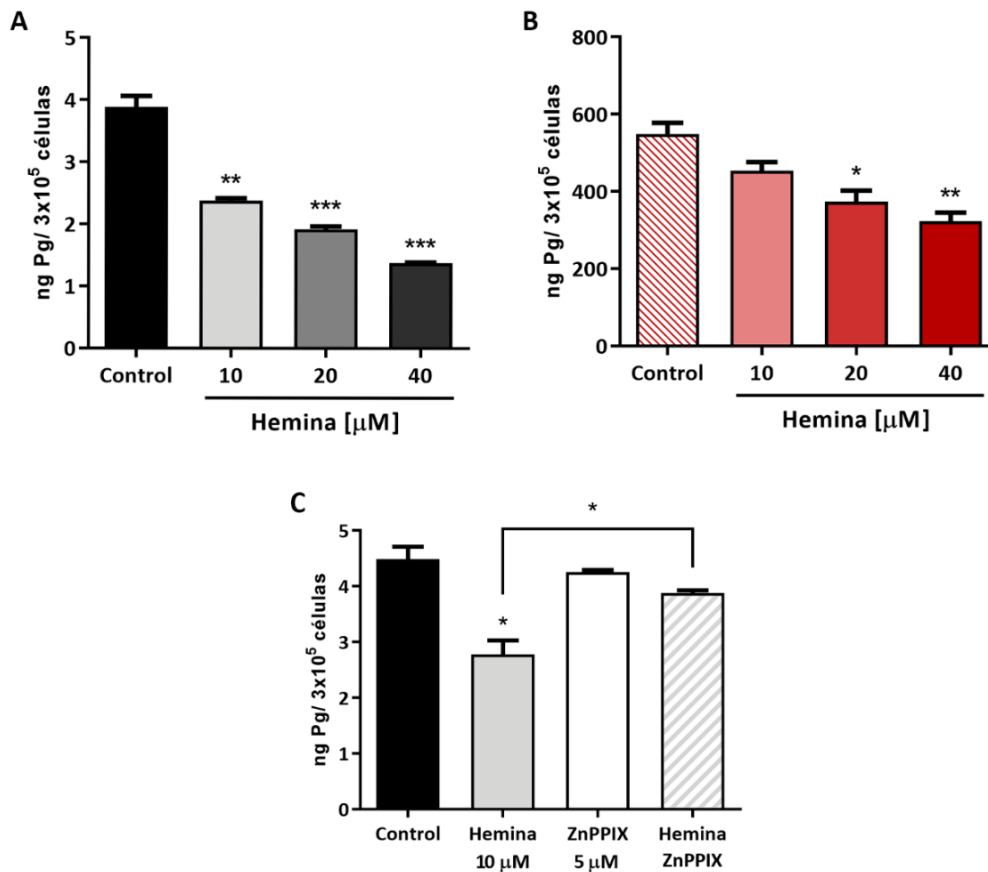


Figura R3. Efecto de la inducción de HO-1 sobre la esteroidogénesis aguda en células de Leydig MA-10 y R2C. Las células MA-10 (A) y R2C (B) fueron incubadas durante 5 h en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de hemina (10 a 40 μM). (C) Las células MA-10 fueron co-incubadas durante 5 h con hemina 10 μM y ZnPPiX 5 μM (inhibidor selectivo de la HO-1). Los niveles de progesterona (Pg) fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ vs Control.

A continuación, se evaluó el efecto de una exposición prolongada a hemina sobre la esteroidogénesis. Para ello, las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h y 48 h con hemina 10 y 25 μM . En la Figura R4A se observa que la hemina inhibió la producción de progesterona a ambos tiempos y para ambas concentraciones ensayadas. Para evaluar si este efecto de la hemina era reversible, luego de retirar el sobrenadante, la incubación de las células se continuó por 36 h o 48 h con medio fresco, en ausencia de hemina. Se observó que, pasadas 36 h, la inhibición de la esteroidogénesis fue completamente revertida para la concentración 10 μM de hemina y parcialmente para la concentración 25 μM . Luego de transcurridas 48 h

de incubación con medio fresco, la inhibición dada por ambas concentraciones de hemina fue revertida completamente (Figura R4B).

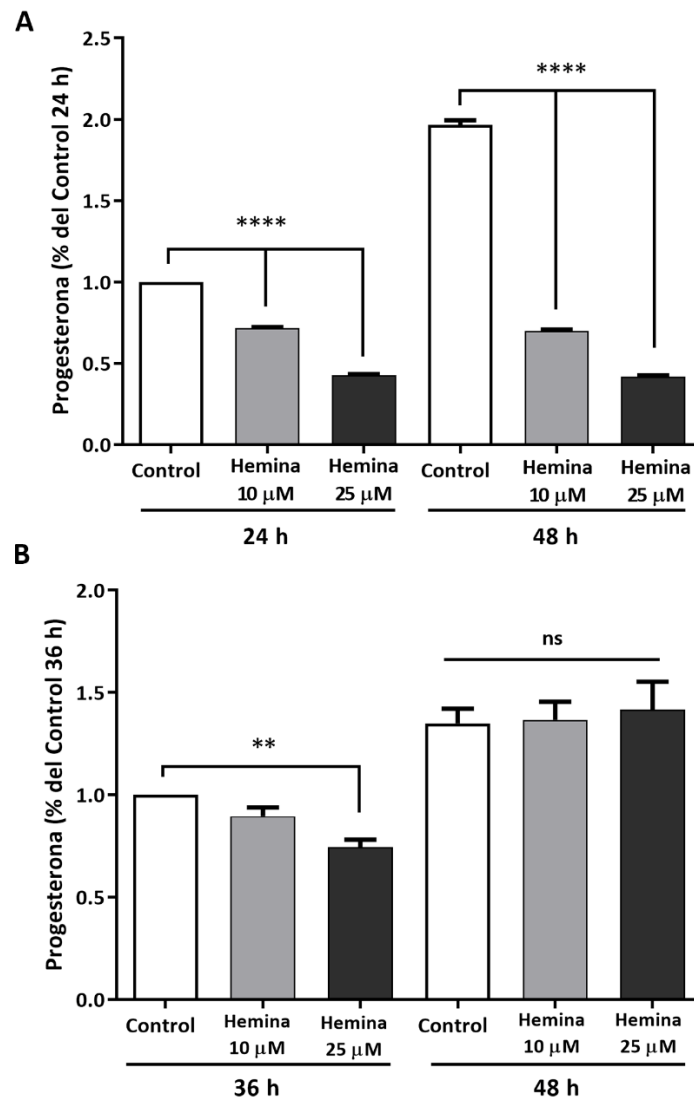


Figura R4. Efecto de la exposición prolongada a hemina sobre la producción de progesterona en células de Leydig MA-10. Las células fueron incubadas durante 24 h o 48 h en ausencia (Control) o presencia de Hemina 10 y 25 μ M (A). Luego, se retiró el medio de cultivo y se continuó la incubación durante 36 o 48 h con medio fresco, sin hemina (B). Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ vs Control.

3. Efecto del monóxido de carbono sobre la esteroidogénesis en células de Leydig

Como se mencionó anteriormente, la HO-1 es una enzima citoprotectora que cataliza el paso limitante en la degradación del hemo, lo cual lleva a la generación de cantidades equimolares de iones hierro, biliverdina y monóxido de carbono (CO) (Loboda *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que la HO-1 podría estar modulando la esteroidogénesis mediante la unión reversible del CO al grupo hemo de la enzima CYP11A1 (citocromo P450_{scc}), tal como fue descrito por nuestro grupo de trabajo para el óxido nítrico (Del Punta, Charreau and Pignataro, 1996), se evaluó la posible participación de CO en los efectos observados. Para tal fin, se realizaron ensayos con diclorometano (DCM, también conocido como cloruro de metileno), molécula utilizada para la generación de CO (Chen *et al.*, 2013; Ozawa *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2010; Sass *et al.*, 2003). Las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h en condiciones basales, con hemina 10 μM o con concentraciones crecientes de DCM (10, 100 y 1000 μM). En la Figura R5A se puede observar que el DCM, al igual que la hemina, provocó una disminución en los niveles de progesterona, la cual fue significativa a partir de la concentración 100 μM . Adicionalmente, se evaluó en células MA-10 el efecto del DCM en presencia de db-AMPC, análogo permeable del AMPc que estimula la esteroidogénesis. Las células fueron incubadas durante 5 h en presencia de db-AMPC y hemina 10 μM o DCM 1000 μM . El DCM también disminuyó los niveles de progesterona en la condición estimulada (Figura R5B). En células de Leydig R2C, las cuales no requieren estimulación para exhibir una marcada respuesta esteroidogénica, también se observó la disminución en los niveles de progesterona luego del tratamiento con DCM (Figura R5C).

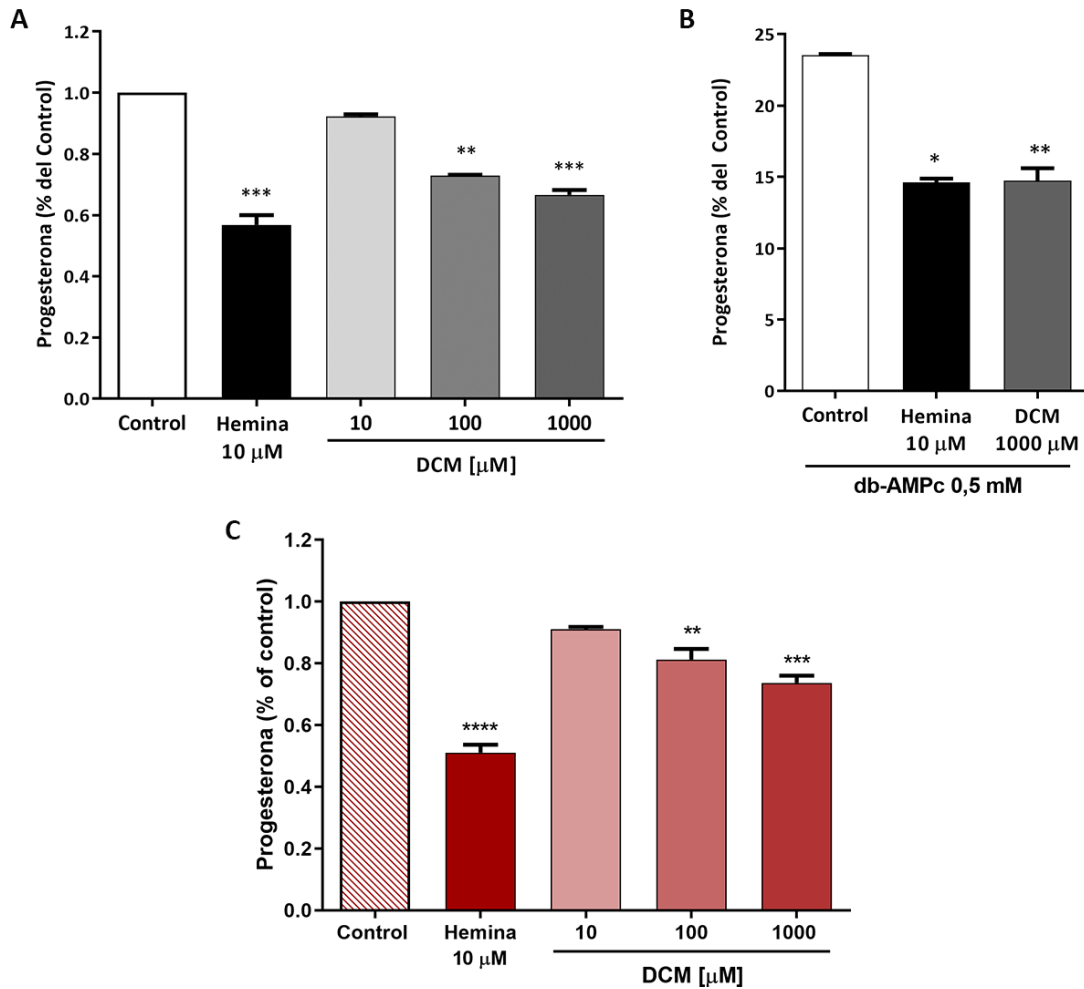


Figura R5. Efecto del DCM sobre los niveles de progesterona en células de Leydig MA-10 y R2C. Las células MA-10 (A) y R2C (C) fueron incubadas durante 5 h con Hemina 10 μ M y concentraciones crecientes de DCM (10 a 1000 μ M). Las células MA-10 también fueron incubadas durante 5 h con Hemina 10 μ M o DCM 1000 μ M en presencia de db-AMPc 0,5 mM (B). Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$ vs Control.

3.1 Efecto del CO sobre el camino esteroidogénico

A continuación, nos propusimos evaluar a qué nivel del camino esteroidogénico actúa el CO. Para verificar si dicha molécula actúa inhibiendo a la CYP11A1 (citocromo P450_{scc}), enzima que cataliza la transformación de colesterol a pregnenolona —uno de los pasos limitantes en la síntesis de esteroides— las células MA-10 fueron incubadas con hemina 10 μ M o DCM 1000 μ M en ausencia o

presencia de 22-R-OH colesterol 10 μ M, un derivado del colesterol que atraviesa libremente las membranas celulares. En la Figura R6A se observa que el efecto inhibitorio de hemina y del DCM no fue revertido por la adición de 22-R-OH colesterol, indicando que alguna de las enzimas esteroideas río abajo del colesterol están siendo afectadas por el CO.

A continuación, para evaluar si el CO ejerce un efecto sobre la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), que cataliza el paso de pregnenolona a progesterona, las células MA-10 fueron incubadas con hemina 10 μ M o DCM 1000 μ M en ausencia o presencia de pregnenolona 10 μ M. En la Figura R6B puede observarse que el efecto inhibitorio del CO fue revertido completamente por la adición de pregnenolona, indicando que la 3 β -HSD no está siendo afectada. En conjunto, estos resultados indican que el CO estaría ejerciendo su efecto inhibitorio sobre la enzima CYP11A1.

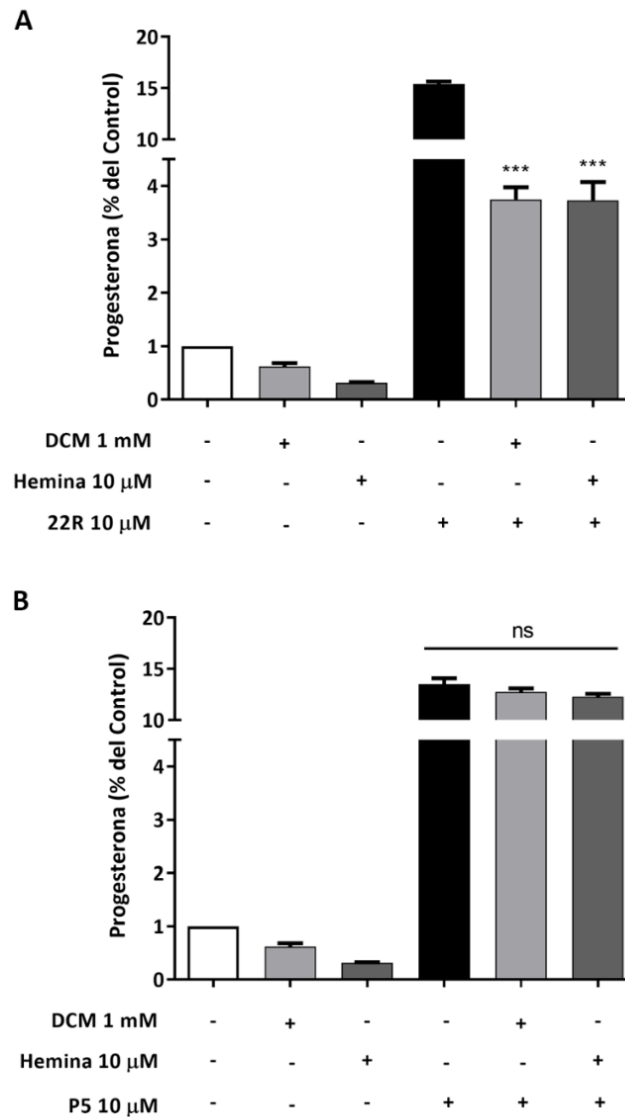


Figura R6. Efecto del DCM sobre las enzimas del camino esteroidogénico en células de Leydig MA-10. Las células fueron incubadas durante 5 h con Hemina 10 μ M o DCM 1 mM en ausencia o presencia de 22R-OH-colesterol (22R; A) 10 μ M o pregnenolona (P5; B) 10 μ M. Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. ***, $p < 0,001$ vs 22R-OH Colesterol.

4. Efecto de la hemina sobre la proliferación de células de Leydig

Para evaluar el efecto de la hemina sobre la proliferación de células de Leydig, las células MA-10 fueron incubadas con concentraciones crecientes de hemina (1, 10 y 25 μ M) durante 24 h. Se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo de incorporación de [3 H]-timidina. En la Figura R7A se observa que la hemina disminuyó la incorporación de [3 H]-timidina a partir de la concentración 10 μ M.

Si bien las células MA-10 son un modelo ampliamente aceptado para el estudio de las funciones de las células de Leydig, debe tenerse en cuenta que se trata de una línea celular tumoral, cuya función proliferativa se encuentra alterada. Por este motivo, consideramos oportuno evaluar la relevancia fisiológica del efecto inhibitorio de la hemina sobre la proliferación celular utilizando cultivos primarios de células de Leydig normales aisladas a partir de testículos de rata. Considerando que las células de Leydig adultas presentan una actividad proliferativa mínima (Chen *et al.*, 2014), los ensayos fueron realizados utilizando una población de células de Leydig proliferantes inmaduras aisladas a partir de testículos de ratas de 35 días. Dichas células fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de hemina (0,1 a 25 μM) o IGF-1 0,5 mg/l (control positivo) y se determinó la incorporación de [^3H]-timidina. Como se puede observar en la Figura R7B, la hemina, a partir de la concentración 1 μM , disminuyó marcadamente la incorporación de [^3H]-timidina en las células de Leydig inmaduras. En la Figura R7C se observa que el inhibidor selectivo de la HO-1 revierte parcialmente el efecto inhibitorio de la hemina sobre la proliferación a 24 h en células MA-10.

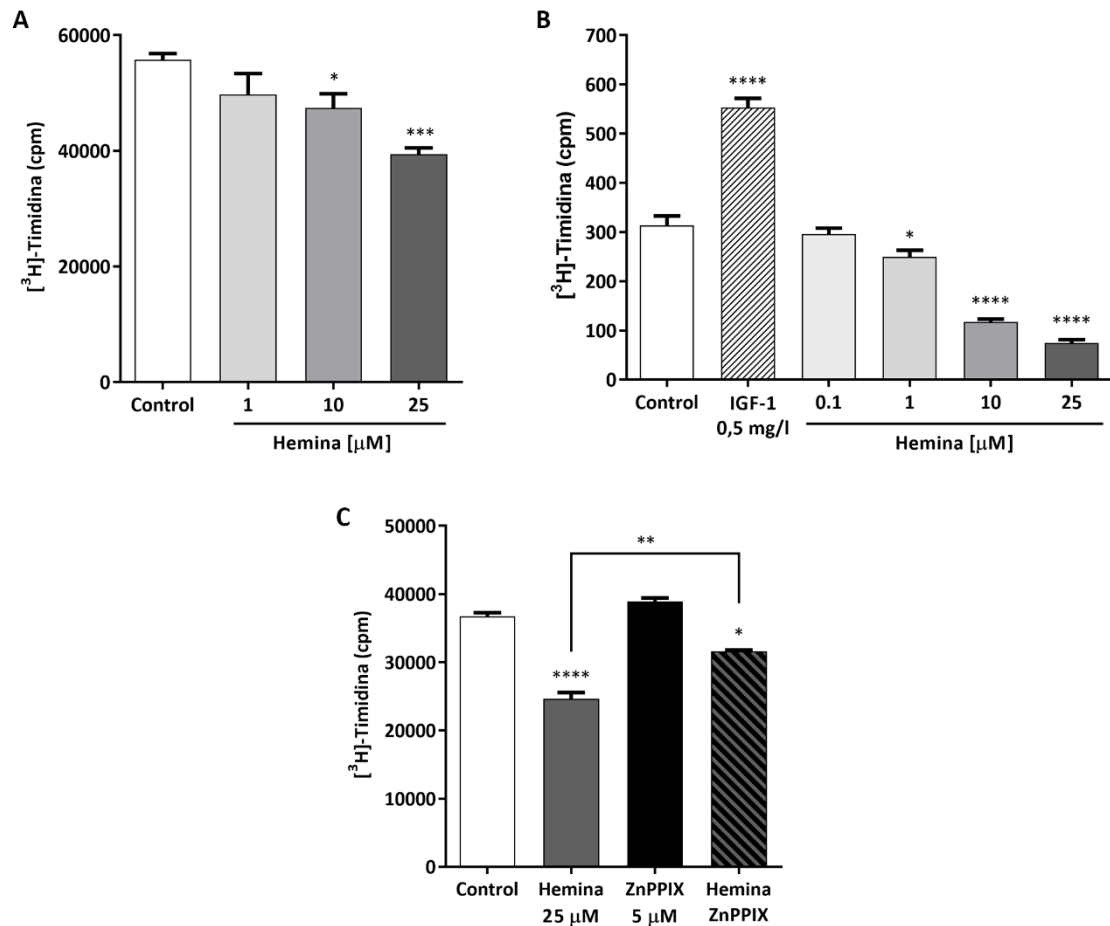


Figura R7. Efecto de la inducción de HO-1 sobre la proliferación de células MA-10 y células de Leydig inmaduras de rata. (A) Las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de hemina (1, 10 y 25 μ M). (B) Células de Leydig inmaduras aisladas a partir de testículos de rata fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de Hemina (0,1 – 25 μ M) o IGF-1 0,5 mg/l. (C) Las células MA-10 fueron co-incubadas durante 24 h con hemina 10 μ M y ZnPPiX 5 μ M (inhibidor selectivo de la HO-1). La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo de incorporación de [3 H]-timidina. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por octuplicado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ vs Control.

Para evaluar la reversibilidad del efecto inhibitorio de la hemina sobre la proliferación de células de Leydig, las células MA-10 fueron incubadas con hemina 10 y 25 μ M durante 24 h. Finalizada la incubación, se retiró el medio de cultivo y se agregó medio fresco sin hemina para continuar la incubación durante 48 h. En la Figura R8 puede observarse que, pasado este tiempo, el efecto inhibitorio de

hemina sobre la incorporación de [³H]-timidina dejó de observarse, lo cual sugiere que el efecto de la hemina sobre la proliferación de células de Leydig es reversible.

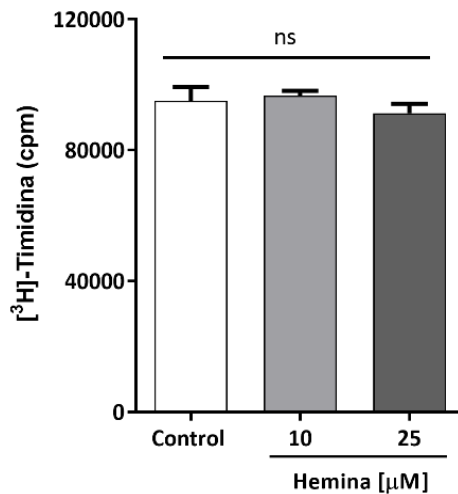


Figura R8. Reversibilidad del efecto inhibitorio de la hemina sobre la proliferación de células de Leydig MA-10. Las células fueron incubadas durante 24 h con hemina 10 y 25 μM . Finalizada esta incubación, se retiró el medio de cultivo y las células fueron mantenidas en medio de cultivo rico sin hemina durante otras 48 h. La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo de incorporación de [³H]-timidina. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por octuplicado.

5. Efecto del monóxido de carbono sobre la proliferación de células de Leydig

Se ha observado que el efecto de la inducción de la HO-1 sobre la esteroidogénesis está mediado por el CO, producto de la reacción catalizada por la enzima. A continuación, se evaluó si el CO también media sus efectos sobre la proliferación. Para ello, las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h en condiciones basales o con concentraciones crecientes de DCM (10, 100 y 1000 μM). En la Figura R9 se puede observar que el DCM, al igual que la hemina, inhibió la proliferación a la concentración 1000 μM . Cabe resaltar que el DCM, a las concentraciones ensayadas, no altera la viabilidad celular.

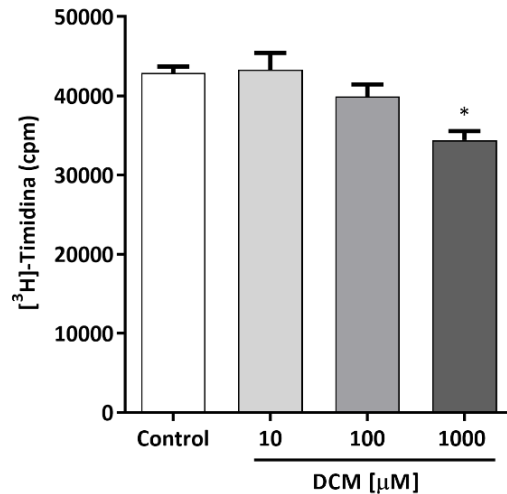


Figura R9. Efecto del DCM sobre la proliferación de células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de DCM (10 a 1000 μ M). La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo de incorporación de [3 H]-timidina. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por octuplicado. *, $p < 0,05$ vs Control.

6. Efecto de la hemina sobre la progresión del ciclo celular

Para determinar si el efecto anti proliferativo de la hemina sobre las células de Leydig está mediado por un efecto sobre la progresión del ciclo celular, se evaluó la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo mediante tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Para tal fin, células MA-10 fueron tratadas durante 24 h con hemina 25 μ M. Tal como se observa en la Figura R10, el tratamiento con hemina provocó un aumento significativo en el porcentaje de células en la fase G2/M.

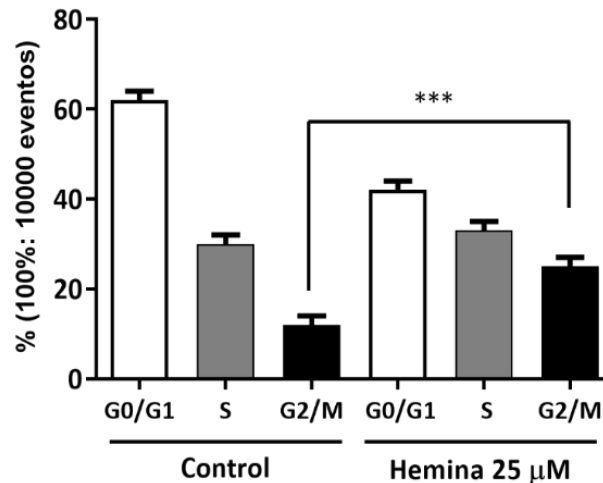


Figura R10. Efecto de la inducción de HO-1 sobre la progresión del ciclo celular en células de Leydig MA-10. Las células fueron incubadas durante 24 h con hemina 25 μ M. Luego de la incubación, fueron fijadas, permeabilizadas, teñidas con ioduro de propidio y analizadas mediante citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células en las fases G0/G1, S y G2/M para cada tratamiento. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. ***, $p < 0,001$.

7. Efecto de la hemina sobre la apoptosis

A continuación, se evaluó si la disminución observada en la proliferación podía estar asociada a una inducción de la muerte celular por apoptosis. Para ello, las células de Leydig MA-10 fueron incubadas con hemina 10 y 25 μ M y analizadas mediante el ensayo TUNEL utilizando citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el inductor de apoptosis doxorrubicina (10 mg/l). La Figura R11 muestra que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células TUNEL positivas entre el Control y hemina 10 μ M mientras que la concentración 25 μ M mostró un leve aumento en el porcentaje de células apoptóticas: Control 0,21% \pm 0,06 vs hemina 25 μ M 2,44% \pm 0,82. Como era esperado, la doxorrubicina (control positivo) aumentó significativamente la proporción de células apoptóticas.

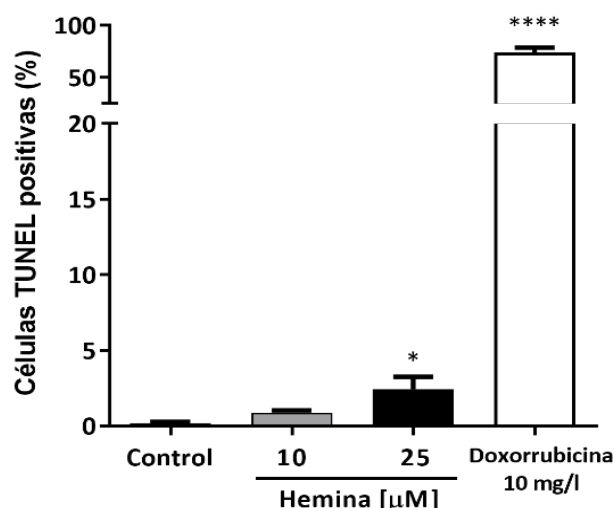


Figura R11. Efecto de la inducción de HO-1 sobre la apoptosis de células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con hemina 10 y 25 μM y analizadas mediante el ensayo de TUNEL. Se utilizó doxorrubicina 10 mg/l como control positivo. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$ vs Control.

8. Interacción entre HO-1 y el sistema histaminérgico en la modulación de la esteroidogénesis

Como se mencionó previamente, la histamina es una amina biógena cuyos efectos regulatorios sobre las funciones de las células de Leydig han sido ampliamente descritos. Específicamente, se ha demostrado su efecto dual sobre la producción de esteroides basal y estimulada en células MA-10, siendo estimulatorio a concentraciones fisiológicas de orden nanomolar, e inhibitoria a concentraciones suprafisiológicas de orden micromolar. La regulación por histamina está mediada por los tres receptores que se encuentran expresados en las células de Leydig: HRH1, HRH2 y HRH4. La activación de HRH2 tiene un efecto estimulatorio sobre la síntesis de esteroides, mientras que las acciones mediadas por HRH1 y HRH4 son inhibitorias (Mondillo *et al.* 2005, Abiuso *et al.* 2014, Abiuso *et al.* 2018). En vista de este rol de la histamina, nos propusimos evaluar el posible efecto de la inducción de la HO-1 sobre los efectos regulatorios de la histamina a concentraciones fisiológicas. Para tal fin, las células MA-10 fueron

incubadas durante 5 h con hemina 10 μM en ausencia o presencia de histamina 1 nM. Tal como se muestra en la Figura R12A, cuando las células fueron co-incubadas con hemina e histamina 1 nM, el efecto estimulador de histamina fue abolido por la presencia de hemina, incluso llegando a niveles inferiores que los niveles basales. Cuando se realizó el mismo esquema de tratamientos, pero en presencia de db-AMPc 0,5 mM, la hemina también revirtió el efecto estimulador de histamina 1 nM.

Una vez que se comprobó que el efecto estimulador de la histamina se ve afectado por la inducción de HO-1, se procedió a evaluar si esto mismo ocurre luego de la activación específica del receptor HRH2, el cual media las acciones de la histamina a concentración fisiológica. Para ello se incubaron las células MA-10 durante 5 h con hemina 10 μM en presencia o ausencia del agonista específico de HRH2, amtamina. Se observó que, tanto en condiciones basales como estimuladas por db-AMPc, el efecto estimulador ejercido por amtamina 1 μM fue revertido por hemina, provocando incluso una disminución en los niveles de progesterona por debajo de los niveles basales (Figura R12B).

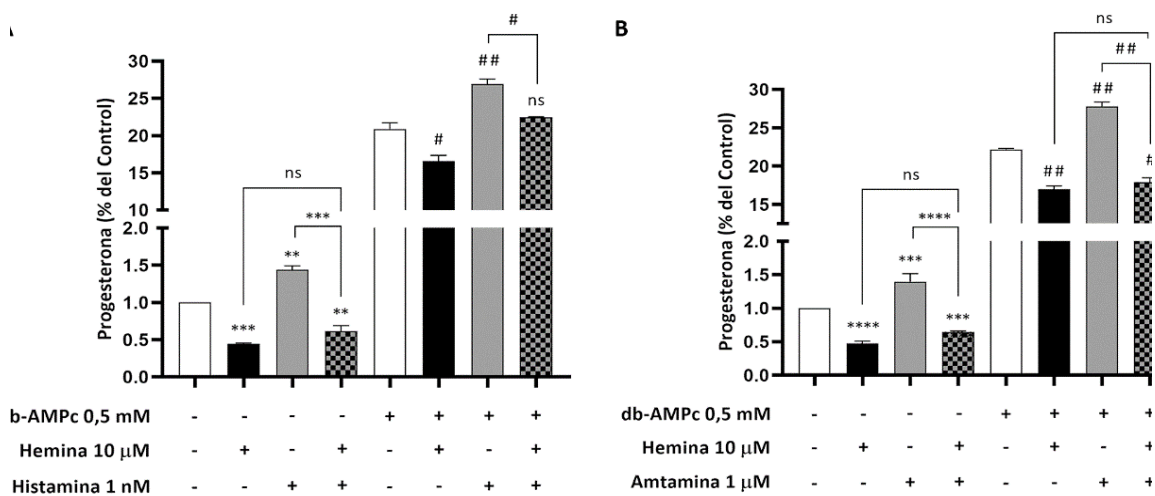


Figura R12. Interacción entre hemina e histamina en la modulación de la esteroidogénesis de células de Leydig MA-10. (A) Las células fueron incubadas durante 5 h con hemina 10 μM en ausencia o presencia de histamina 1 nM y db-AMPc 0,5 mM.

(B) Las células fueron incubadas durante 5 h con hemina 10 μM en ausencia o presencia del agonista del receptor HRH2 (amtamina 1 μM) y db-AMPC 0,5 mM. Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$ vs Control o grupo indicado. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$ vs db-AMPC o grupo indicado.

9. Interacción entre HO-1 y el sistema histaminérgico en la modulación de la proliferación

Con respecto a la regulación de la proliferación, se ha descrito que la histamina estimula la proliferación de células de Leydig a concentraciones fisiológicas, y dicho efecto también está mediado por el receptor HRH2. Para evaluar la posible interacción entre histamina y HO-1 en la regulación de la proliferación de células de Leydig, las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con hemina 10 μM en ausencia o presencia de histamina 1 nM. Cuando las células fueron co-incubadas con hemina e histamina 1 nM, el efecto estimulador de la histamina fue completamente abolido, incluso llegando a niveles por debajo de los valores del control (Figura R13A). Cuando las células fueron incubadas en presencia del agonista específico del receptor HRH2, amtamina 1 μM , y hemina 10 μM también se observó que el efecto estimulador sobre la proliferación fue revertido por hemina (Figura R13B).

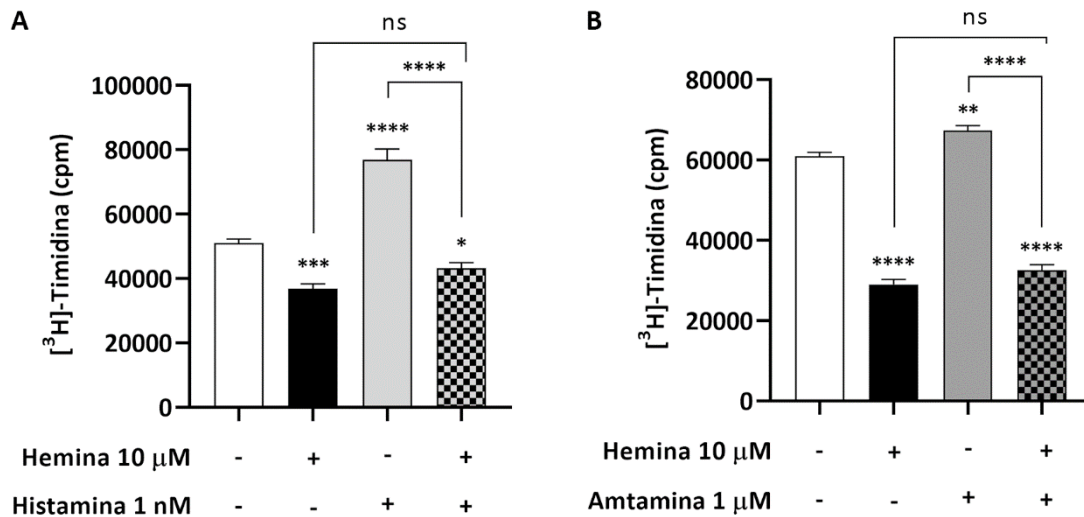


Figura R13. Interacción entre hemina e histamina en la modulación de la proliferación de células MA-10. (A) Las células fueron incubadas durante 24 h con hemina 10 μM en ausencia o presencia de histamina 1 nM. (B) Las células fueron incubadas durante 24 h con hemina 10 μM en ausencia o presencia del agonista de HRH2 (amtamina 1 μM). La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo de incorporación de [³H]-timidina. Las barras representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por octuplicado. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p>0,0001 vs Control o grupo indicado.

Conclusiones parciales - Capítulo 1

A partir de los resultados obtenidos en este primer capítulo, se puede concluir que la inducción de HO-1 por hemina inhibe la esteroidogénesis en células de Leydig de forma reversible. Dicho efecto estaría mediado, al menos parcialmente, por el CO, que afectaría negativamente la actividad de la enzima CYP11A1. La inducción de HO-1 también inhibe reversiblemente la proliferación celular, lo cual podría estar mediado por un arresto del ciclo celular en la fase G2/M. Adicionalmente, la inducción de HO-1 altera la regulación por histamina de la esteroidogénesis y la proliferación de las células de Leydig.

Resultados – Capítulo 2

Un desbalance oxidativo está generalmente acompañado de un escenario inflamatorio y, como contraparte, la inflamación suele potenciar el estrés oxidativo (Vaziri and Rodríguez-Iturbe, 2006; Biswas, 2016). En tanto que la HO-1 es una enzima clave en la respuesta antioxidante, las ciclooxigenasas (COX) cumplen un papel central en la respuesta inflamatoria.

Las COX, también llamadas prostaglandina endoperóxido-H sintasas, son enzimas bifuncionales con actividad oxigenasa y peroxidasa, que convierten el ácido araquidónico en diferentes tipos de prostaglandinas, mediadores lipídicos con una enorme variedad de funciones. Hasta el momento, se conocen tres isoformas de la ciclooxigenasa presentes en mamíferos: la COX-1 es una enzima constitutiva, que se encuentra expresada de forma permanente en múltiples tipos de tejidos; la COX-2 es inducible y actúa únicamente durante la respuesta inflamatoria; y la COX-3 es la isoforma más recientemente descubierta y se expresa principalmente en el sistema nervioso central (Przybyła, Szychowski and Gmiński, 2020).

En el segundo capítulo de este trabajo, se abordará el estudio de la COX-1 y la COX-2 y sus efectos sobre la función esteroideogénica y proliferativa de las células de Leydig. También, se analizará su potencial interacción con la HO-1.

1. Localización subcelular de COX-1 y COX-2 en células de Leydig

Como primera aproximación al estudio de las ciclooxigenasas en las células de Leydig MA-10 y R2C, se evaluó si sus isoformas constitutiva (COX-1) e inducible (COX-2) se encuentran presentes en ambas líneas celulares. Para tal fin, se realizó una inmunomarcación y se observó que ambas isoformas se expresan tanto en MA-10 (Figura R14A) como en R2C (Figura R14B). A su vez, las marcas inmunoespecíficas permiten evidenciar la localización subcelular de las enzimas: COX-1 y COX-2 se encuentran en el citoplasma de ambas líneas celulares. También se observaron inmunomarcas nucleares para COX-1, mientras que la COX-2 parecería no tener presencia nuclear.

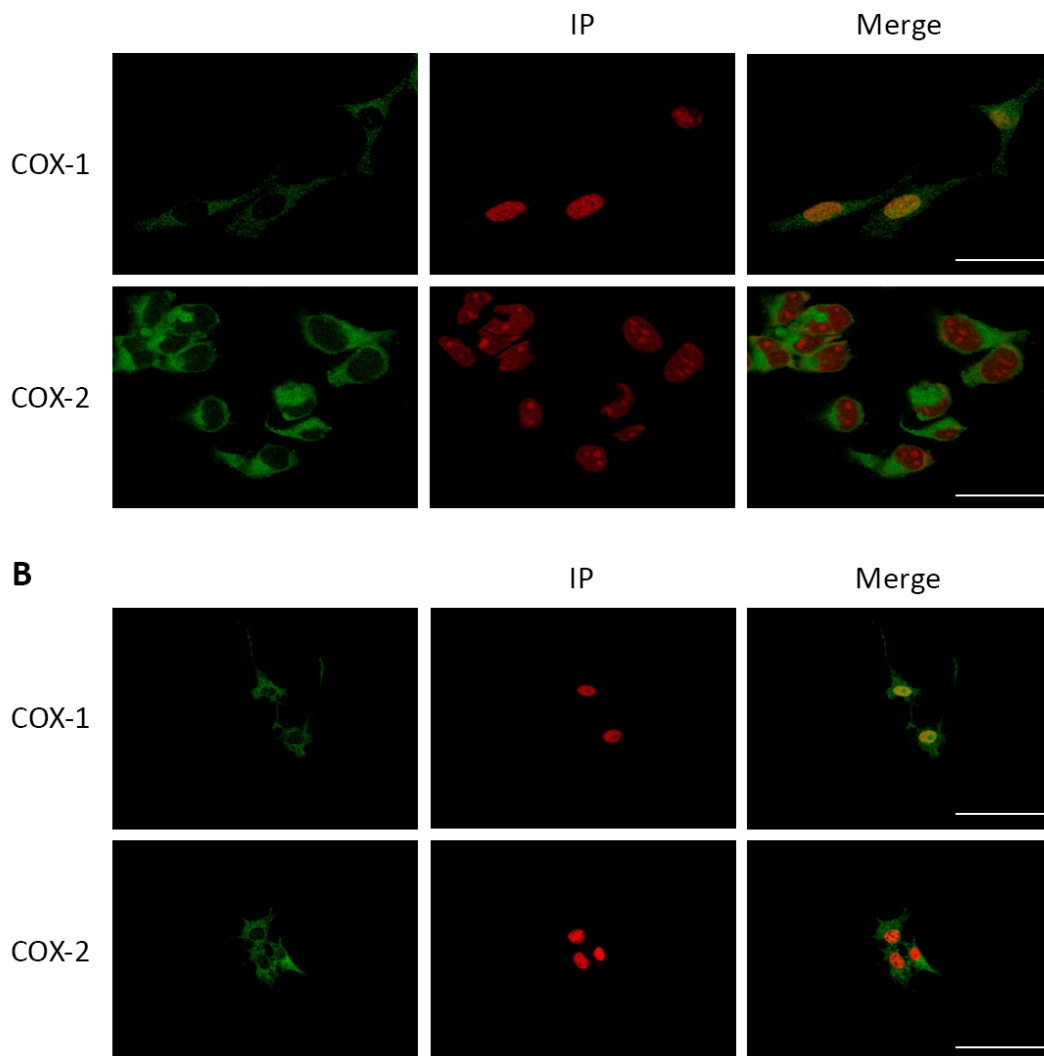


Figura R14. Detección y localización subcelular de COX-1 y COX-2 en células de Leydig. Las células MA-10 (A) y R2C (B) fueron incubadas con anticuerpos específicos

anti-COX-1 y anti-COX-2 (marca verde). Los núcleos fueron coloreados con yoduro de propidio (IP, marca roja). Se muestran fotografías representativas. Las barras de escala representan 50 μm .

2. Efecto de COX-1 y COX-2 sobre la esteroidogénesis de células de Leydig

Habiendo observado la presencia de ambas isoformas de la COX en ambos modelos experimentales, se procedió a estudiar su efecto sobre diferentes funciones celulares. En primer lugar, se evaluó si COX-1 y COX-2 afectan la función endocrina de las células de Leydig. Para ello, las células MA-10 y R2C fueron tratadas durante 5 h con inhibidores selectivos de la actividad enzimática de COX-1 (SC-560) y de COX-2 (meloxicam). Finalizada la incubación, se determinó la concentración de progesterona en los sobrenadantes. Las células MA-10 fueron tratadas durante 5 h con SC-560 1, 10 y 100 nM o meloxicam 0,1, 1 y 10 μM en presencia o ausencia de db-AMPC 100, 200 y 500 μM . Tal como se observa en la Figura R15A, la inhibición de COX-1 por SC-560 no afectó la esteroidogénesis basal o estimulada por db-AMPC. Por su parte, la inhibición de COX-2 no afectó significativamente la esteroidogénesis basal, pero tuvo un efecto estimulador sobre la esteroidogénesis estimulada por db-AMPC. En presencia de db-AMPC 100 μM , únicamente la concentración más alta de meloxicam mostró dicho efecto estimulador, pero en presencia de 200 y 500 μM de db-AMPC, todas las concentraciones ensayadas aumentaron la concentración de progesterona respecto del control sin inhibidor. Para corroborar que el efecto de las ciclooxigenasas se encuentra mediado únicamente por la isoforma 2, se trató a las células MA-10 durante 5 h con meloxicam 10 μM (inhibidor de COX-2), indometacina 1 μM (inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas) o una combinación de ambos inhibidores en presencia de db-AMPC 100 μM . Se observó que la indometacina estimuló la esteroidogénesis al mismo nivel que el meloxicam y que la coincubación con ambos inhibidores no mostró un efecto aditivo (Figura

R15B). Estos resultados sugieren que COX-2, y no COX-1, tiene un efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis.

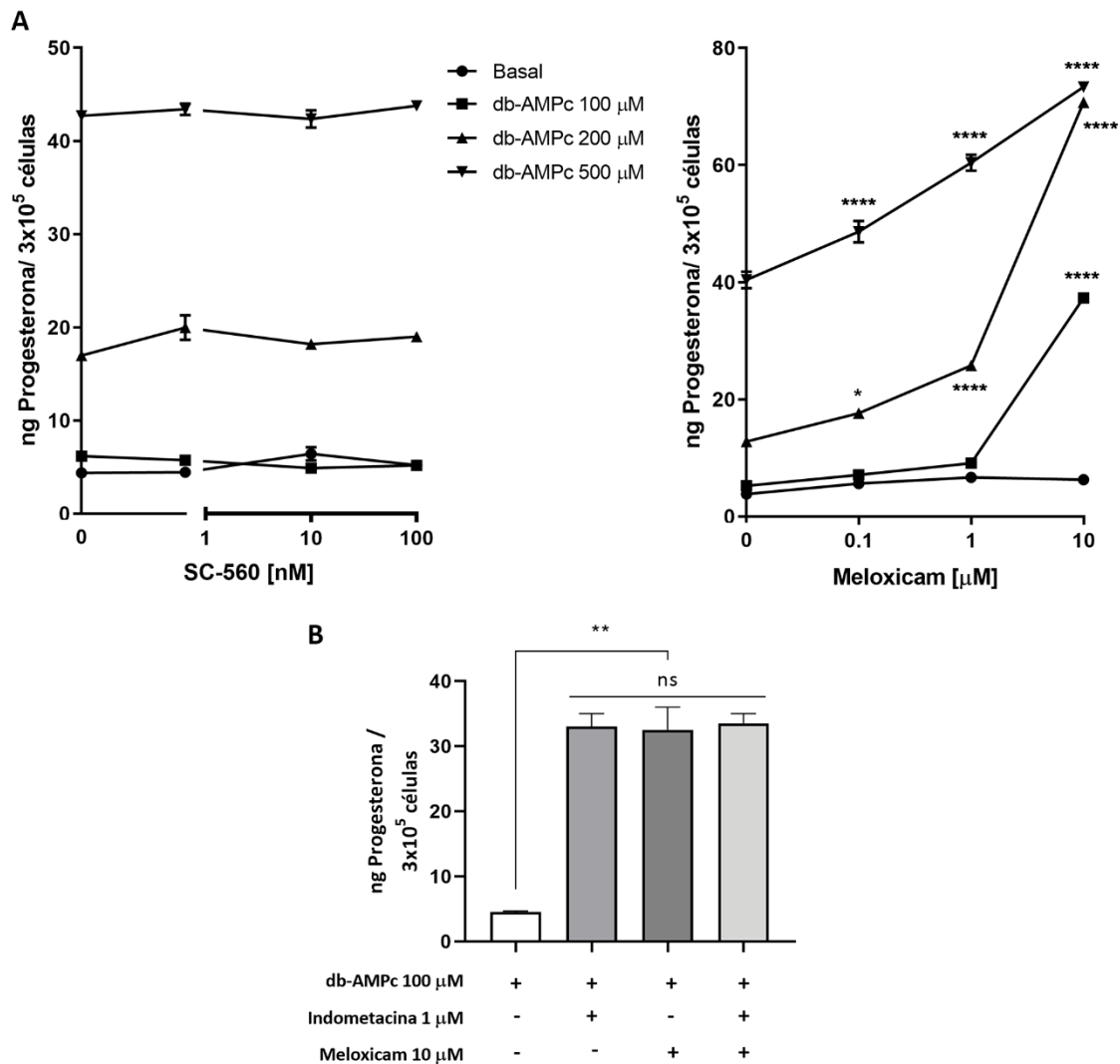


Figura R15. Efecto de la inhibición de COX-1 y COX-2 sobre los niveles de progesterona en células de Leydig MA-10. (A) Las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con diferentes concentraciones de SC-560 (1 a 100 nM) o meloxicam (0,1 a 10 μM) en ausencia o presencia de db-AMPc (100 a 500 μM). Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Los puntos representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, p<0,05; ****, p<0,0001 vs misma concentración de db-AMPc en ausencia de inhibidor. (B) Las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con indometacina 1 μM y/o meloxicam 10 μM en presencia de db-AMPc 100 μM. Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **, p<0,01 vs db-AMPc.

En la línea celular R2C, al igual que en MA-10, la inhibición de COX-1 no afectó la esteroidogénesis (Figura R16A). Al tratar las células con meloxicam, inhibidor de COX-2, no se observaron efectos significativos al tratar las células con las concentraciones utilizadas para la línea celular MA-10 (Figura R16B).

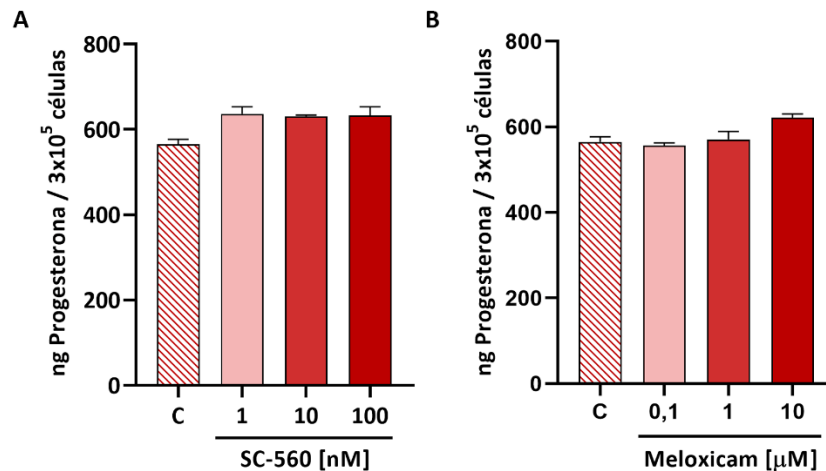


Figura R16. Efecto de la inhibición de COX-1 y COX-2 sobre los niveles de progesterona en células de Leydig R2C. Las células fueron incubadas durante 5 h con diferentes concentraciones de SC-560 (1 a 100 nM) (A) o meloxicam (0,1 a 10 μM) (B). Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

A continuación nos propusimos estudiar si ambos inhibidores selectivos, además de ejercer sus efectos mediante la inhibición de la actividad de las enzimas, eran capaces de modificar la expresión de las mismas. Para ello se evaluó el efecto de SC-560 y meloxicam sobre los niveles proteicos de COX-1 y COX-2. Se observó que los inhibidores no modifican los niveles de COX-1 y de COX-2 tras un tratamiento de 5 h en MA-10 (Figura R17A) ni en R2C (Figura R17B). Los mismos resultados fueron observados luego de 24 h de tratamiento (datos no mostrados).

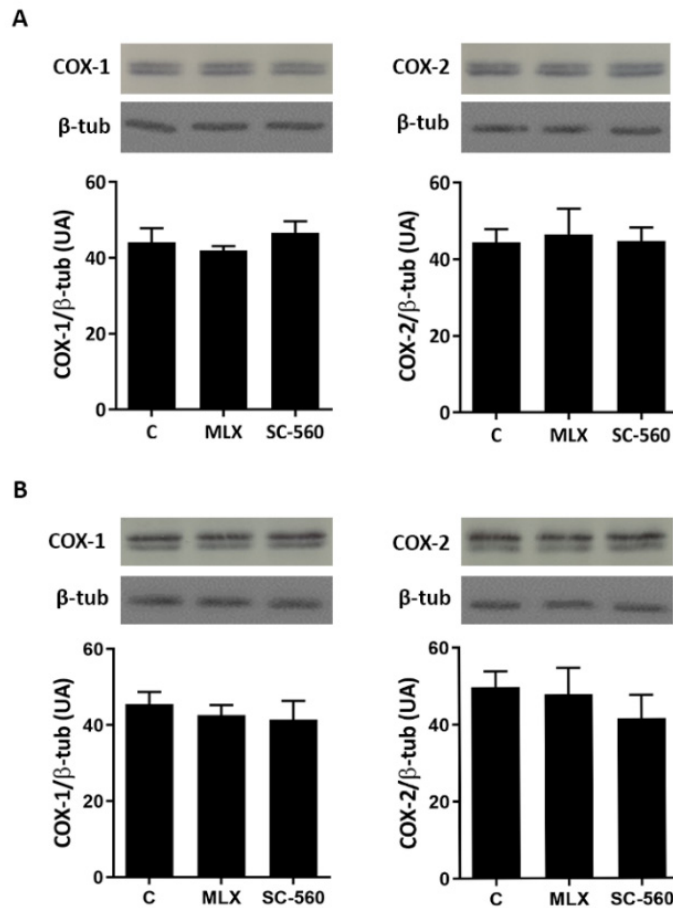


Figura R17. Efecto de meloxicam y SC-560 sobre los niveles proteicos de COX-1 y COX-2. Células MA-10 (A) y R2C (B) fueron incubadas durante 5 h con inhibidores específicos de COX-1 (SC-560 10 μ M) y de COX-2 (MLX 10 μ M). Luego, los homogenatos fueron analizados mediante Western Blot. Los niveles de COX-1 y COX-2 se relativizaron al control de carga β -tubulina. Se muestran inmunoblots representativos. La intensidad de las bandas se expresa en unidades arbitrarias (UA). Las barras representan el promedio \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

3. Efecto de las prostaglandinas sobre la esteroidogénesis en células de Leydig

Como se mencionó previamente, COX-2 cataliza el paso limitante en la biosíntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. Las prostaglandinas son mediadores lipídicos con importantes funciones en la regulación de una variedad de procesos fisiopatológicos (Crosby and DuBois, 2003). Dos de las prostaglandinas bioactivas sintetizadas a través de la vía de COX-2 son PGF 2α y PGD 2 . Es por esto que se analizó si estos metabolitos lipídicos eran capaces de

regular la esteroidogénesis. Para ello, las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con PGF2 α o PGD2 en ausencia o presencia de db-AMPC 100 μ M. En los gráficos se muestra el rango de concentración de prostaglandinas 10 fM, 1 pM y 100 pM, aunque los ensayos abarcaron hasta la concentración 1 μ M. Tal como se observa en la Figura R18A, PGF2 α estimuló la esteroidogénesis basal, mientras que en presencia de db-AMPC, mostró un marcado efecto inhibitorio. PGD2, por otro lado, no afectó la esteroidogénesis en ninguna de las dos condiciones o concentraciones ensayadas. Al incubar las células R2C con las mismas concentraciones de prostaglandinas que las ensayadas en MA-10 (Figura R18B), no se observaron efectos sobre la esteroidogénesis.

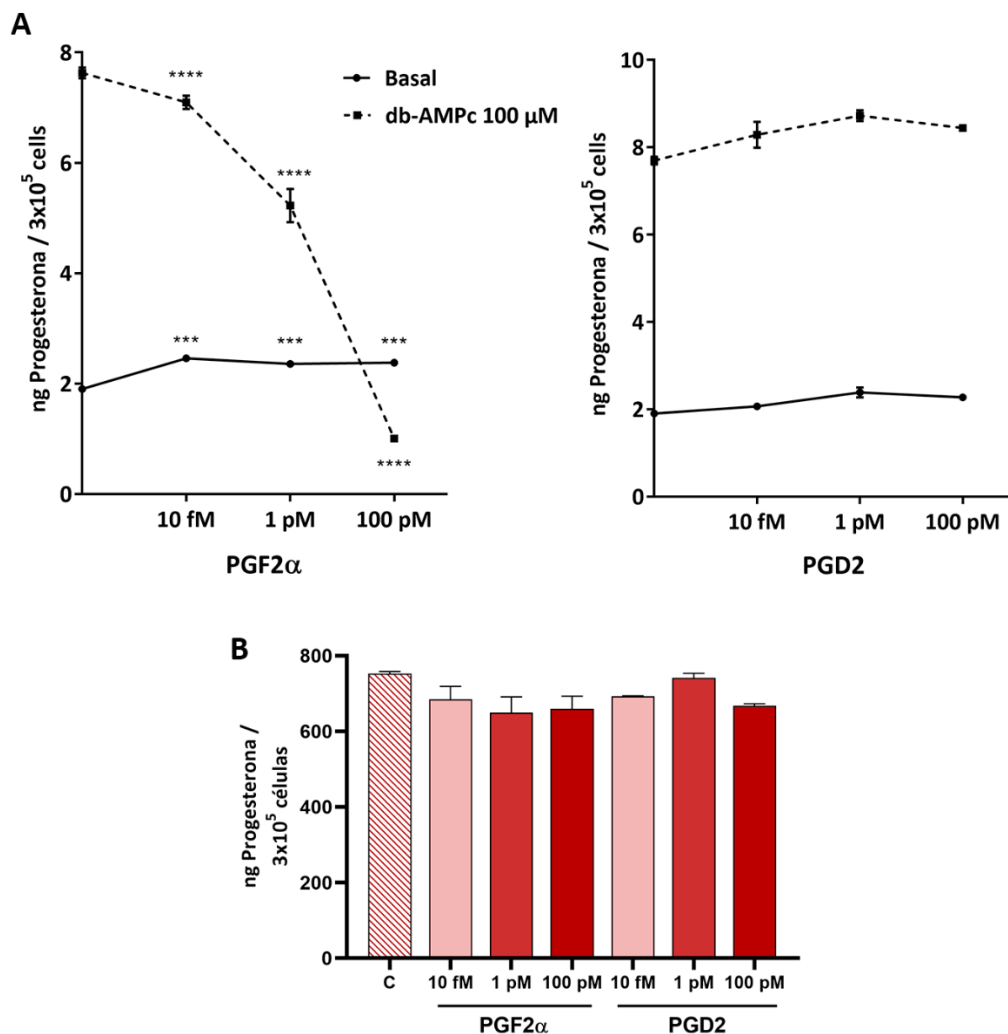


Figura R18. Efectos de las prostaglandinas PGF2 α y PGD2 sobre la esteroidogénesis. (A) Células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con concentraciones crecientes de

PGF2 α o PGD2 (10 fM a 100 pM) en ausencia o presencia de db-AMPC 100 μ M. (B) Células R2C fueron incubadas durante 5 h con concentraciones crecientes de PGF2 α o PGD2 (10 fM a 100 pM). Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Los puntos o barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. ***, $p < 0,001$; **** $p > 0.0001$ vs Control o db-AMPC en ausencia de prostaglandinas.

4. Efecto de COX-1 y COX-2 sobre la proliferación y la viabilidad de células de Leydig

Como siguiente paso en la caracterización de los efectos de las isoenzimas de la COX sobre las funciones de las células de Leydig, se evaluó si la inhibición de COX-1 y COX-2 afecta su función proliferativa y su viabilidad. Las células MA-10 y R2C fueron tratadas durante 24 h con SC-560 1, 10 y 100 nM o meloxicam 0,1, 1 y 10 μ M. La proliferación fue evaluada mediante recuento de células e incorporación de [3 H]-timidina, y la viabilidad mediante la tinción con Azul de Tripán. Tal como se observa en la Figura R19, la inhibición de COX-1 y de COX-2 no afectó la proliferación ni la viabilidad celular.

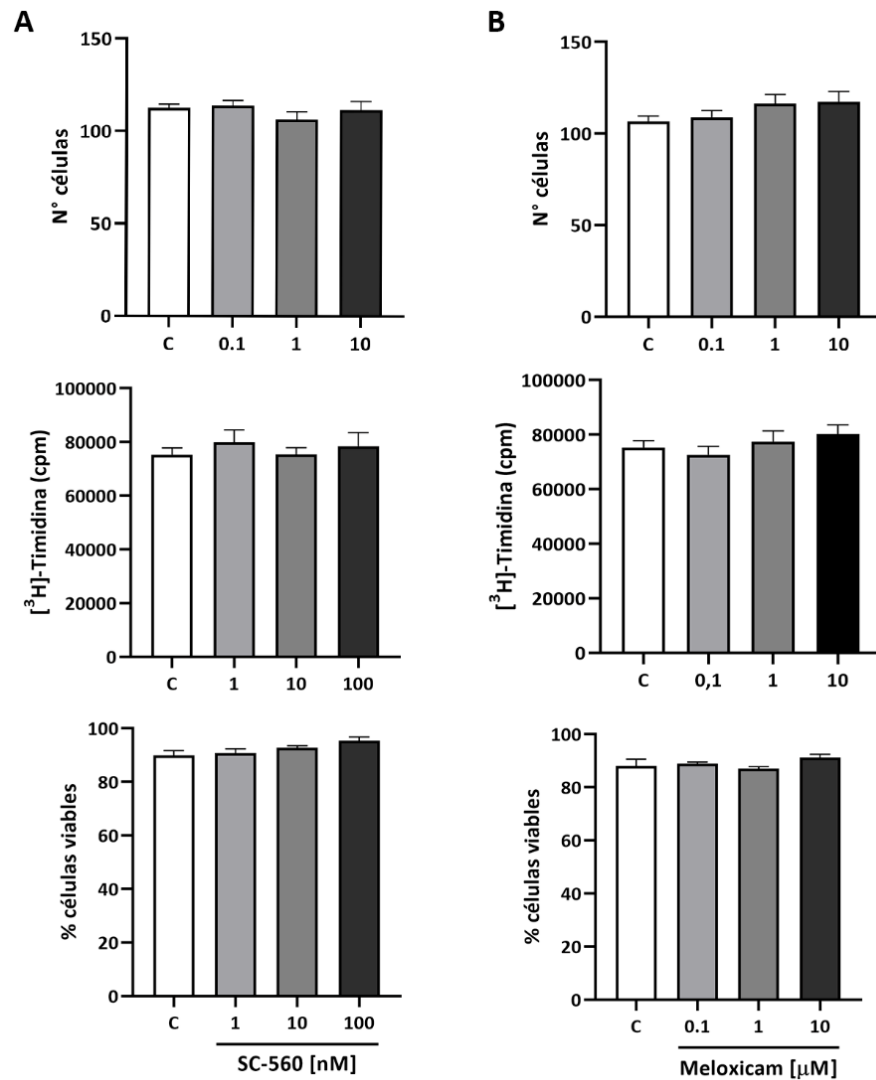


Figura R19. Efecto de la inhibición del COX-1 y COX-2 sobre la proliferación y la viabilidad de células de Leydig. Células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de SC-566 (1 a 100 nM) (A) o meloxicam (0,1 a 10 μM) (B). La proliferación celular se determinó por recuento en cámara de Neubauer y por incorporación de [³H]-timidina, y la viabilidad mediante tinción con el colorante vital Azul de Tripán. Las barras representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado (recuento celular y tinción con Azul de Tripán) u octuplicado (incorporación de [³H]-timidina).

5. Efectos del meloxicam en presencia de hemina

A continuación, se analizaron los efectos de la inhibición de COX-2 en presencia de hemina, inductor de HO-1, en células de Leydig MA-10. En primera instancia, se estudió el efecto del meloxicam sobre los niveles de HO-1. Se trató a las células

durante 5 h con meloxicam 1 y 10 μM en combinación con hemina 5, 10 y 20 μM y en ausencia o presencia de db-AMPc. En ausencia de inducción de la HO-1 por hemina, el tratamiento con meloxicam no afectó sus niveles ni en condiciones basales ni en presencia de db-AMPc. Sin embargo, cuando la HO-1 se encontraba inducida, meloxicam 10 μM aumentó sus niveles por sobre los alcanzados por el tratamiento con hemina tanto en ausencia como en presencia de db-AMPc (Figura R20A).

Por último, se determinaron los niveles de progesterona con el mismo esquema de tratamientos. Tal como se observa en la Figura R20B, el aumento en los niveles de progesterona en presencia de db-AMPc dado por el tratamiento con meloxicam 1 μM fue revertido completamente por hemina. A su vez, la estimulación por meloxicam 10 μM fue revertida parcialmente por hemina.

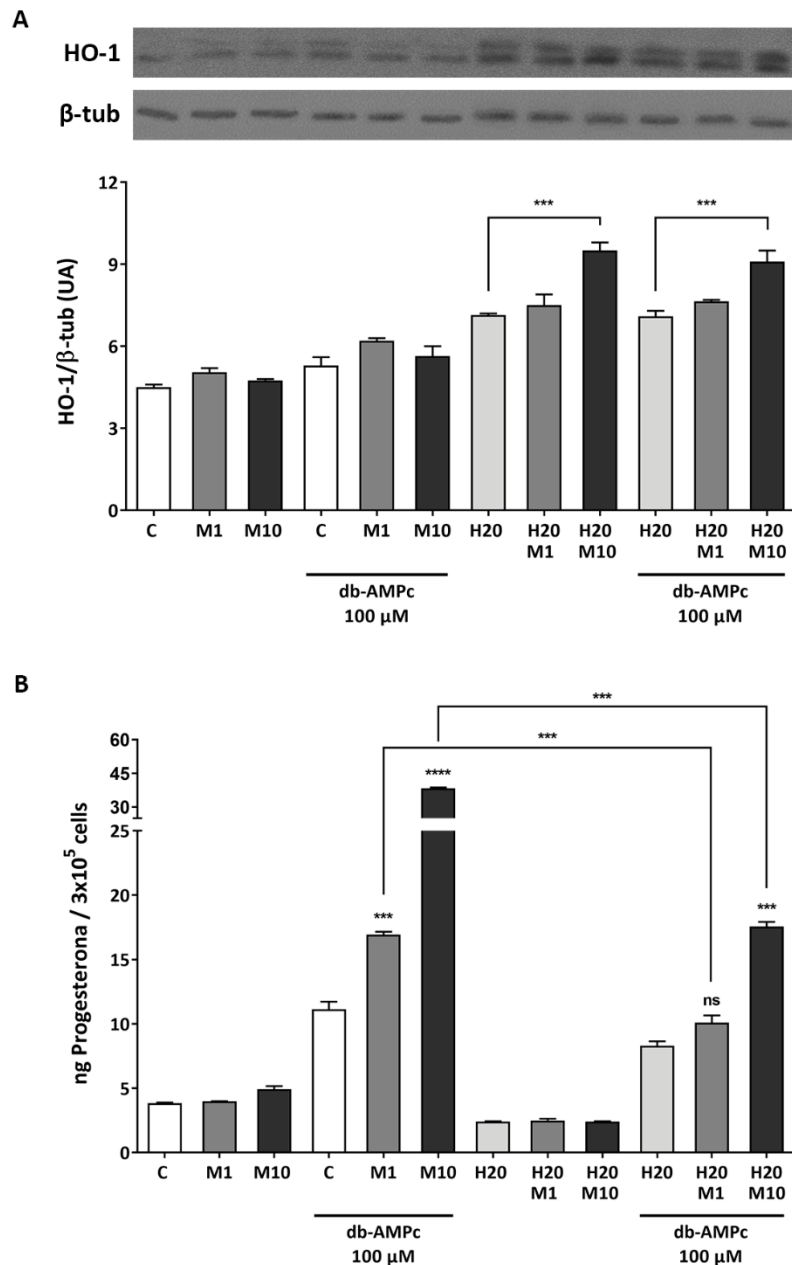


Figura R20. Efecto del meloxicam en presencia de hemina, inductor de HO-1. Células MA-10 fueron preincubadas por media hora con meloxicam (M) 1 y 10 μ M, y luego, se agregó hemina (H) 20 μ M y se continuó la incubación durante 5 h en presencia o ausencia de db-AMPC. (A) Las células fueron lisadas y analizadas mediante Western Blot. Se muestra un inmunoblot representativo. La intensidad de las bandas se expresa en unidades arbitrarias (UA). Los niveles de HO-1 se relativizaron al control de carga β -tubulina. (B) La concentración de progesterona en los sobrenadantes fue determinada mediante RIA. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ vs grupo indicado.

Conclusiones parciales - Capítulo 2

A partir de los resultados obtenidos, se infiere que la COX-2 modula negativamente la esteroidogénesis estimulada por db-AMPC en células de Leydig. En dicho efecto estaría involucrada la PGF2 α , uno de los productos de su acción enzimática. Por otro lado, la inhibición de las isoformas de COX analizadas no afecta la proliferación ni la viabilidad de las células de Leydig. Por último, los resultados obtenidos sugieren una interacción entre las vías de HO-1 y COX-2.

Resultados – Capítulo 3

Una gran variedad de fitoquímicos ha demostrado tener efectos quimioprotectores y anticancerígenos tanto en combinación con drogas quimioterapéuticas o como droga única (Davidson, Zhu and Fang, 2016). La curcumina es el principal curcumioide del rizoma de la planta *Curcuma longa L.*, actualmente utilizado como condimento y también como suplemento dietario debido a sus efectos beneficiosos para la salud (Coates *et al.*, 2010). En las últimas décadas, ha habido un importante aumento en el número de publicaciones relacionadas con este fitoquímico y se le han atribuido efectos terapéuticos en diversas patologías. En particular, desde los años noventa, cuando se reportaron las primeras evidencias sobre el efecto antitumoral de la curcumina, se ha descubierto que tiene efectos en numerosos tipos de tumores.

El último objetivo del presente trabajo consiste en analizar el efecto *in vitro* de la curcumina sobre las funciones esteroideogénica y proliferativa de las células de Leydig, indagando también en su potencial efecto sobre la HO-1 y la COX-2. A su vez, utilizando un modelo *in vivo* de tumores de células de Leydig, se propone evaluar el efecto de la curcumina sobre el crecimiento de dichos tumores.

1. Efecto de la curcumina sobre la esteroidogénesis de células de Leydig

Como primer paso en el estudio *in vitro* del efecto del fitoquímico sobre las funciones de las células de Leydig, se evaluó si la incubación de células MA-10 y R2C con curcumina tiene algún efecto sobre la secreción de progesterona. Para ello, las células MA-10 fueron incubadas con concentraciones crecientes (20 – 80 μM) de curcumina durante 5 y 24 h en ausencia o presencia de db-AMPC 0,5 mM. Se observó un efecto estimulador de la curcumina sobre la esteroidogénesis aguda a todas las concentraciones ensayadas tanto en condiciones basales como en presencia de db-AMPC (Figura R21A). Tras tiempos prolongados de incubación, deja de observarse el efecto estimulador de la curcumina sobre la esteroidogénesis basal y estimulada. En presencia de db-AMPC, la concentración 80 μM muestra incluso un efecto negativo sobre los niveles de progesterona (Figura R21B). Las células R2C fueron incubadas durante 5 h con las mismas concentraciones de curcumina. Se observa que la curcumina a la concentración 40 μM tiene un efecto estimulador sobre la esteroidogénesis (Figura R21C).

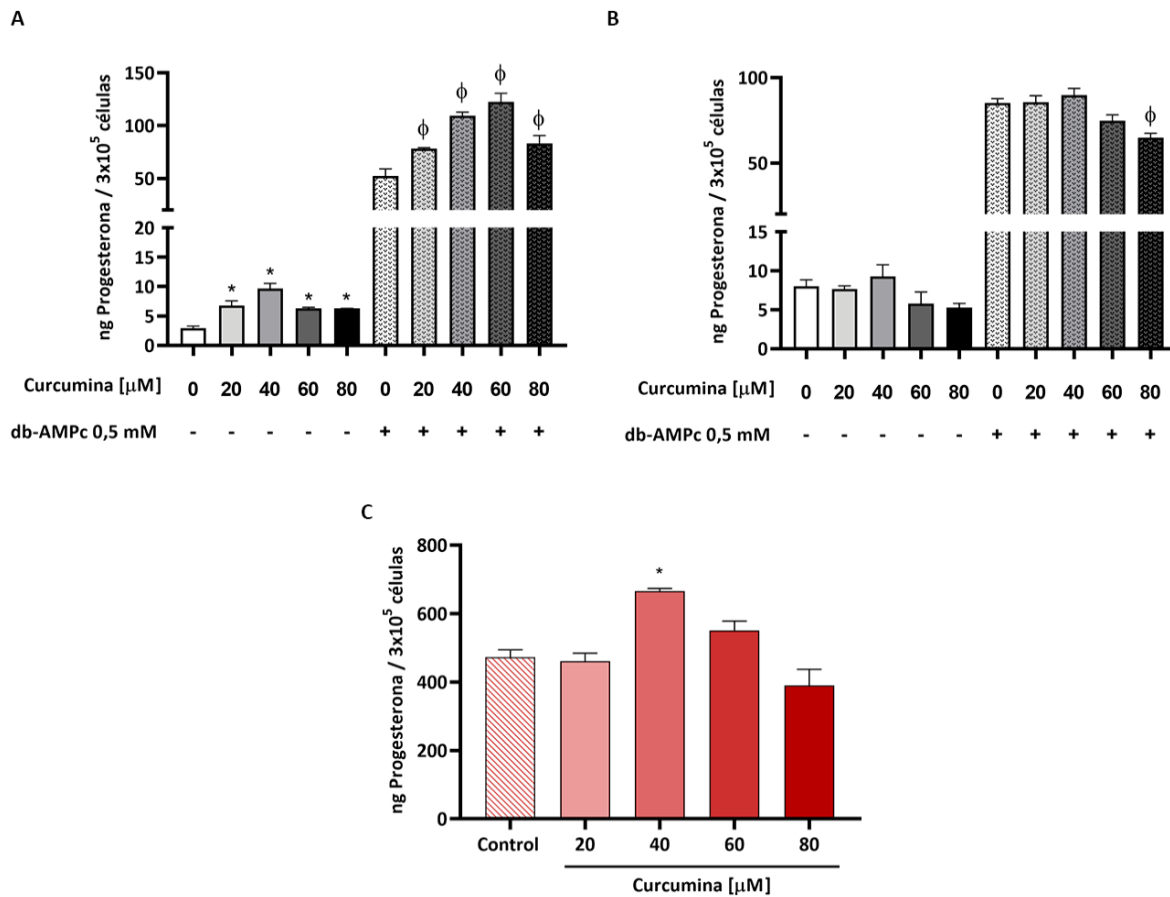


Figura R21. Efecto de la curcumina sobre la esteroidogénesis en células de Leydig MA-10 y R2C. Las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h (A) y 24 h (B) con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 80 μM) en ausencia o presencia de db-AMPc 0,5 mM. (C) Las células R2C fueron incubadas durante 5 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 80 μM). Los niveles de progesterona fueron determinados mediante RIA. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$ vs Control Basal. ϕ , $p < 0,05$ vs Control db-AMPc.

A continuación, se evaluó si el efecto estimulador de la curcumina sobre la esteroidogénesis aguda podría ser explicado por la modulación de la proteína StAR, encargada del transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial, uno de los pasos limitantes en la biosíntesis de hormonas esteroideas. Para tal fin, las células MA-10 fueron tratadas durante 5 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 60 μM) en presencia de db-AMPc. Se observa que la curcumina 40 μM modula positivamente los niveles de ARNm

de StAR en presencia de db-AMPC (Figura R22A). A su vez, en la Figura R22B se observa que el tratamiento con curcumina provocó un aumento en los niveles proteicos de StAR.

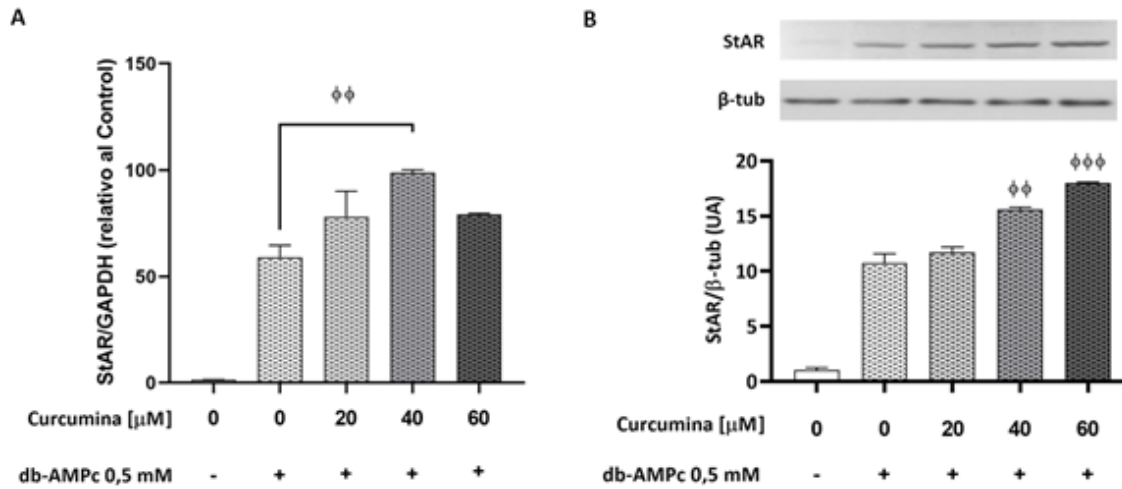


Figura R22. Efecto de la curcumina sobre la expresión y los niveles proteicos de StAR en células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 60 μM) en ausencia o presencia de db-AMPC 0,5 mM. (A) Los niveles de ARNm de StAR fueron evaluados mediante RT-qPCR y se relativizaron a GAPDH. $\phi\phi$, $p < 0,01$. (B) Los niveles proteicos de StAR fueron analizados mediante Western Blot y se relativizaron al control de carga β -tubulina. Se muestra un inmunoblot representativo. La intensidad de las bandas se expresa como unidades arbitrarias (UA). $\phi\phi$, $p < 0,01$; $\phi\phi\phi$, $p < 0,001$ vs db-AMPC. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Habiendo observado que a concentraciones altas de curcumina (80 μM) los efectos sobre la esteroidogénesis aguda son menos marcados, nos propusimos evaluar si la curcumina a estas concentraciones produce cambios en la morfología y la viabilidad celular. En la Figura R23A se pueden observar las fotografías tomadas bajo microscopio óptico de células MA-10 control, tratadas con curcumina 40 μM y con curcumina 80 μM durante 5 h. Se puede observar claramente que, con la concentración más alta de curcumina, y no así con la concentración 40 μM , las células presentan un marcado cambio morfológico, con pérdida de sus prolongaciones y formación de acúmulos. Sin embargo, no se

observaron diferencias significativas en la viabilidad celular a ninguna de las dosis ensayadas luego de 5 h de incubación (Figura R23B).

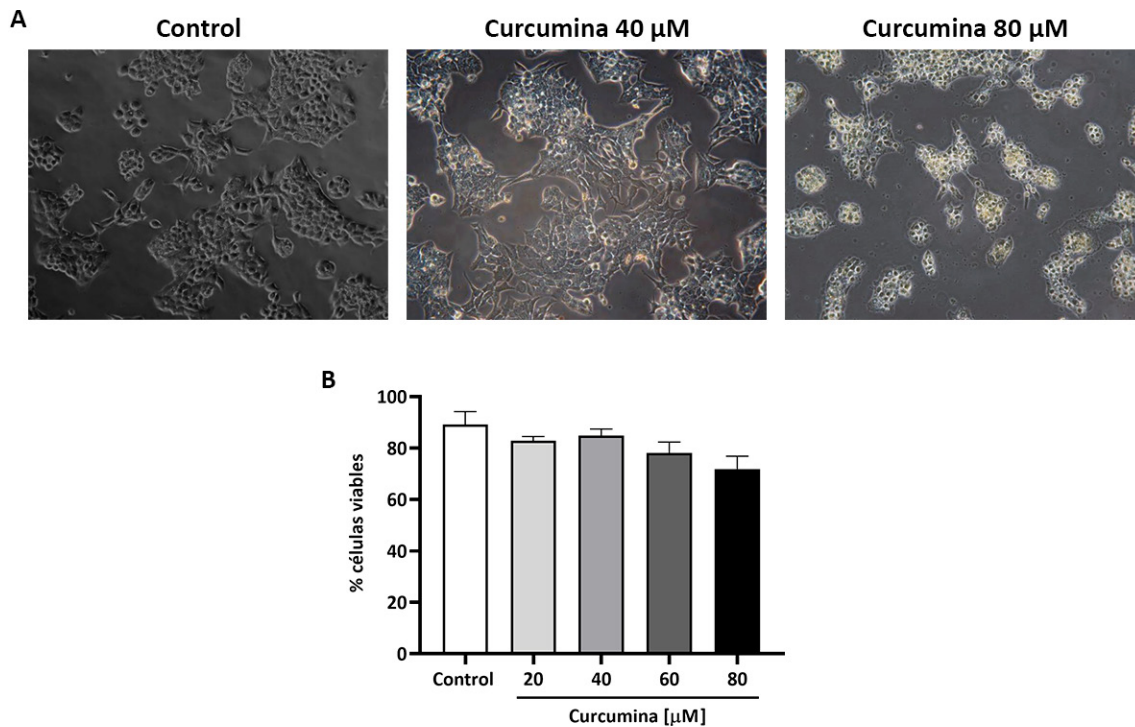


Figura R23. Efecto de la curcumina sobre la viabilidad de células de Leydig a tiempos cortos. (A) Fotografías representativas de células MA-10 incubadas durante 5 h con medio sin suero (Control), curcumina 40 μM o curcumina 80 μM . (B) Las células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 – 80 μM). Finalizada la incubación se determinó el porcentaje de células viables mediante la tinción con el colorante vital Azul de Tripán. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2. Interacción entre la curcumina y HO-1 y COX-2

Considerando que existen vastas evidencias sobre el papel antioxidante y antiinflamatorio de la curcumina en diferentes modelos de estudio, nos propusimos evaluar si la curcumina modula la expresión de las enzimas anteriormente estudiadas e involucradas en dichos procesos, HO-1 y COX-2. Las células MA-10 fueron incubadas con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 80 μM) durante 5 h. Finalizadas las incubaciones se evaluaron los niveles de ambas proteínas mediante Western Blot. Tal como se observa en la Figura R24A,

la curcumina estimuló los niveles proteicos de HO-1 a partir de la concentración 40 μM . También se evaluó el efecto de la curcumina sobre los niveles estimulados de HO-1 en presencia de hemina. Para ello, las células MA-10 fueron incubadas con curcumina 10 o 40 μM en ausencia o presencia de hemina 20 μM . Se observó que la curcumina no aumenta los niveles proteicos de HO-1 más allá de la estimulación dada por hemina (Figura R24B).

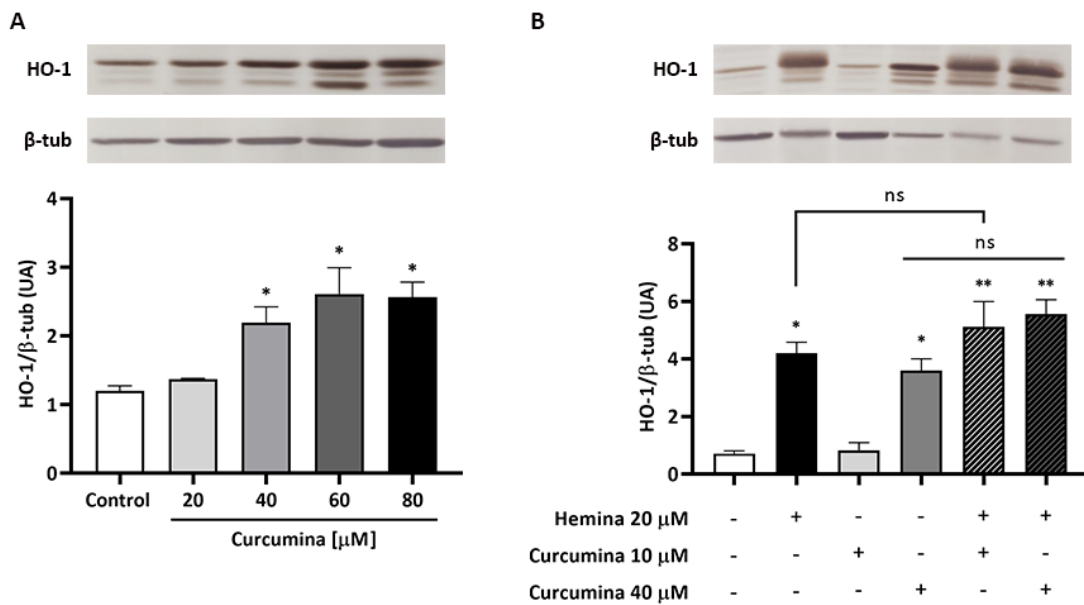


Figura R24. Efecto de la curcumina sobre los niveles proteicos de HO-1. Células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con curcumina (20 - 80 μM) (A) o con curcumina 10 o 40 μM en ausencia o presencia de hemina 20 μM (B). Las células fueron lisadas y analizadas mediante Western Blot. Se muestra un inmunoblot representativo. La intensidad de las bandas se expresa como unidades arbitrarias (UA). Los niveles de HO-1 se relativizaron al control de carga β -tubulina. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ vs Control.

Por otro lado, en la Figura R25 se observa que el tratamiento durante 5 h de células MA-10 con curcumina 20 a 80 μM no afectó significativamente los niveles proteicos de COX-2.

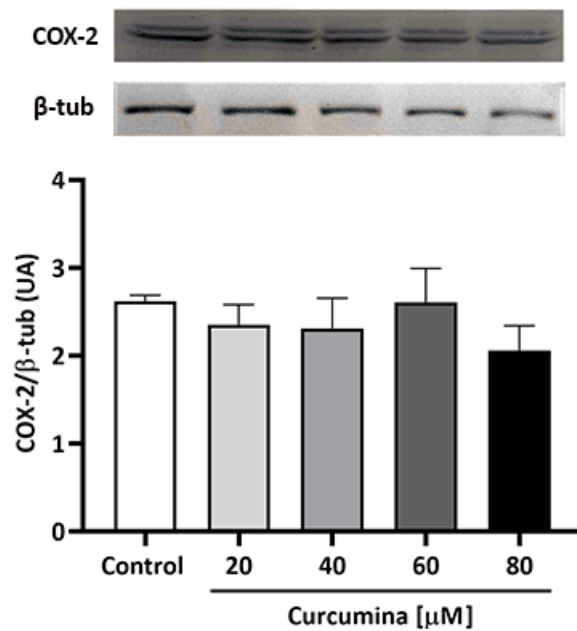


Figura R25. Efecto de la curcumina sobre los niveles proteicos de COX-2. Células MA-10 fueron incubadas durante 5 h con curcumina (20 - 80 μM). Las células fueron lisadas y analizadas mediante Western Blot. Se muestra un inmunoblot representativo. La intensidad de las bandas se expresa como unidades arbitrarias (UA). Los niveles de COX-2 se relativizaron al control de carga β-tubulina. Las barras representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

3. Efecto de la curcumina sobre los niveles de ROS intracelulares

Considerando que la curcumina regula los niveles de HO-1, uno de los principales mediadores de la respuesta antioxidante, evaluamos también su efecto sobre los niveles de ROS intracelulares en células de Leydig. Las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de curcumina (20-80 μM). En la Figura R26A se observa que la curcumina reduce los niveles de ROS a la concentración 40 μM y los aumenta a la concentración 80 μM. A continuación, las células fueron incubadas durante 24 h con las mismas concentraciones de curcumina en presencia de H₂O₂. Se observó que la curcumina a concentraciones bajas (20, 40 y 60 μM) revierte el efecto estimulador del H₂O₂ sobre los ROS intracelulares. La concentración más alta de curcumina no modula los niveles de

ROS con respecto a los niveles observados en células tratadas únicamente con H₂O₂ (Figura R26B).

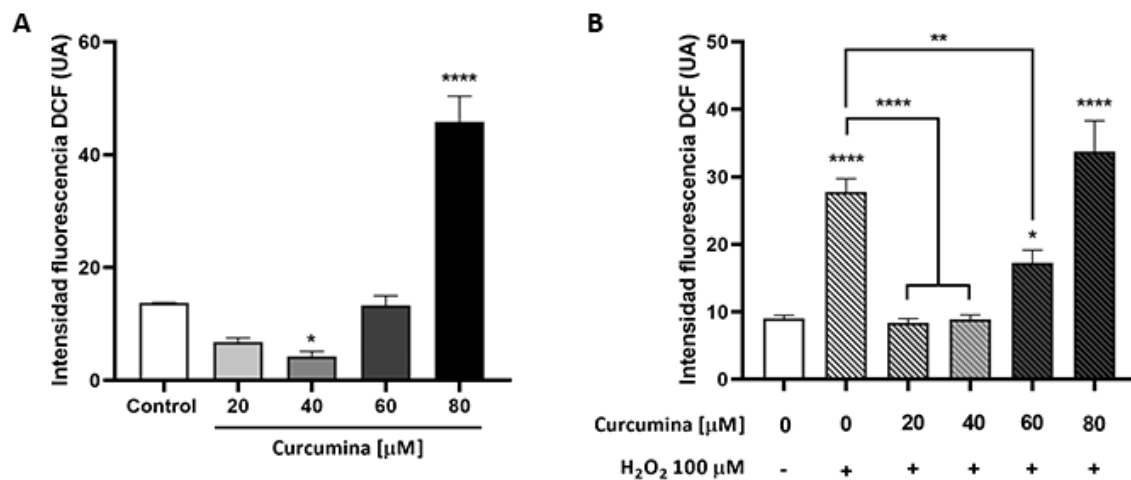


Figura R26. Efecto de la curcumina sobre los niveles de ROS intracelulares en células de Leydig MA-10. Las células fueron incubadas durante 24 h con curcumina 20-80 μM en ausencia (A) o presencia (B) de H₂O₂ 100 μM (control positivo). Luego de la incubación, fueron expuestas al compuesto DCF durante 30 min y se midió la fluorescencia. Se muestra la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) para cada tratamiento. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ vs Control o grupo indicado.

4. Efecto de la curcumina sobre la proliferación de células de Leydig

A continuación, se evaluó el efecto de la curcumina sobre la proliferación de células de Leydig MA-10. Para ello, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de curcumina (20 – 80 μM) durante 24 h y se utilizaron las técnicas de incorporación de [³H]-timidina y el ensayo colorimétrico WST-1 para evaluar la tasa de proliferación para cada tratamiento. Mediante ambos métodos se observó que la curcumina a dosis iguales o mayores a 40 μM inhibe la proliferación celular (Figura R27A y R27B).

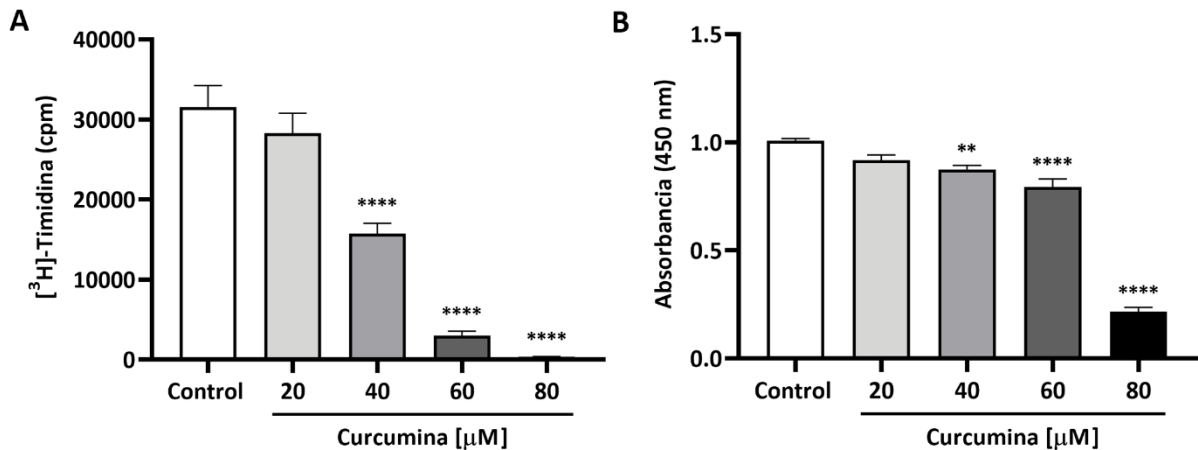


Figura R27. Efecto de la curcumina sobre la proliferación de células de Leydig. Células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 80 μM). La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de incorporación de [^3H]-timidina (A) y WST-1 (B). Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por octuplicado. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ vs Control.

5. Efecto de la curcumina sobre la progresión del ciclo celular

Para determinar si el efecto anti proliferativo de la curcumina sobre las células de Leydig involucra un arresto del ciclo celular, se evaluó la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo mediante tinción con yoduro de propidio y análisis del contenido de ADN por citometría de flujo. Para tal fin, las células MA-10 fueron tratadas durante 24 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 80 μM). Tal como se observa en la Figura R28, el tratamiento con curcumina provocó un aumento significativo en el porcentaje de células en la fase G2/M, con una disminución concomitante en el porcentaje de células en S.

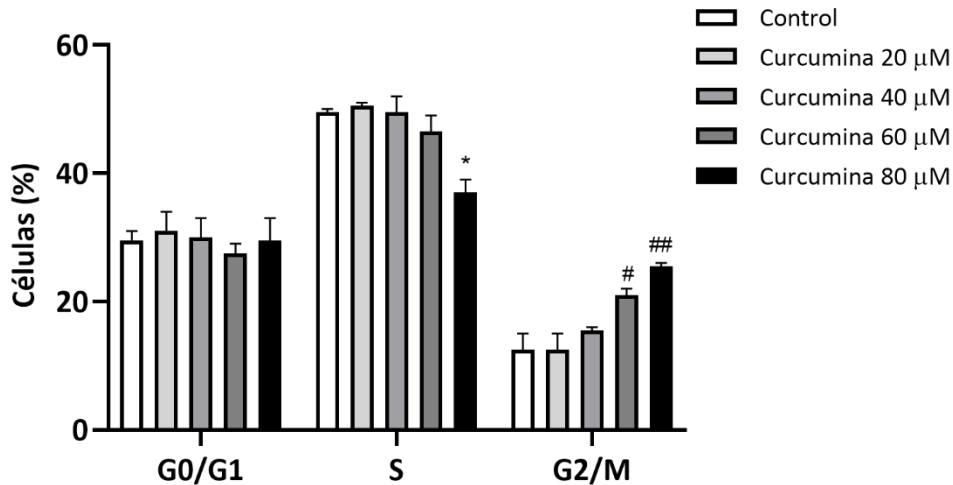


Figura R28. Efecto de la curcumina sobre la progresión del ciclo celular en células de Leydig MA-10. Las células fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 – 80 μ M). Luego de la incubación, fueron fijadas, permeabilizadas, teñidas con ioduro de propidio y analizadas mediante citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células en las fases G0/G1, S y G2/M para cada tratamiento. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$ vs Control Fase S. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$ vs Control Fase G2/M.

Habiendo observado que la curcumina afecta la progresión del ciclo celular en células MA-10, continuamos con la caracterización de dicho efecto analizando los niveles de expresión de las proteínas reguladoras del ciclo p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y ciclina D1 (CCND1) en presencia de curcumina 40 y 60 μ M durante 12 y 24 h. A las 12 h se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de p21^{Cip1} (Figura R29A) y una disminución de ciclina D1 (Figura R29C). Dichos efectos dejan de observarse en células tratadas durante 24 h. No se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de la proteína p27^{Kip1} (Figura R29B).

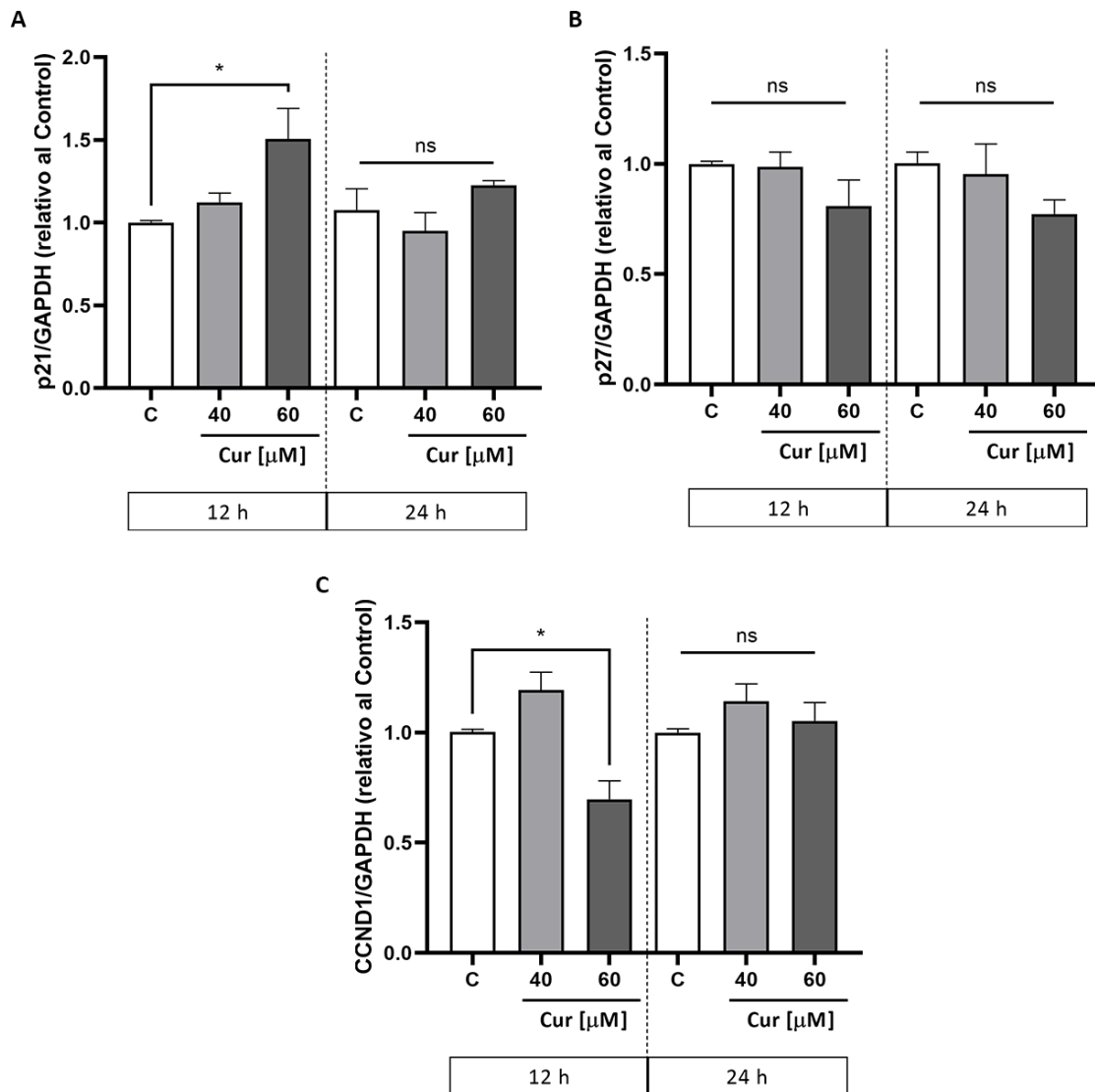


Figura R29. Efecto de la curcumina sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. Las células fueron incubadas durante 12 y 24 h con curcumina 40 y 60 μ M. Los niveles de ARNm de p21^{Cip1} (A), p27^{Kip} (B) y ciclina D1 (CCND1) (C) fueron evaluados mediante RT-qPCR y se relativizaron a GAPDH. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *, $p < 0,05$.

6. Efecto de la curcumina sobre la viabilidad y la apoptosis

A continuación, se analizó si la disminución observada en la capacidad proliferativa de las células estaba relacionada con un efecto sobre la viabilidad celular. Para tal fin, las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 a 80 μ M). Luego, se llevó a cabo el recuento celular tras la tinción con Azul de Tripán. A partir de la concentración 20

μM de curcumina, se observó una disminución en la viabilidad celular (Figura R30).

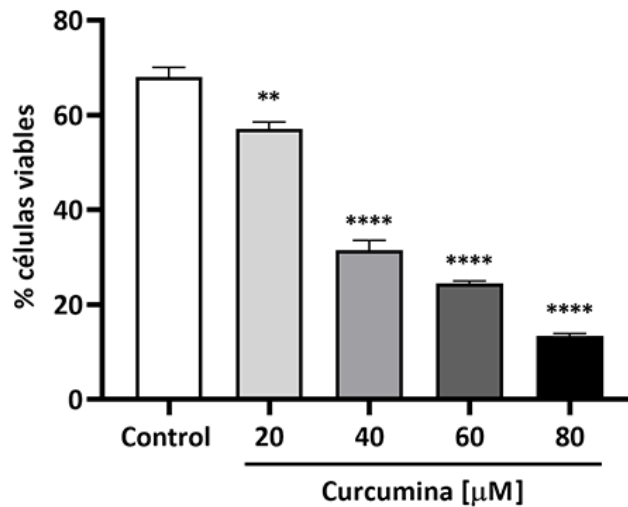


Figura R30. Efecto de la curcumina sobre la viabilidad de células de Leydig a 24 h. Células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con concentraciones crecientes de curcumina (20 – 80 μM) y el porcentaje de células viables fue determinado utilizando el colorante Azul de Tripán. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ vs Control.

Considerando que el efecto negativo de la curcumina sobre la viabilidad de las células MA-10 podría estar asociado a la activación de la vía apoptótica, se evaluó la fragmentación de ADN nuclear como indicador de inducción de apoptosis mediante la técnica TUNEL. Para ello, las células MA-10 fueron incubadas durante 24 h con curcumina 40 y 80 μM . En la Figura R31 puede observarse que la curcumina 80 μM incrementó el porcentaje de células TUNEL positivas.

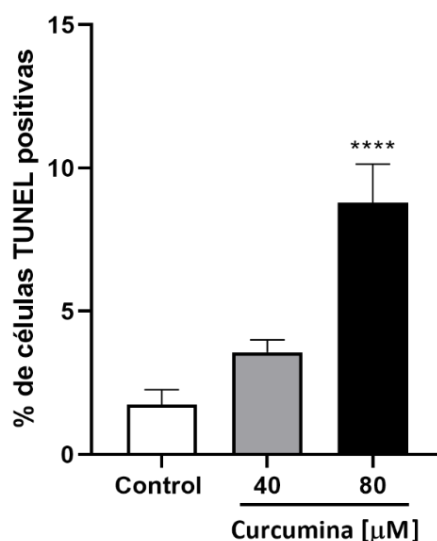


Figura R31. Efecto de la curcumina sobre la apoptosis de células de Leydig MA-10. Las células MA-10 fueron sembradas en cubreobjetos e incubadas durante 24 h en condiciones basales o con curcumina 40 u 80 µM y analizadas mediante el ensayo de TUNEL. Se cuantificaron las células TUNEL positivas para cada tratamiento. Las barras representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. ****, $p < 0,0001$ vs Control.

7. Efecto de la curcumina sobre la capacidad proangiogénica de células de Leydig

Teniendo en cuenta los efectos observados para la curcumina sobre la proliferación celular y su potencial uso como agente antitumoral, continuamos nuestro estudio evaluando su efecto sobre la angiogénesis. La generación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso indispensable para el desarrollo tumoral. La angiogénesis inducida por el tumor es una de las características más estudiadas, dado que la inhibición del suministro sanguíneo va en detrimento del crecimiento tumoral. Anteriormente, nuestro grupo de investigación ha descrito que las células de Leydig R2C secretan factores pro angiogénicos, los cuales inducen la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, estimulando la proliferación de células HUVEC y la producción de vasos en la membrana corioalantoidea de codorniz (Abiuso *et al.*, 2018). Considerando que la angiogénesis es un importante blanco de acción de numerosas terapias, se llevó a cabo un ensayo de angiogénesis *in vivo* para evaluar

si la curcumina tiene algún efecto sobre la liberación de factores proangiogénicos por parte de las células MA-10. Para ello, células MA-10 fueron tratadas durante 24 h en condiciones basales o con curcumina 40 μM . Finalizado el tiempo de incubación, se colectaron los medios condicionados (MC) y los mismos fueron utilizados como tratamiento en la membrana corioalantoidea de huevos de codorniz (ver Figura R32A). Medios condicionados de células R2C de 24 h fueron utilizados como control positivo. Tal como puede observarse en la Figura R32B, la curcumina estimuló la liberación de factores proangiogénicos por parte de las células MA-10. El nivel de vascularización de los discos expuestos a dicho tratamiento es comparable al del control positivo.

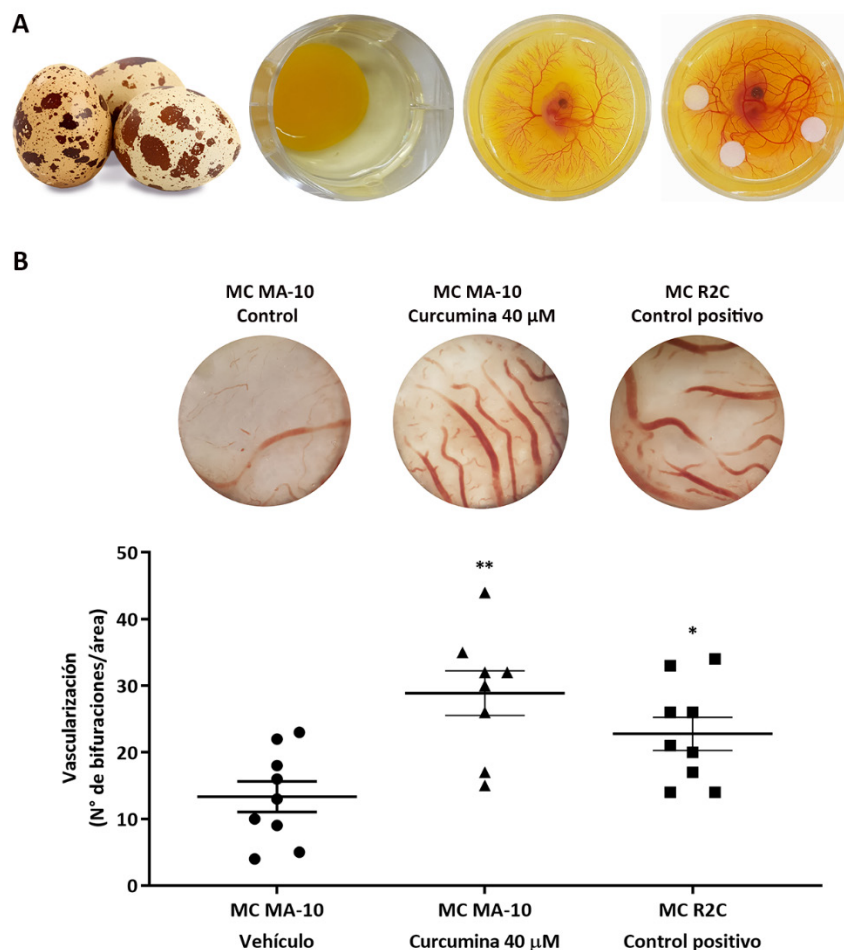


Figura R32. Efecto de la curcumina sobre el potencial angiogénico de células MA-10. (A) De izquierda a derecha: huevos de codorniz, embrión recién exovado en una placa de 6 pocillos, embrión con 7 días de crecimiento y embrión con 10 días de crecimiento luego de la colocación de los discos de papel de filtro embebidos en medios condicionados

(MC). (B) Parte superior: fotografías de discos con vasculatura adherida representativas de cada tratamiento: MC de células MA-10 tratadas con vehículo (DMSO 0,1%), MC de células MA-10 tratados con curcumina 40 μ M y MC de células R2C (control positivo). Parte inferior: Vascularización determinada como número de bifurcaciones por unidad de área. Las barras representan la media \pm EEM (N=9 embriones). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ vs MC MA-10 Control.

8. Efecto de la curcumina *in vivo*: modelo pre-clínico singénico de tumores de células de Leydig

8.1. Efecto de la curcumina sobre el estado de salud general de los ratones

Si bien la curcumina mostró un efecto positivo sobre la capacidad angiogénica de células tumorales MA-10, su marcado efecto inhibitorio sobre la proliferación *in vitro*, acompañado por el arresto del ciclo celular, plantea la posibilidad de que pueda tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de tumores de células de Leydig. Para responder dicha pregunta, se utilizó un modelo murino singénico que consistió en la inyección subcutánea de células MA-10 en ambos flancos de ratones CB6F1 (n=6). Una vez establecidos los tumores (50 mm³), se comenzó el esquema de tratamientos, el cual consistió en inyecciones intraperitoneales 3 veces por semana durante 15 días del vehículo o curcumina 20 mg/kg. Finalizados los tratamientos, los ratones fueron sacrificados (ver esquema de tratamientos en la Figura M2A de Materiales y Métodos).

Como primera instancia en la evaluación de la aplicabilidad del tratamiento con curcumina, se analizaron parámetros relacionados con el estado de salud general de los animales para descartar que el mismo tuviera efectos adversos. Por un lado, los ratones fueron pesados al comienzo del protocolo de tratamientos y a punto final. No se observaron diferencias significativas entre el peso inicial y final en ninguno de los dos grupos ni entre los pesos iniciales o finales entre grupos (Figura R33A). Tampoco se observaron diferencias significativas en los índices hepato-somático (Figura R33B) y bazo-somático (Figura R33C) entre el grupo

tratado con vehículo y el grupo tratado con curcumina. En la Figura R33D se muestran fotografías representativas de cortes histológicos del hígado en las cuales se puede observar que la arquitectura histológica hepática se encuentra conservada en ambos grupos.

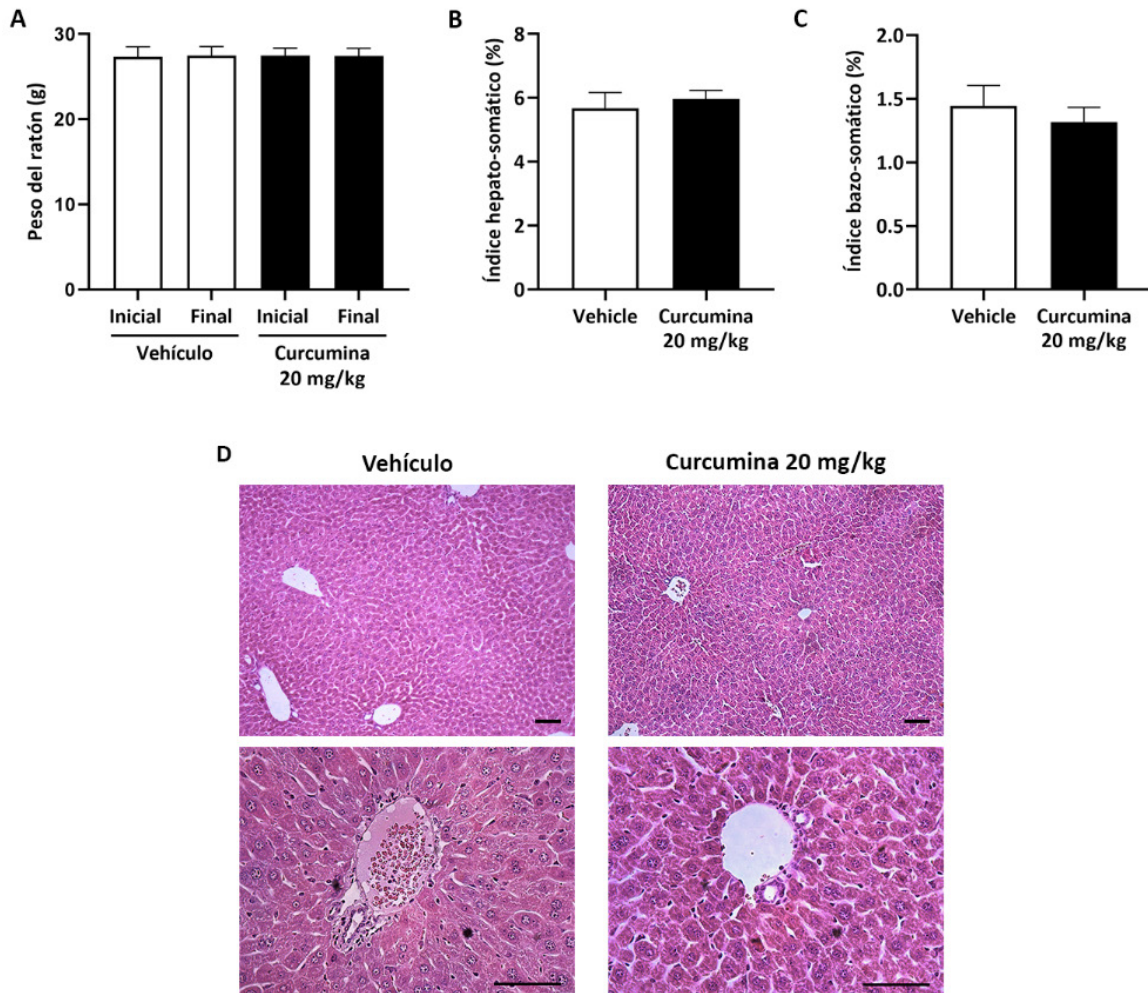


Figura R33. Efecto del tratamiento con curcumina sobre el estado de salud general de ratones CB6F1. Tratamiento intraperitoneal con curcumina 20 mg/kg o vehículo (DMSO 10% en aceite de maíz) 3 veces por semana durante 15 días a ratones CB6F1 con tumores generados con células MA-10. (A) Peso del ratón en el día de inicio de los tratamientos (Inicial) y a punto final (Final). (B) Índice hepato-somático. (C) Índice bazo-somático. Las barras representan la media \pm EEM. (D) Fotografías representativas de cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina-eosina. Las barras de escala representan 50 μ m.

Para evaluar el impacto de los tratamientos en la gónada, se pesaron los testículos para calcular el índice gónado-somático y se midió la altura del epitelio

germinal. No se encontraron diferencias significativas entre grupos para ninguno de los dos parámetros (Figura R34A y R34B). Para profundizar este análisis, se llevó a cabo una evaluación de la histología testicular. La arquitectura testicular y la proporción de espacio intersticial no presentaron alteraciones detectables entre tratamientos. En la Figura R34C se muestran fotografías representativas.

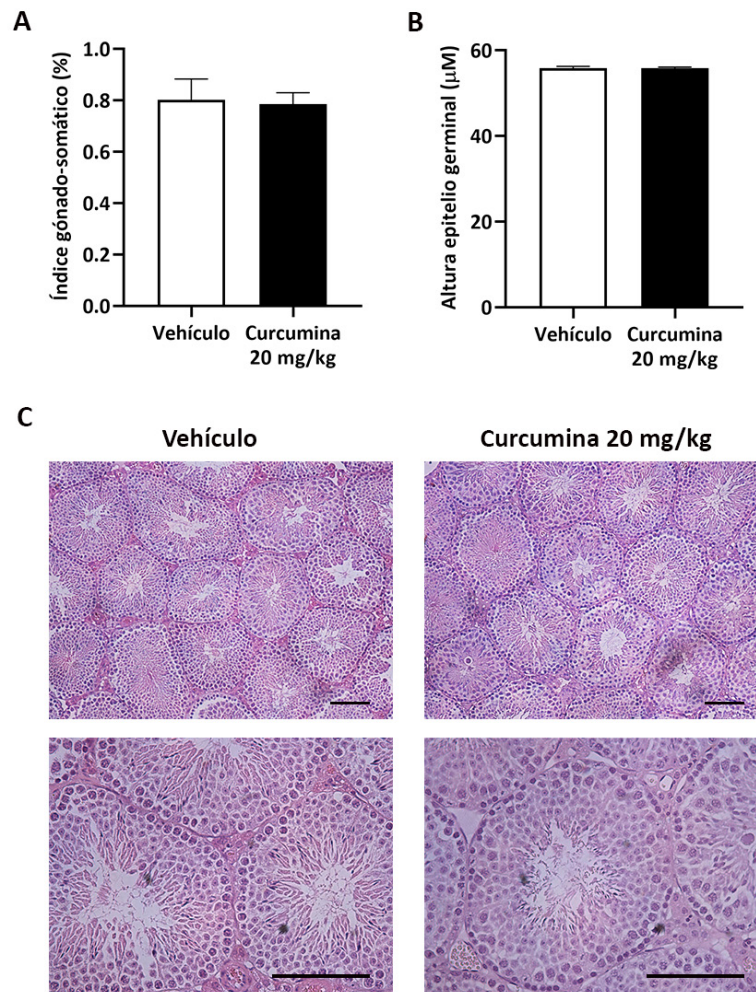


Figura R34. Efecto de la curcumina sobre la integridad de los testículos de ratones CB6F1. Índice gónado-somático (A) y altura del epitelio germinal (B). Las barras representan la media \pm EEM. (C) Cortes histológicos de testículos de ratones tratados con vehículo (DMSO 10% en aceite de maíz) o curcumina 20 mg/kg 3 veces por semana durante 15 días. Las barras de escala representan 100 μ m.

8.2. Efecto de la curcumina sobre el crecimiento de tumores de células de Leydig

Finalmente, se analizó el efecto del tratamiento con curcumina sobre el crecimiento tumoral. En la Figura R35 se muestra el aspecto histológico general de

los tumores de células de Leydig MA-10. Se presentan fotografías representativas de los tumores para cada tratamiento (Figura R35A y R35B). En términos generales, la histología de los tumores de células de Leydig MA-10 muestra un elevado número de mitosis por campo y mitosis atípicas. A su vez, los tumores presentan un alto porcentaje de zonas necróticas (Figura R35C). Dichas características son consideradas signos de malignidad. La Figura R36A muestra que la curva de crecimiento tumoral obtenida en función de los días de tratamiento para los animales tratados con curcumina se ubicó por debajo de la correspondiente a los individuos tratados con vehículo. Específicamente, se observaron diferencias significativas a partir del día 9 de tratamiento. Al analizar el tiempo de duplicación tumoral para el tratamiento con vehículo, el mismo fue de 4,750 días, mientras que para el grupo tratado con curcumina se observó un aumento a 5,332 días (Tabla 2). Coincidentemente, el área bajo la curva para este tratamiento fue significativamente menor (Figura R36B), así como también el peso tumoral a punto final (Figura R36C). En línea con la reducción del tamaño tumoral, se observó una reducción en los niveles de progesterona plasmática (Figura R37A). Cabe aclarar que si se relativizan los niveles de progesterona al peso de los tumores de cada ratón dejan de observarse dichas diferencias. Por último, no se observaron diferencias significativas entre grupos en el porcentaje de células TUNEL positivas (Figura R37B) ni en los niveles de expresión de VEGF, proteína reguladora de la angiogénesis (Figura R37C).

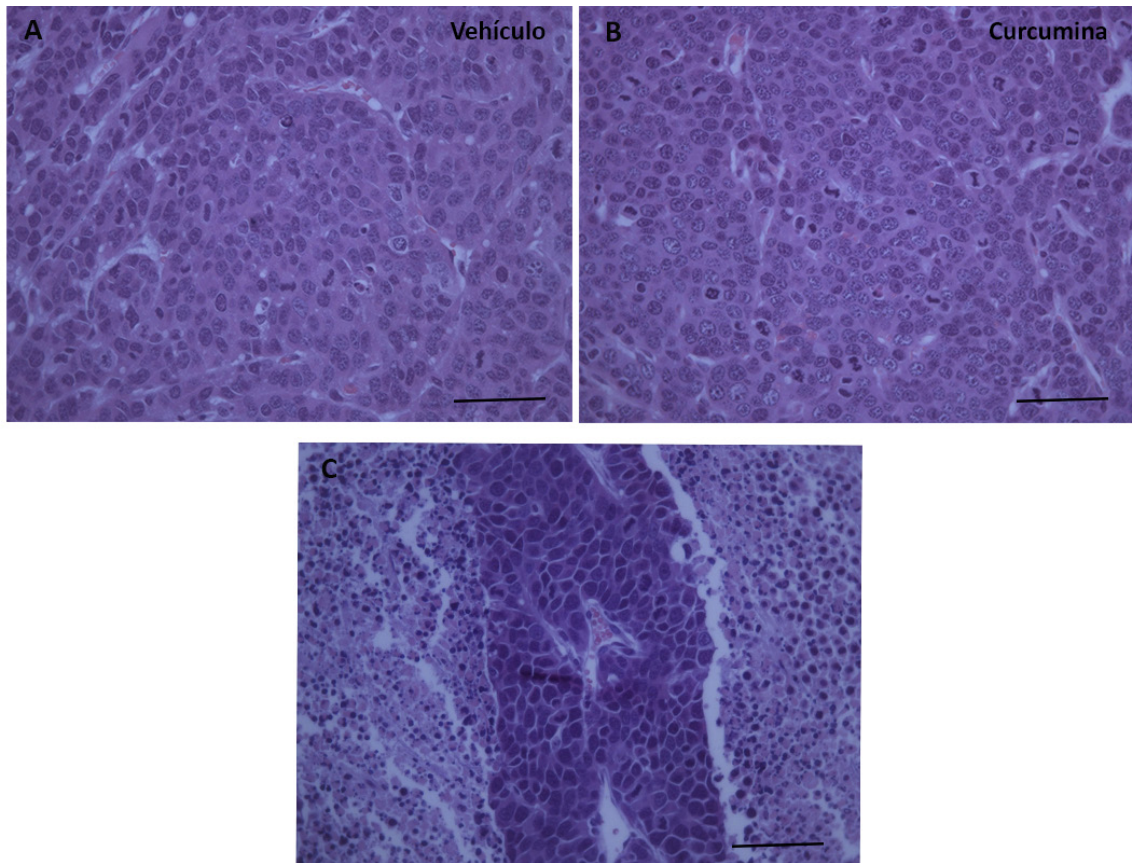


Figura R35. Aspecto histológico general de los tumores de células de Leydig MA-10. Fotos representativas de tumores de animales tratados con vehículo (A) o curcumina 20 mg/kg (B). (C) Detalle dos zonas necróticas tumorales con una zona sin necrosis central. Las barras de escala representan 50 μ m.

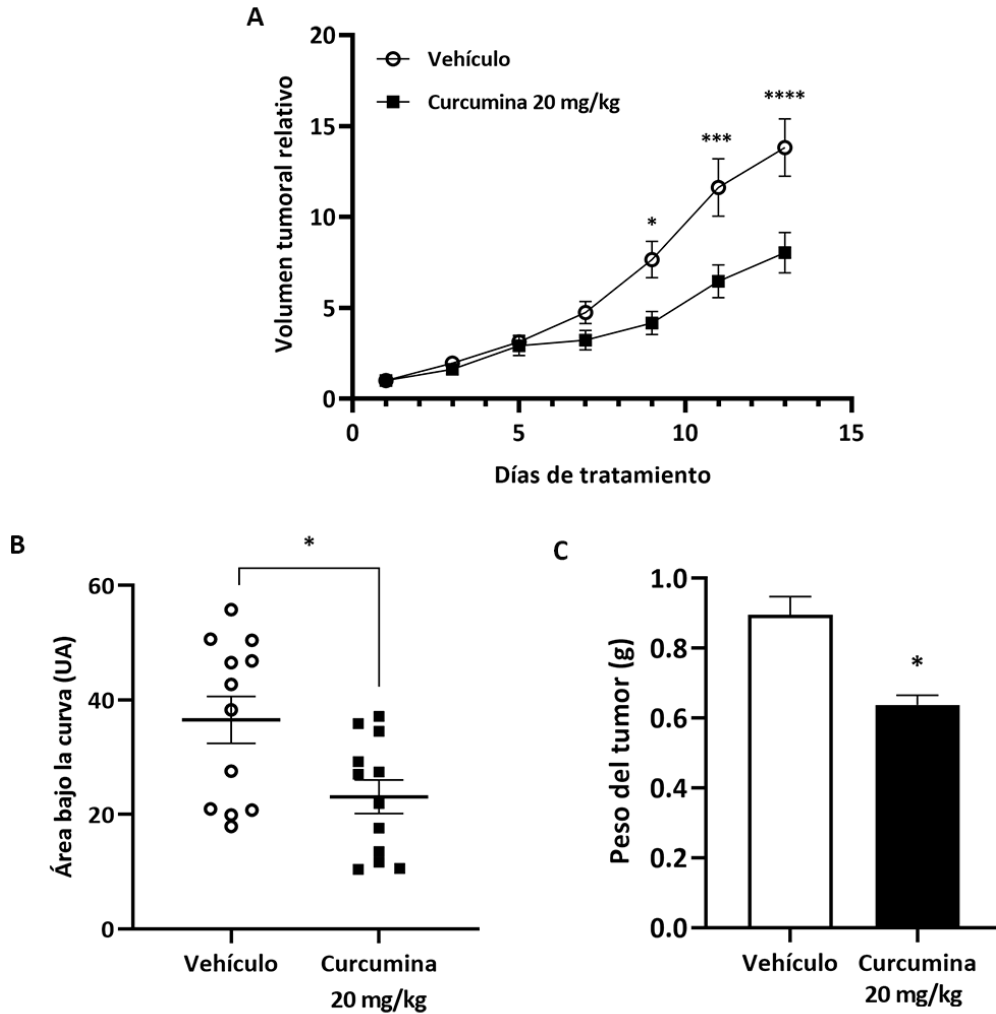


Figura R36. Efecto de la curcumina sobre el crecimiento de tumores de células de Leydig en un modelo murino singénico. Los tumores fueron generados mediante la inyección subcutánea de células MA-10. Los ratones fueron asignados a dos grupos (n=6): curcumina 20 mg/kg o vehículo (DMSO 10% en aceite de maíz). Tratamientos intraperitoneales 3 veces por semana durante 15 días. (A) Curvas de crecimiento tumoral en función de los días de tratamiento: los valores de volumen tumoral se relativizaron al volumen inicial de cada tumor. (B) Área bajo las curvas de crecimiento tumoral. (C) Peso tumoral a punto final. Las barras representan la media \pm EEM. * $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ vs Vehículo.

Tabla 2. Tiempo de duplicación para cada tratamiento: vehículo (DMSO 10% en aceite de maíz) y curcumina 20 mg/kg.

	VEHÍCULO	CURCUMINA
TIEMPO DE DUPLICACIÓN (DÍAS)	4,750	5,332
INTERVALO DE CONFIANZA 95%	3,899 – 6,076	4,296 – 7,028

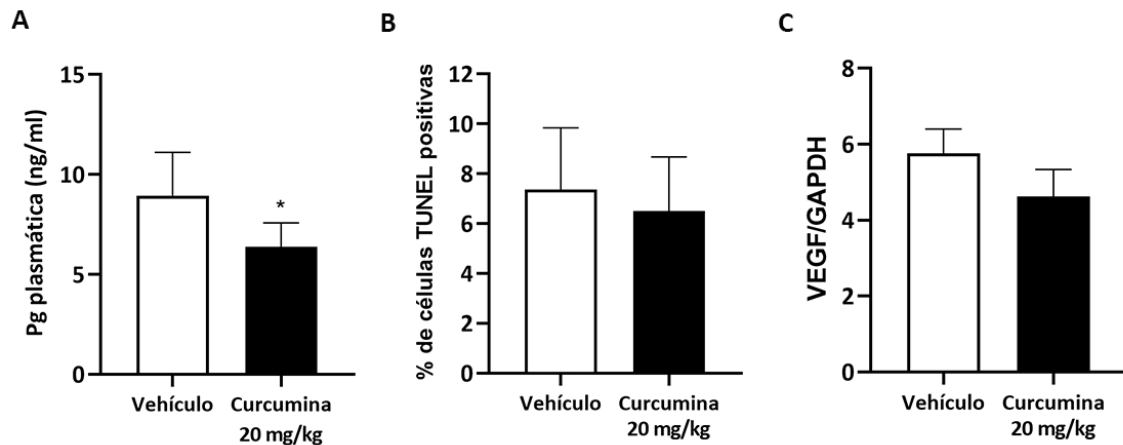


Figura R37. Efecto de la curcumina sobre los niveles de progesterona plasmática, apoptosis en el tumor y expresión de VEGF. (A) Niveles de progesterona plasmática a punto final. (B) Secciones de tumores fueron sometidas a la técnica de TUNEL y se obtuvo el porcentaje de células positivas. (C) Niveles de ARNm de VEGF fueron evaluados mediante RT-qPCR en porciones de tumores y se relativizaron a GAPDH. Las barras representan la media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs Vehículo.

Conclusiones parciales – Capítulo 3

A partir de los resultados *in vitro* obtenidos en este capítulo se puede concluir que la curcumina tiene un efecto estimulador sobre la esteroidogénesis aguda basal y estimulada por db-AMPC en células de Leydig. La curcumina inhibe la proliferación y dicho efecto podría estar mediado por el arresto en G2/M mediante la modulación de reguladores de la progresión del ciclo celular. A su vez, en las condiciones ensayadas, se observó un efecto estimulador sobre la capacidad proangiogénica de células MA-10. En cuanto a los ensayos *in vivo*, el fitoquímico mostró un marcado efecto antitumoral en el modelo singénico de tumores de células de Leydig, sin afectar el estado de salud general de los ratones ni la integridad testicular.

Discusión

El papel de las células de Leydig en el organismo es fundamental dado que los andrógenos que sintetizan son esenciales tanto para una correcta función endocrina y reproductiva, como para una adecuada señalización hacia las células dependientes de dichas hormonas. Si bien el control neuroendocrino por la hormona luteinizante tiene un rol central en la regulación de las funciones de las células de Leydig, aquellos factores de producción local presentes en el microambiente intersticial también pueden regular su funcionalidad. A este respecto, y teniendo en cuenta el efecto regulatorio de los esteroides sexuales sobre la función reproductiva, existen numerosos trabajos de revisión actuales que llaman la atención sobre el progresivo empeoramiento de los parámetros seminales en las últimas décadas (Leisegang & Dutta, 2021; Mann *et al.*, 2020; Sansone *et al.*, 2018, entre otros). Los llamados factores ambientales modificables, tales como la dieta, el sedentarismo, el estrés, el consumo de alcohol, tabaco y otras drogas de abuso, y la exposición a moléculas tóxicas, incluyendo disruptores endocrinos, emergen como principales factores etiológicos. Al indagar sobre los mecanismos que subyacen en este preocupante fenómeno, no solamente deben observarse los efectos directos sobre la población celular germinal, sino que también deben considerarse las desregulaciones del sistema de control endocrino que pueden tener un marcado impacto sobre la función reproductiva. La gran mayoría de los estresores ambientales mencionados han sido asociados con desbalances en el estado oxidativo y/o inflamatorio celular. A su vez, existe una interrelación bidireccional entre el estrés oxidativo y la inflamación: se ha descrito que los mecanismos moleculares antioxidantes actúan como disparadores de aquellos

involucrados en la respuesta inflamatoria, y viceversa (Chatterjee, 2016). En los dos primeros capítulos del presente trabajo, se planteó como objetivo el estudio de los efectos de dos proteínas claves en la respuesta antioxidante e inflamatoria, la hemo oxigenasa-1 (HO-1) y las ciclooxigenasas (COX), respectivamente, sobre la función de las células de Leydig.

Sumando a la relevancia de dichos objetivos, cabe destacar que la HO-1 y las COX han sido propuestas en estudios preclínicos como efectores moleculares tanto en la patogénesis como en los mecanismos de protección contra ciertas enfermedades. Como consecuencia, se ha postulado que la modulación de la expresión de estas proteínas podría mejorar la evolución clínica de los pacientes. En efecto, se han llevado a cabo estudios clínicos en los que se evaluó el efecto de la inducción de la HO-1 con hemina o derivados de la hemina sobre condiciones tales como el daño por isquemia-reperfusión (Universidad de Edimburgo, identificador NCT01430156; Universidad Médica de Viena, identificador NCT02314780) y la gastroparesia diabética (Mayo Clinic, identificador NCT01206582). Asimismo, existe una formulación comercial de hemina (Panhematin®) que ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la porfiria aguda intermitente. En lo que respecta a las ciclooxigenasas, debe considerarse, por un lado, la masiva utilización de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que bloquean de manera selectiva o no selectiva las enzimas COX. A su vez, en vista de los múltiples efectos de la COX-2 sobre la promoción de la carcinogénesis (Hashemi Goradel *et al.*, 2019), se han diseñado numerosos estudios clínicos, muchos de los cuales ya han sido completados, que buscan probar los efectos beneficiosos de los inhibidores selectivos de la COX-2 en diferentes tipos de cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón: NCT00046839, cáncer de próstata: NCT00073970, cáncer de mama: NCT00400374, entre otros). También se está

evaluando la eficacia de estos inhibidores en otras afecciones como el asma, el dolor y la hipertensión. La exposición sistémica a cualquiera de estos agentes que modulan la expresión de la HO-1 o las COX podrían tener un impacto sobre las células endocrinas y, como consecuencia, sobre las poblaciones celulares dependientes de la regulación endocrina. Por todo lo expuesto, conocer los posibles efectos de la inducción de la hemo oxigenasa y/o de la actividad de las ciclooxigenasas sobre las funciones de las células de Leydig permitirá estimar si aquellos fármacos que modulan la actividad o expresión de estas proteínas podrían tener algún impacto sobre la función endocrina y, a su vez, la función reproductiva.

Un desbalance del estado oxidativo celular, que usualmente implica un aumento en la cantidad de ROS, puede dañar biomoléculas como el ADN y las proteínas, con lo cual han surgido adaptaciones celulares que trabajan en pos del rápido restablecimiento del balance oxidativo. Como se ha mencionado, este sistema de defensa involucra al factor de transcripción Nrf2, entre cuyos genes blanco se encuentra el de la HO-1, la isoforma inducible del sistema hemo oxigenasa. Esta enzima citoprotectora cataliza el paso limitante en la degradación del hemo, generando cantidades equimolares de iones hierro, biliverdina y CO. Todos estos productos están involucrados directa o indirectamente en la protección contra el estrés oxidativo (Loboda *et al.*, 2016). Si bien en su rol clásico antioxidante la HO-1 es clasificada como una de las principales proteínas citoprotectoras, en los últimos años se ha descrito la inducción de HO-1 como un “arma de doble filo” o como un “mal necesario”. Esto se debe a que, si bien se ha develado que su inducción en tejidos como el cerebro, el corazón, los riñones y el hígado tiene beneficiosos efectos antioxidantes y antiinflamatorios, también se ha demostrado que favorece la progresión de enfermedades como el cáncer y algunas

neuropatías. Llamativamente, se le ha atribuido un efecto tumorigénico en algunos tipos de cáncer y antitumoral en otros, actuando diferentemente sobre procesos como la angiogénesis, invasión y metástasis (Waza *et al.*, 2018). Según reportes recientes, este efecto dual podría estar relacionado, entre otros factores, con la localización subcelular diferencial de la HO-1 en diferentes tejidos o tipos celulares. La HO-1 se encuentra anclada en la membrana del retículo endoplasmático liso a través de un único paso transmembrana en su extremo carboxilo terminal, y el resto de la proteína es citoplasmática. Se descubrió que la HO-1 es susceptible a proteólisis (Yoshida, Ishikawa and Sato, 1991) y que existe una isoforma nuclear de la HO-1 que carece de su extremo carboxilo terminal, posee baja actividad catalítica y activa factores de transcripción relacionados a la respuesta oxidativa (Lin *et al.*, 2007), incluso estabilizando Nrf2 e incrementando su propia expresión (Biswas *et al.*, 2014). Se ha detectado que existe una asociación entre la expresión de la isoforma nuclear de HO-1 y el desarrollo de tumores malignos en el páncreas. En este trabajo también se mostró la inducción de la translocación hacia el núcleo por el tratamiento con hemina en dos líneas celulares de cáncer de próstata (Sacca *et al.*, 2007). Sumando a esta información, se reportó que la sobreexpresión de la isoforma nuclear de HO-1 promueve la proliferación, invasión y migración de células tumorales *in vitro* e *in vivo*, y que estos efectos no dependen de la actividad enzimática de la proteína (Hsu *et al.*, 2015). La presencia de la isoforma nuclear se ha asociado con efectos protumorales en la mayoría de los estudios realizados hasta el momento. Incluso, se ha propuesto a la HO-1 nuclear como marcador para diagnóstico en la práctica clínica (Chau, 2015; Mascaró *et al.*, 2021).

En la línea de células de Leydig murina MA-10, se ha demostrado la presencia de la HO-1 y su inducción por hemina (Piotrkowski *et al.*, 2009). A su vez, en

células de rata de Leydig normales, se ha descrito la inducción de la HO-1 por estresores como la hipertermia (Ewing and Maines, 1995) y los metales pesados (Ozawa *et al.*, 2002). Por lo expuesto, nos propusimos en primer lugar evaluar la distribución subcelular de la isoforma inducible HO-1 en las líneas de células de Leydig MA-10 y R2C en presencia y ausencia del inductor hemina. Observamos que ambos tipos celulares presentan marca positiva en el citoplasma y en el núcleo, teniendo las MA-10 similares niveles en ambos compartimentos, y las R2C mayores niveles de HO-1 en el núcleo que en el citoplasma. En presencia de hemina, en ambos tipos celulares se observan mayores niveles citoplasmáticos que nucleares. En función de la información previamente expuesta, se podría especular que la presencia nuclear de la HO-1 en ambas líneas celulares se correlaciona con su capacidad tumorigénica.

Una vez estudiada su localización subcelular, evaluamos el efecto de la inducción de HO-1 sobre la esteroidogénesis. En el presente trabajo, mostramos que la hemina tiene un efecto negativo sobre la esteroidogénesis tanto en la línea celular MA-10, como en la R2C. Estos resultados están en concordancia con un trabajo previo del grupo en el cual se observó que la incubación de células de Leydig normales de rata y de células MA-10 con hemina inhibe reversiblemente la esteroidogénesis basal y estimulada por hCG tras una exposición aguda (Piotrkowski *et al.*, 2009). A su vez, comprobamos en la línea MA-10 que dicho efecto es revertido significativamente por el inhibidor selectivo de la HO-1, zinc protoporfirina-9 (ZnPPIX). Por otro lado, evidenciamos que, tras exposiciones prolongadas a hemina, los niveles de progesterona se reducen, y dicho efecto se ve revertido si se retira la hemina del medio de cultivo. Para continuar con la caracterización de este efecto, se indagó sobre los mecanismos moleculares involucrados en esta inhibición de la esteroidogénesis por parte de la hemina. En

los últimos años se ha reunido creciente evidencia acerca del rol del CO, uno de los productos de la reacción catalizada por la HO-1, como “gasotransmisor” involucrado en la modulación de diversas vías de señalización (Piantadosi, 2008; Rochette *et al.*, 2013; Kolluru *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha reportado que el CO puede formar complejos con metaloproteínas, incluyendo a los citocromos, lo cual lleva a la inhibición reversible de su actividad (Estabrook, Franklin and Hildebrandt, 1970). Por otro lado, resulta interesante considerar que el CO y el óxido nítrico (NO), dadas sus similitudes estructurales, comparten *targets* biológicos (Chung *et al.*, 2008). Resultados previos del grupo han demostrado que el NO inhibe la esteroidogénesis de células de Leydig por unión reversible al citocromo P450_{scc} (CYP11A1) (Del Punta, Charreau and Pignataro, 1996). Estos resultados fueron apoyados por trabajos posteriores que reforzaron el rol del sistema del NO y la óxido nítrico sintasa (NOS) en la modulación de la esteroidogénesis testicular (Kostic *et al.*, 1999; nee Pathak and Lal, 2008). A su vez, se ha demostrado que tanto el sistema de la NOS como el de la HO están involucrados en la regulación de la esteroidogénesis adrenal estimulada por ACTH (Pomeraniec *et al.*, 2004; Grion *et al.*, 2007). Por estos motivos postulamos que el CO podría ser el mediador de los efectos inhibitorios reversibles de la inducción de HO-1 sobre la esteroidogénesis en células de Leydig.

Con el fin de evaluar la participación del CO en los efectos observados de la hemina, se utilizó diclorometano (DCM), molécula utilizada para la producción de CO en diferentes modelos experimentales (Chen *et al.*, 2013; Ozawa *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2010; Sass *et al.*, 2003). Para que se produzca CO a partir de DCM, el mismo debe ser metabolizado por la enzima CYP2E1. Esta se expresa principalmente en el hígado, pero se ha detectado también en otros órganos incluyendo la próstata y el testículo, donde su expresión se encuentra restringida a

las células de Leydig (Forkert *et al.*, 2002; Healy *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1998). En el presente trabajo, se muestra que la inducción de CO con DCM inhibe la esteroidogénesis basal y estimulada por db-AMPC en células de Leydig MA-10 y también en R2C, sugiriendo que el CO podría ser el mediador de las acciones de hemina. En este sentido, estudios previos del laboratorio mostraron que la hemina regula la esteroidogénesis aguda a través de la disminución en la actividad de CYP11A1 (citocromo P450_{scc}) mientras que los niveles proteicos de la enzima no se veían afectados. En el presente trabajo observamos que la incubación con DCM reprodujo el efecto de la hemina sobre el camino esteroidogénico, actuando a nivel de la CYP11A1, que cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona, sin afectar a la 3 β -HSD. Tal como se mencionó previamente, esta inhibición reversible de la CYP11A1 también se observa tras incubar las células MA-10 con moléculas liberadoras de NO, el cual interactúa con el hierro de hemoproteínas como las enzimas citocromo P450, modulando su actividad (Del Punta, Charreau and Pignataro, 1996). En conjunto, en función de los resultados obtenidos, postulamos que la inhibición de la esteroidogénesis por la inducción de HO-1 estaría mediado, al menos en parte, por el CO y la inhibición de la enzima CYP11A1.

Como se mencionó en la introducción, tanto las células fetales como las inmaduras y progenitoras, que dan origen a la población de células adultas posmitóticas, tienen capacidad proliferativa. Esta función es esencial para asegurar el establecimiento de las poblaciones de células de Leydig cuya función endocrina es sumamente importante en diferentes etapas de la vida del individuo (Ye *et al.*, 2017). En vista de lo mencionado, se analizó el potencial efecto de la inducción de HO-1 sobre la proliferación de células de Leydig. A este respecto, demostramos que la inducción de HO-1 tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad proliferativa de las células MA-10. Si bien esta línea celular constituye un modelo

ampliamente aceptado para el estudio de las funciones de las células de Leydig, realizamos ensayos en células inmaduras normales de rata, las cuales conservan la capacidad proliferativa, y obtuvimos resultados similares a los observados en la línea celular. Adicionalmente, para corroborar que los efectos de hemina fueran mediados por HO-1, realizamos la co-incubación de hemina y ZnPPiX, inhibidor selectivo de la HO-1, y observamos que el inhibidor revirtió parcialmente el efecto inhibitorio sobre la proliferación. En conjunto, estos resultados sugieren que HO-1 podría tener un rol fisiológico en la regulación de la proliferación de las células de Leydig.

En línea con estos resultados, ha sido reportado que la inducción de la HO-1 posee un efecto antiproliferativo en otros tipos celulares (Seidel *et al.*, 2010; Ciesla *et al.*, 2017; Kozakowska *et al.*, 2018). Interesantemente, en células de músculo liso, se reportó que la HO-1 inhibe la proliferación a través de un mecanismo dependiente de CO, actuando sobre canales de calcio tipo T (Duckles *et al.*, 2015). En el presente trabajo, demostramos que la incubación con DCM inhibe la proliferación de células de Leydig MA-10. En cuanto a los mecanismos a través de los cuales el CO podría regular la proliferación celular, se ha demostrado que la inhibición de la proliferación de linfocitos T dada por CO estaría mediada por la supresión de la señalización por ROS (Yan *et al.*, 2020). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el CO podría estar actuando como un mediador del efecto inhibitorio de la inducción de HO-1. Nuevos estudios serán necesarios para esclarecer a través de cuáles mecanismos el CO inhibe la proliferación de las células de Leydig.

Para analizar si la hemina ejerce un arresto en alguna de las fases del ciclo celular, se estudió la distribución de las células MA-10 en las diferentes fases en respuesta al inductor de HO-1. Se observó que hemina promueve un arresto del

ciclo celular en el pasaje G2/M. Este mecanismo también fue observado por Lee y colaboradores en una línea de células de epitelio pulmonar, en la cual se observa un arresto del ciclo celular y una marcada resistencia a estímulos oxidantes como la hiperoxia (Lee *et al.*, 1996). En una línea de células de carcinoma de células escamosas de esófago se observó que la sobreexpresión de HO-1 induce el arresto en G2/M tras el tratamiento con inhibidores p38MAPK y mTOR (Hu *et al.*, 2013). Adicionalmente, observamos que dicho arresto en la función proliferativa es reversible ya que, si se retira la hemina del medio de cultivo, la incorporación de timidina regresa a niveles similares a los del control. En otras líneas celulares murinas también se observó que la salida del arresto en G2/M puede ocurrir en unas pocas horas (van Vugt and Yaffe, 2010).

Una vez demostrado que la hemina inhibe la proliferación, se estudió si dicha inhibición está acompañada por cambios en la vía apoptótica. Se observó que la hemina incrementa levemente el porcentaje de células MA-10 apoptóticas. Este resultado resultó contrario a lo reportado en la mayor parte de los estudios: en otros modelos experimentales, la HO-1 ha demostrado tener un rol protector, reduciendo la activación de este mecanismo de muerte celular programada frente a diferentes noxas prooxidantes (Loboda *et al.*, 2016; Ryter, 2021). En particular, se ha reportado que, en la línea de células de Leydig TM3 (células de Leydig inmaduras provenientes de testículos de ratón de 11 a 13 días), la apoptosis inducida por cadmio puede ser revertida por un mecanismo mediado por Nrf2 y proteínas antioxidantes con elementos de respuesta antioxidante (ARE) como la HO-1 (Yang *et al.*, 2019). A su vez, se propuso a la HO-1 como principal mediadora de la inhibición de la apoptosis testicular dada por el tratamiento con simvastatina tras un daño por isquemia-reperfusión (Tu *et al.*, 2011). Recientemente, se ha demostrado que un ARN largo no codificante (lncRNA)

promueve la apoptosis de células de Leydig facilitando la degradación del factor de transcripción Nrf2 (Liu *et al.*, 2021). Cabe resaltar que la inducción de la apoptosis por hemina reportada en el presente trabajo representa un porcentaje muy bajo (2,4%) del total de las células. En función de los resultados obtenidos, podemos postular que la inducción de HO-1 tiene un efecto antiproliferativo mediado por un arresto transitorio de la progresión del ciclo celular. El mencionado arresto en la proliferación podría estar vinculado con la acción protectora de la HO-1 frente a estresores o desbalances oxidativos hasta el restablecimiento de la homeostasis celular.

Como se ha mencionado, la correcta sincronización de señales hormonales y mediadores locales del microambiente testicular resulta esencial para el correcto desarrollo y funcionamiento del testículo y, en particular, de la población endocrina de células de Leydig. Existen vastas evidencias de que la histamina forma parte de este vital grupo de señales, con un importante rol regulatorio sobre su función esteroidogénica y proliferativa mediante la activación de sus diferentes subtipos de receptores (Albrecht *et al.*, 2005; Mondillo *et al.*, 2005; Khan and Rai, 2007; Pagotto *et al.*, 2012; Abiuso *et al.*, 2014). A pesar de que se le ha atribuido un rol antioxidante a la histamina en algunos modelos experimentales (Yadav *et al.*, 2015; Sanna *et al.*, 2017), no existen reportes sobre una interacción específica entre el sistema histaminérgico y el de la hemo oxigenasa. En vista del rol regulatorio de la HO-1 sobre las células de Leydig, se analizó la posible interacción entre esta enzima y la histamina en la regulación de la esteroidogénesis y la proliferación. La histamina actúa diferencialmente a través de sus subtipos de receptores en las células de Leydig. A concentraciones fisiológicas, ejerce un efecto positivo sobre la esteroidogénesis y la proliferación a través del receptor HRH2 (Abiuso *et al.*, 2014; Pagotto *et al.*, 2012). En el presente trabajo, mostramos cómo la inducción de HO-

1 revierte el estímulo ejercido por la histamina sobre la esteroidogénesis y la proliferación de células MA-10. Los resultados obtenidos con amtamina, agonista del receptor HRH2, muestran que la inducción de HO-1 por hemina afecta la regulación por histamina mediada por dicho receptor específico. La incapacidad de la histamina de estimular la síntesis de esteroides en presencia de hemina podría ser explicada por la acción inhibitoria del CO sobre enzimas esteroidogénicas claves para dicho proceso. En cuanto a la proliferación celular, podemos especular que la histamina podría favorecer el pasaje G1/S, pero dicho efecto estaría siendo contrarrestado por el arresto del ciclo celular en la fase G2/M inducido por la hemina.

Como conclusiones de esta primera parte, se describe que la inducción de HO-1 regula negativamente las funciones de las células de Leydig y altera el efecto regulatorio del sistema histaminérgico. El CO emerge como principal mediador de estos efectos de la HO-1. La reversibilidad de sus acciones sugiere que la activación de HO-1 podría constituir una respuesta de salvaguarda frente a estímulos prooxidantes consistente en frenar las funciones celulares hasta que se restablezca la homeostasis. A su vez, a pesar de que las células pueden revertir los efectos de la inducción de la HO-1, estos resultados permiten profundizar sobre cómo aquellos agentes que generen un desbalance oxidativo, a través de la inducción de la HO-1, podrían influir negativamente sobre fases críticas del desarrollo y sobre la diferenciación de las células de Leydig, afectando sus propias funciones, así como también las de otras poblaciones celulares que dependen del control endocrino, entre ellas, las relacionadas con la función reproductiva. De esta forma podemos sugerir que en contextos fisiológicos y/o patológicos, la inducción de HO-1 podría ser parte de los mecanismos que regulan de forma fina la funcionalidad de la célula de Leydig.

La ciclooxigenasa es una enzima ampliamente distribuida en el organismo y su participación en diversos escenarios fisiopatológicos la convierten en un blanco sensible para la modulación de distintas actividades metabólicas. A su vez, los AINEs son fármacos extensamente utilizados para tratar el dolor y la inflamación mediante la inhibición de COX. Es por ello que el estudio de la regulación de funciones biológicas centrales por parte de COX resulta de gran relevancia.

En primer lugar, se describió mediante inmunocitoquímica la localización subcelular de COX-1 y COX-2 en nuestros modelos de estudio, las líneas celulares MA-10 y R2C. Se observó la presencia citoplasmática de las dos isoformas en ambas líneas celulares, y una mayor expresión de COX-1 en el compartimento nuclear. Si bien la localización subcelular diferencial de estas isoformas y sus implicancias no está ampliamente documentada, Koumas y colaboradores observaron la presencia nuclear de COX-1 en fibroblastos del tracto reproductor femenino estimulados con IL-1 β , y ausencia de COX-2 en dicho compartimento. En este trabajo, se especula que la COX-1 nuclear podría estar involucrada en la producción de prostaglandinas que interactúan con receptores nucleares y modulan de forma directa la expresión de genes (Koumas and Phipps, 2002). A su vez, se ha reportado que, en muestras histológicas de carcinoma oral de células escamosas, la expresión de COX-1 en el núcleo de células neoplásicas es mayor que la de COX-2 (Hayes *et al.*, 2006). Si bien aún no se cuenta con demasiada información al respecto de la distribución diferencial de las isoformas de la COX en diferentes tipos celulares, nuestros resultados apoyan las observaciones mencionadas previamente que indican una mayor presencia nuclear de la COX-1, mientras que la COX-2 se localiza preferentemente en el citoplasma.

A continuación, se evaluaron los efectos de las isoformas de la COX sobre la esteroidogénesis en células de Leydig. Para tal fin se trabajó con inhibidores selectivos de la COX-1 y la COX-2. Se observó que la inhibición de COX-1 no afecta los niveles de progesterona en células MA-10, mientras que la inhibición de COX-2 estimula la esteroidogénesis estimulada por db-AMPC. La indometacina, inhibidor no selectivo de las COX, también estimula la esteroidogénesis en MA-10. El efecto de la indometacina no es más marcado que aquel observado con el inhibidor selectivo de COX-2, meloxicam, lo cual apoya la idea de que COX-1 no participa en la regulación de la esteroidogénesis. En las células R2C, no se observa un efecto sobre la esteroidogénesis a las concentraciones de meloxicam utilizadas para MA-10. En un trabajo de Sirianni y colaboradores, en el cual se utilizó la línea celular R2C como modelo de estudio, se observó que la inhibición de COX-2 con NS-398 inhibe la expresión y la actividad de la enzima aromatasa, reduciendo también la producción de estradiol (Sirianni *et al.*, 2009). Considerando que en este último reporte se observa un efecto negativo sobre los niveles de estradiol y que nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de progesterona, se podría especular que los efectos son diferentes dependiendo del nivel del camino esteroidogénico que se analice. En este sentido, se ha propuesto la inducción de la proteína StAR como uno de los mecanismos para el efecto inhibitorio de la COX-2 sobre la esteroidogénesis (Wang *et al.*, 2003). Este efecto inhibitorio sobre la producción de esteroides se observó también en otros modelos experimentales. En un estudio sobre esteroidogénesis adrenal, se observó que la estimulación de la producción de progesterona dada por LPS está mediada, al menos parcialmente, por la inducción de COX-2 (Martinez Calejman *et al.*, 2011). A su vez, en un estudio *in vivo*, se observó que tanto el parecoxib, inhibidor selectivo de COX-2, como la indometacina, disminuyen la producción de corticosterona estimulada

por ACTH en ratas tratadas con LPS (Sanchez *et al.*, 2014). Estos resultados indican que el efecto de COX-2 sobre la producción de hormonas esteroideas no se observa únicamente en células de Leydig sino también en otros tipos celulares con función esteroidogénica, y que dicho efecto depende del tipo celular y el modelo de estudio.

Las prostaglandinas (PGs) son el producto de la ciclación oxidativa del ácido araquidónico catalizada por las ciclooxigenasas, y son las responsables de los procesos inflamatorios asociados a dichas enzimas. Como siguiente objetivo, se planteó evaluar cuál de las PGs podría estar mediando el efecto de la COX-2 sobre la esteroidogénesis en células de Leydig MA-10 y R2C. Para acotar el análisis, se trabajó con las PGs que han evidenciado tener roles en la fisiopatología testicular. Tanto la PGF₂α como la PGD₂ tienen dichos roles, e incluso mostraron efectos sobre la función endocrina testicular (Schell *et al.*, 2007; Frungieri *et al.*, 2015; Rossitto *et al.*, 2015). Mediante determinaciones *in vitro* y cálculos empíricos se ha propuesto que la concentración fisiológica testicular de PGF₂α se encuentra en un rango desde 100 pM hasta 1 μM en el hámster Sirio (Frungieri *et al.*, 2006) y la concentración de PGD₂ entre 1 y 10 μM en el humano (Rossi *et al.*, 2016). Más allá de estas evidencias, no existe un consenso acabado sobre la concentración fisiológica de prostaglandinas en el testículo de mamíferos, es por esto que se realizaron curvas de concentración desde el orden femtomolar hasta el micromolar para ambas PGs. Se observó un efecto estimulador de la PGF₂α (a partir de la concentración 10 fM) sobre la esteroidogénesis basal, e inhibitorio sobre la esteroidogénesis estimulada por db-AMPC. El efecto inhibitorio de la PGF₂α en condiciones estimuladas ya había sido observado en células de Leydig de hámster, sin embargo, no se habían descrito efectos sobre la esteroidogénesis basal. En dicho modelo experimental se observó una reducción en los niveles de la proteína

StAR tras el tratamiento con esta PG (Frungeri *et al.*, 2006). El efecto negativo de la PGF2 α sobre la esteroidogénesis también ha sido reportado en otros tejidos esteroidogénicos. Por ejemplo, PGF2 α reprime la esteroidogénesis adrenal mediante la inducción de DAX-1 y la consiguiente represión de StAR (Sandhoff and McLean, 1999), y también inhibe la esteroidogénesis ovárica, lo cual forma parte del mecanismo de regresión de los cuerpos lúteos (Niswender *et al.*, 2007). La PGD2, por su parte, no mostró efectos sobre la esteroidogénesis en células MA-10. Se había reportado, también en células de Leydig de hámster, un efecto estimulador de la PGD2 sobre la esteroidogénesis estimulada por hCG (Frungeri *et al.*, 2006; Schell *et al.*, 2007). En las células R2C, ninguna de las PG mostró efectos sobre la esteroidogénesis a las mismas concentraciones que las ensayadas en MA-10. Existen escasos estudios acerca de la presencia de los receptores de PGs en células de Leydig: se ha reportado la expresión del receptor de PGF2 α en células de Leydig murinas (Suzuki-Yamamoto *et al.*, 2007), y del receptor de PGD2 en células de Leydig humanas (Schell *et al.*, 2007). No descartamos que los efectos diferenciales de ambas PG estudiadas en el presente trabajo estén relacionados con la expresión diferencial de sus receptores. En conjunto, los resultados presentados indican que la PGF2 α estaría mediando el efecto de la COX-2 sobre la esteroidogénesis en células de Leydig.

Se ha demostrado que la inhibición de COX-2 y, en particular, el meloxicam afecta la función proliferativa en diferentes tipos celulares, principalmente en líneas celulares tumorales. La mayor parte de los reportes informan un efecto inhibitorio del meloxicam, lo cual pone a este fármaco en el centro de interés en lo que respecta a tratamientos antitumorales. Por ejemplo, se ha observado que el meloxicam suprime la proliferación de células de hepatocarcinoma (Guangshun *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016), cáncer de próstata (Montejo *et al.*, 2010),

mamario (Iturriaga *et al.*, 2017) y de vejiga (Arantes-Rodrigues *et al.*, 2013). Sobre células del sistema inmune, en cambio, se ha reportado que el tratamiento con meloxicam potencia la capacidad proliferativa de linfocitos T (Maślanka, 2013; Kamble *et al.*, 2021) y de células *natural killer* bovinas (Maślanka, 2013). Incluso la isoenzima constitutiva de la ciclooxigenasa, COX-1, ha demostrado influir sobre la capacidad proliferativa de células tumorales (Chandrasekharan *et al.*, 2005; Lampiasi *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2021). Considerando estas evidencias, se planteó como siguiente objetivo evaluar el efecto de la inhibición de COX-1 o COX-2 sobre la proliferación de células de Leydig MA-10 y R2C. Se observó que ni la inhibición de COX-1 ni de COX-2 utilizando inhibidores selectivos afecta su capacidad proliferativa, manteniéndose inalterado también el porcentaje de células viables.

Tal como se ha mencionado, los mecanismos regulatorios de los procesos inflamatorios y antioxidantes se encuentran interrelacionados. Particularmente en el testículo, se ha observado que la melatonina tiene un efecto protector *in vivo* contra el daño ejercido por el tratamiento con bisfenol S o flúor. Dicho efecto protector consiste en el aumento de proteínas testiculares antioxidantes como Nrf2/HO-1 y la reducción de proteínas inflamatorias como Nf-kB/COX-2 (Kumar, Haldar and Verma, 2020; Kumar, Verma and Haldar, 2021). Esta regulación simultánea y contraria de HO-1 y COX-2 se observó también en testículos de ratas diabéticas, que presentan una expresión reducida de HO-1 y aumentada de COX-2 (Maremanda, Khan and Jena, 2016), lo cual puede ser revertido por carvacrol, un antioxidante natural (Arkali, Aksakal and Kaya, 2021). Resulta interesante, considerando la difundida utilización de fármacos inhibidores de la COX-2, estudiar los efectos de la inhibición de esta enzima en un contexto en el que se encuentra inducida la HO-1. A pesar de las evidencias sobre la regulación conjunta de estas proteínas en una multiplicidad de condiciones y tipos celulares, la

información sobre los efectos de la COX-2 sobre la HO-1 y sus efectos es escasa. En lo que respecta a esta interrelación en el testículo o las células de Leydig, la información es nula.

Se ha descrito que la reacción catalizada por COX-2 no solamente genera prostaglandinas proinflamatorias sino también radicales libres (Jiang *et al.*, 2004). Sería de esperar, entonces, que un aumento en la actividad de COX-2, resulte en la inducción de la enzima HO-1. En consonancia con esto, en un estudio *in vivo*, se observó que el aumento en la expresión de HO-1 en el riñón dado por el tratamiento con cisplatino es revertido por meloxicam (Honma *et al.*, 2013). Asimismo, el aumento en la expresión de HO-1 en el fluido broncoalveolar inducido por Rosuvastatina no se observa si se coadministra meloxicam (Dolkart *et al.*, 2015). En el presente trabajo, sin embargo, observamos que el tratamiento con meloxicam no afecta los niveles proteicos de HO-1 basales en células de Leydig MA-10. Sin embargo, en presencia de hemina, la inhibición de COX-2 por meloxicam aumenta los niveles de HO-1 aún por encima de la inducción dada por hemina. A este respecto, se infiere que la COX-2 estaría inhibiendo la expresión de HO-1. Lo mismo se observa en presencia del segundo mensajero db-AMPC. En línea con este resultado, Choi y colaboradores, trabajando en células vasculares de músculo liso, observaron que con el inhibidor selectivo de COX-2 NS-398, disminuye el potencial proliferativo de dichas células a través del aumento en la expresión de HO-1. En este trabajo se propone incluso que el mediador de la inhibición de la proliferación es el CO (Choi *et al.*, 2008). Por otro lado, en un trabajo sobre nocicepción se demostró que el efecto analgésico de etoricoxib, otro inhibidor selectivo de COX-2, está mediado parcialmente por la activación de la vía HO-1/CO (Grangeiro *et al.*, 2011). Similarmente, la inhibición de COX-2 es acompañada por un aumento en la expresión y la actividad de HO-1 en células del

mesangio glomerular murino (Hou *et al.*, 2005) y en el útero de ratas (Cella *et al.*, 2006). En este último trabajo, se postula que la PGF2 α podría ser un mediador de efecto inhibitorio de la COX-2 sobre la actividad de la HO-1. En un modelo de daño hepático agudo, por otro lado, se observó que el tratamiento con meloxicam no afecta los niveles de expresión de HO-1 basales ni inducidos por tetracloruro de carbono (Mitazaki *et al.*, 2018). En conjunto, estas observaciones parecerían indicar que la interacción entre ambas vías varía en diferentes modelos experimentales y tipos celulares. A continuación, se evaluó el efecto de la inhibición de COX-2 sobre la esteroidogénesis de células de Leydig en presencia del inductor de la HO-1. Se observó, en condiciones estimuladas por db-AMPC, el aumento en los niveles de progesterona dado por la inhibición de COX-2 es revertido por la inducción de HO-1 con hemina. Se puede evidenciar que el efecto estimulador de meloxicam a la concentración más alta (10 μ M), no es revertido completamente por la hemina. Tal como se discutió para los experimentos con histamina y hemina, especulamos que la reversión de los efectos del meloxicam dada por la inducción de HO-1 está vinculada con el arresto que ejerce esta enzima sobre el camino esteroidogénico. Los resultados relacionados con la interacción entre HO-1 y COX-2 en la regulación de la esteroidogénesis resultan relevantes para conocer cómo se podría ver afectada la función endocrina testicular en un escenario en el cual la expresión de estas dos enzimas está siendo regulada.

En síntesis, podemos postular que la isoforma inducible COX-2 tendría un rol inhibitorio sobre la esteroidogénesis estimulada por gonadotrofinas en células de Leydig y que dicho efecto sería mediado, al menos en parte, por la PGF2 α . A su vez, que existiría una interrelación entre las acciones de COX-2 y HO-1 en la regulación de las funciones de las células de Leydig.

Como objetivo final del presente trabajo, nos propusimos estudiar los efectos del compuesto natural curcumina sobre la funcionalidad de las células de Leydig. El consumo de curcumina abarca varios siglos y continentes, lo cual se sustenta en sus aparentemente infinitos efectos curativos. Según un reporte de 1974 de la Organización Mundial de la Salud y la Organización para la Alimentación y la Agricultura, la ingesta diaria de cúrcuma en comunidades que la utilizan tradicionalmente como especia culinaria oscila entre 2 y 2,5 g, lo cual corresponde a una concentración de curcumina de entre 60 y 100 mg (Shah *et al.*, 1999). Para aprovechar aún más sus beneficios, se ha recurrido a extractos enriquecidos y suplementos de venta libre con concentraciones diez veces mayores de curcumina. La mayoría de los estudios clínicos de fase I o II que ensayan fármacos que contienen curcumina alcanzan dosis diarias de entre 1000 y 8000 mg, siendo 8000 mg/día la concentración máxima tolerable que no causa efectos adversos serios (National Cancer Institute, 2022). El marcado interés en los efectos beneficiosos para la salud de este producto natural ha llevado a su creciente consumo global y, por ende, el esclarecimiento de sus efectos sobre diferentes procesos fisiopatológicos y, en particular, sobre la función endocrina testicular resulta de suma relevancia.

En el presente trabajo se muestra que la incubación con curcumina durante 5 h estimula de forma concentración-dependiente la esteroidogénesis aguda en células MA-10, tanto en presencia como en ausencia de db-AMPC. El efecto estimulador se observa también en las células R2C. Las concentraciones más elevadas de curcumina muestran un efecto menos marcado, lo cual, como se verá a continuación, podría ser un indicio de la incipiente activación de los programas de muerte celular. Si bien no hay una disminución significativa en la viabilidad celular a estos tiempos, comienzan a observarse alteraciones morfológicas que dan

cuenta de esto. El aumento en los niveles de progesterona se ve acompañado, y puede ser parcialmente explicado, por un aumento en los niveles de ARNm y proteicos de StAR. Hasta el momento, existen escasísimos reportes que indagan sobre los efectos de la curcumina sobre la producción de esteroides en células de Leydig. Uno de ellos, de hecho, presenta datos contrarios a los aquí reportados. Los resultados de Lin y colaboradores muestran que la curcumina, en el mismo rango de concentraciones que los ensayos en este trabajo, inhiben la esteroidogénesis estimulada por 8-Br-db-AMPC en células MA-10 y en células normales de ratón. También reportan una reducción en la expresión de StAR y CYP11A1 (Lin *et al.*, 2018). En este artículo no se informa la fuente de la droga utilizada, con lo cual se podría especular que las diferencias en los resultados podrían deberse a diferencias en la calidad, pureza o, incluso, naturaleza química de la droga. En el presente trabajo se utilizó curcumina en estado sólido con un porcentaje de pureza superior al 90% (Cayman Chemical, Ítem N° 81025); la utilización de drogas comerciales, al menos de “calidad técnica”, y el adecuado reporte de la fuente del compuesto hace que los resultados sean más confiables y reproducibles. Por otro lado, existe una serie de reportes cuyos resultados van en línea con lo descrito en el presente trabajo. Chen y colaboradores han mostrado que la curcumina no afecta los niveles de testosterona basal en las células de Leydig TM3, pero revierte la inhibición en la producción de testosterona inducida por ácido palmítico (Chen *et al.*, 2019). Este efecto protector de la curcumina contra la disrupción endocrina generada por una variedad de estresores también ha sido observado *in vivo*. Se ha reportado que la disminución en los niveles de testosterona sérica inducida por hipertermia escrotal (Afshar *et al.*, 2021), metales pesados como el cadmio (Yang *et al.*, 2019), ácido gálico (Abarikwu *et al.*, 2014), entre otros, puede ser revertida cuando los animales son tratados con curcumina. En los dos últimos reportes citados, los animales

incluso presentan concentraciones aumentadas de testosterona circulante cuando son tratados únicamente con curcumina. También se ha reportado que la curcumina estimula la esteroidogénesis en células ováricas de la granulosa *in vitro* (Kádasi *et al.*, 2017). Los resultados presentados en este trabajo constituyen una fuerte evidencia *in vitro* del efecto estimulador de la curcumina de alto nivel de pureza sobre la esteroidogénesis en células de Leydig, y van en línea con los reportes que postulan a este compuesto natural como un potencial protector de la función endocrina testicular.

La capacidad de la curcumina de preservar la arquitectura y función testicular ha sido ampliamente documentada, y se atribuye generalmente a su acción antioxidante. Análisis *in vitro* en líneas de células de Leydig mostraron que la curcumina ejerce este rol protector contra una variedad de estresores mediante la supresión de la apoptosis, la inhibición del estrés del retículo endoplasmático y el restablecimiento del balance oxidativo (Chen *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2019; Yildizbayrak & Erkan, 2019). Este efecto protector de la curcumina sobre la función testicular se manifiesta *in vivo*, preservando el volumen testicular, la altura del epitelio germinal, la longitud de los túbulos y el número de células germinales y células de Leydig viables frente a agentes estresores como la hipertermia o drogas con efectos nocivos sobre la integridad testicular (Noorafshan *et al.*, 2011; Afshar *et al.*, 2021). En el presente trabajo, se observa cómo la curcumina a bajas concentraciones reduce los niveles basales y estimulados por H₂O₂ de especies reactivas de oxígeno. En cambio, las concentraciones altas de curcumina aumentan los niveles basales de ROS y no revierten el efecto del H₂O₂. A su vez, se observó un aumento concomitante en los niveles de la enzima antioxidante HO-1 por el tratamiento con curcumina, mientras que no se observaron cambios en la expresión de COX-2. En línea con estos resultados, se ha propuesto a la curcumina

como un modulador de la vía del factor de transcripción Nrf2 en el testículo, el cual regula la expresión de varias enzimas antioxidantes, incluyendo a la HO-1 (Ashrafizadeh *et al.*, 2020). Un estudio *in vivo* en ratas mostró que, en presencia del estresor di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP), la curcumina aumenta la expresión de Nrf2 y HO-1 en el testículo y reduce el daño testicular (Abd El-Fattah *et al.*, 2016). Sumado a esto, dada la capacidad de oxidación de su grupo dicetona y sus grupos fenólicos, la curcumina ha mostrado estar directamente involucrada en el barrido de radicales libres (Priyadarsini, 2014). El presente trabajo aporta nuevas evidencias de este papel antioxidante de la curcumina en la población endocrina del testículo. Dicho papel se observa a concentraciones bajas, mientras que, a concentraciones altas, tal como se seguirá discutiendo, comenzarían a activarse mecanismos celulares relacionados con el estrés y la muerte celular.

Por otra parte, la curcumina ha demostrado tener efectos en la modulación de la carcinogénesis, regulando procesos celulares como la proliferación, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la viabilidad (National Cancer Institute, 2022). En el presente trabajo, demostramos que la curcumina inhibe la proliferación de las células de Leydig MA-10 e induce el arresto del ciclo celular en G2/M. También, demostramos que reduce la viabilidad y aumenta el porcentaje de células apoptóticas a la concentración más alta ensayada. En el reporte de Chen y colaboradores, las células TM3 fueron tratadas con curcumina 40 μM y se observó un efecto negativo sobre la viabilidad (Chen *et al.*, 2019). El arresto en G2/M inducido por curcumina también se observó en otros tipos celulares tumorales, como células de osteosarcoma (Lee *et al.*, 2009), páncreas (Zhu and Bu, 2017), leucemia mieloide aguda (Zhou *et al.*, 2021), adenocarcinoma de colon (Agarwal *et al.*, 2018), entre otras. Asimismo, se reportó que un derivado de la curcumina, llamado curcumina nicotinato, inhibe la proliferación de células tumorales de

colon, mama y nasofaringe e induce apoptosis y arresto en G2/M mediante un mecanismo dependiente de proteínas como p53 y p21 (He *et al.*, 2019). En el presente trabajo, se evidenció que la curcumina induce la expresión de p21^{Cip1} en las células de Leydig MA-10. Este incremento permitiría explicar el observado arresto en G2/M debido a la participación de p21^{Cip1} en la ampliamente descrita acumulación nuclear de complejos ciclina B1-Cdk inactivos (Ando *et al.*, 2001; Charrier-Savournin *et al.*, 2004; Müllers *et al.*, 2014). También reportamos una reducción en los niveles de ARNm de ciclina D1, lo cual podría explicar una menor progresión del ciclo celular, impidiendo la salida de G1, lo cual reduciría el porcentaje de células en fase S. Cabe mencionar que también se ha reportado que la curcumina induce un arresto en G0/G1 (Rajitha *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2016) o en G1/S (Shishodia *et al.*, 2005) en otros tipos celulares, lo cual podría estar vinculado a su multiplicidad de efectos a nivel celular. En las células de Leydig MA-10, en particular, se aportan las primeras evidencias acerca del rol antiproliferativo de la curcumina, que podría estar mediado por la regulación de ciclinas e inhibidores del ciclo celular.

En el proceso de tumorigénesis, además de procesos relacionados con la proliferación y la muerte celular, la modulación de la angiogénesis constituye una de las propiedades que adquieren las células tumorales que devienen en la promoción de su propio crecimiento. Es por esto que se planteó como siguiente objetivo analizar si la curcumina modifica la liberación de factores angiogénicos por parte de las células de Leydig MA-10. Para tal fin se empleó un ensayo que evalúa el efecto del medio condicionado de las células sobre la angiogénesis en la membrana corioalantoidea de codorniz. Se observó que el medio condicionado de células MA-10 tratadas con curcumina 40 μ M tiene un efecto positivo sobre la liberación de factores proangiogénicos. Estos resultados sugieren un efecto

proangiogénico de la curcumina *in vitro*. Sin embargo, los resultados *in vivo* obtenidos a partir del modelo singénico de tumores de células de Leydig no reproducen lo observado *in vitro*, dado que el tratamiento con curcumina no afecta significativamente la expresión de VEGF en los tumores. Podría hipotetizarse que, en el contexto del animal entero, la angiogénesis no juega un rol en el efecto antitumoral observado. Otra posibilidad sería que existan otros mecanismos, independientes de VEGF, involucrados en la regulación de la angiogénesis tumoral. A este respecto, en otros modelos experimentales, se ha reportado la capacidad antiangiogénica de la curcumina *in vivo* por sus efectos sobre numerosas vías de señalización (Kunnumakkara, Anand and Aggarwal, 2008). Por ejemplo, se describió en un modelo de cáncer colorrectal que la curcumina induce la expresión de miRNAs regulatorios que inhiben la función de VEGF (Moradi-Marjaneh *et al.*, 2018). El efecto antiangiogénico también se ha observado en un modelo de mesotelioma maligno (Zhang *et al.*, 2018) y de fibrosis hepática (Zhang *et al.*, 2014), entre otros. A su vez, existen reportes que muestran la capacidad de la curcumina de promover la formación de vasos sanguíneos en procesos como el envejecimiento del tejido cardíaco (Ghorbanzadeh *et al.*, 2022), la formación del trofoblasto (Basak *et al.*, 2020) y la cicatrización (Kant *et al.*, 2015). A este respecto, más estudios serán necesarios para profundizar en el análisis de los efectos *in vivo* de la curcumina sobre la función angiogénica en modelos de tumores de células de Leydig.

Finalmente, observando el efecto antiproliferativo de la curcumina en células de Leydig MA-10 *in vitro*, se evaluó si la misma mostraba dicho efecto en un modelo singénico de tumores de células de Leydig. Tras descartar potenciales efectos perjudiciales sobre el estado general de salud de los ratones, se reportó un significativo efecto antitumoral de la curcumina *in vivo*: una reducción en el peso

y volumen tumoral, así como del tiempo de duplicación de las curvas de crecimiento tumoral. A las condiciones ensayadas, el mecanismo de inhibición de crecimiento tumoral no parecería involucrar una acción anti-apoptótica. El presente trabajo se suma a una serie de reportes que muestran los efectos favorables de la curcumina tanto en ensayos preclínicos como clínicos que proponen a la curcumina como un adyuvante antitumoral. A su vez, es relevante remarcar que la curcumina no mostró un efecto negativo sobre la integridad testicular —la histología, el índice gónado-somático y la altura del epitelio germinal se mantienen conservados—, lo cual sugiere que dicho tratamiento no tendría efectos nocivos sobre el testículo intacto. En relación con el potencial clínico de la curcumina, hay dos aspectos que deben ser tenidos en cuenta. En primer lugar, existe una notable falta de precisión en lo que respecta a la naturaleza química de los productos utilizados en los diferentes estudios. Se reportan efectos de compuestos que van desde extractos del rizoma de la *Curcuma longa*, pasando por extractos enriquecidos en curcuminoides, hasta curcumina pura (National Cancer Institute, 2022). Por otro lado, la curcumina es una molécula altamente hidrofóbica, químicamente inestable, y un perfil farmacocinético que presenta un desafío para su utilización en pacientes. Por esta razón se están desarrollando y evaluando análogos de la curcumina que mejoren su biodisponibilidad y conserven sus efectos beneficiosos para la salud (Dei Cas and Ghidoni, 2019). Interesantemente, existen dos posiciones contrapuestas en relación al uso de la curcumina como alternativa terapéutica. Los detractores colocan a la curcumina en el grupo de compuestos PAIN (“*pan assay interference*”) e IMP (“*invalid metabolic panaceas*”). Estos compuestos son criticados ya que las descripciones de sus múltiples efectos se basan únicamente en su actividad y su utilidad terapéutica, sin mayores precisiones sobre los mecanismos relacionados con dicha actividad (Nelson *et al.*,

2017). Por otro lado, hay quienes afirman que considerando que el cáncer es una enfermedad tan compleja, causada por la desregulación de múltiples genes, aquellas drogas que tengan blancos moleculares variados serán más eficientes para su prevención y tratamiento (Kunnumakkara, Anand and Aggarwal, 2008). Más allá de esta discusión, teniendo en cuenta la creciente popularidad y extendido consumo de la curcumina, no existen dudas de que sus efectos deben ser minuciosamente estudiados. Particularmente, para el caso de tumores de células de Leydig, cuyo tratamiento presenta un enorme desafío para los profesionales de la salud, la curcumina emerge como una opción terapéutica natural que podría ser utilizada como adyuvante de terapias convencionales, y que no presenta efectos nocivos sobre el estado de salud ni la integridad testicular.

En resumen, la curcumina demostró tener efectos sobre las funciones de las células de Leydig. Regula positivamente la liberación de esteroides, al menos parcialmente a través de la estimulación de StAR, y modula el estado oxidativo celular. Asimismo, la curcumina ejerce un rol inhibitorio sobre la proliferación celular tanto *in vitro*, como *in vivo*, el cual estaría mediado por la modulación de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. Por último, se aportan evidencias novedosas del efecto antitumoral de la curcumina sobre tumores de células de Leydig. Dicho compuesto no generó efectos adversos sobre el estado de salud general ni la integridad testicular de los animales, lo cual convierte a este compuesto natural en un potencial agente terapéutico adyuvante para el tratamiento de estas neoplasias.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo amplían el conocimiento acerca de los mecanismos regulatorios de las funciones de las células de Leydig. Tomando en consideración la variedad de escenarios en los cuales se

observan desbalances oxidativos y/o inflamatorios en el tejido testicular y, por ende, se inducen respuestas por parte de los sistemas de las hemo oxigenasas y las ciclooxigenasas, los datos aquí presentados ahondan en los potenciales efectos de dichos desbalances sobre la funcionalidad de la población celular endocrina testicular. A su vez, considerando el auge en el consumo y las investigaciones sobre compuestos naturales debido a sus diversos beneficios para la salud, resulta relevante realizar un análisis integral de sus efectos sobre las diferentes poblaciones celulares. A este respecto, se aportan nuevas evidencias acerca de los efectos de la curcumina, molécula con reportadas acciones antiinflamatorias y antioxidantes, sobre la fisiología de las células de Leydig. Finalmente, se describe por primera vez el efecto inhibitorio de la curcumina sobre el crecimiento de tumores de células de Leydig.

Bibliografia

- Abarikwu, S. O. *et al.* (2014) 'Combined administration of curcumin and gallic acid inhibits gallic acid-induced suppression of steroidogenesis, sperm output, antioxidant defenses and inflammatory responsive genes.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 143, pp. 49–60. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.02.008.
- Abd El-Fattah, A. A. *et al.* (2016) 'Resveratrol and curcumin ameliorate di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular injury in rats.', *General and comparative endocrinology*, 225, pp. 45–54. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.09.006.
- Abiuso, A. M. B. *et al.* (2014) 'H4 histamine receptors inhibit steroidogenesis and proliferation in Leydig cells', *Journal of Endocrinology*, 223(3), pp. 241–253. doi: 10.1530/JOE-14-0401.
- Abiuso, A. M. B. *et al.* (2018) 'Histamine H4 Receptor As a Novel Therapeutic Target for the Treatment of Leydig cell Tumors in Prepubertal Boys.', *European Journal of Cancer*, 91, pp. 125–135.
- Afshar, A. *et al.* (2021) 'Curcumin-Loaded Iron Particle Improvement of Spermatogenesis in Azoospermic Mouse Induced by Long-Term Scrotal Hyperthermia.', *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 28(2), pp. 371–380. doi: 10.1007/s43032-020-00288-2.
- Agarwal, A. *et al.* (2018) 'Curcumin induces apoptosis and cell cycle arrest via the activation of reactive oxygen species-independent mitochondrial apoptotic pathway in Smad4 and p53 mutated colon adenocarcinoma HT29 cells.', *Nutrition research*, 51, pp. 67–81. doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.011.
- Ahmed, H. U. *et al.* (2010) 'Testicular and paratesticular tumours in the prepubertal population.', *The Lancet. Oncology*, 11(5), pp. 476–483. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70012-7.
- Akarchariya, N. *et al.* (2017) 'Chemical profiling and antimicrobial activity of essential oil from *Curcuma aeruginosa* Roxb., *Curcuma glans* K. Larsen & J. Mood and *Curcuma cf. xanthorrhiza* Roxb. collected in Thailand', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(10), pp. 881–885. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.09.009>.
- Akingbemi, B. T. *et al.* (2004) 'Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), pp. 775–780. doi: 10.1073/pnas.0305977101.
- Albrecht, M. *et al.* (2005) 'Evidence for a histaminergic system in the human testis.', *Fertility and sterility*, 83(4), pp. 1060–1063. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.12.002.
- Anakwe, O. O. and Payne, A. H. (1987) 'Noncoordinate regulation of de novo synthesis of cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage and cytochrome P-450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in mouse Leydig cell cultures: relation to steroid production.', *Molecular endocrinology*, 1(9), pp. 595–603. doi: 10.1210/mend-1-9-595.
- Anand, P. *et al.* (2007) 'Bioavailability of curcumin: problems and promises.', *Molecular pharmaceutics*, 4(6), pp. 807–818. doi: 10.1021/mp700113r.
- Anderson, C. M. and Mendelson, C. R. (1985) 'Regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells in culture: effect of human chorionic gonadotropin and dibutyryl cyclic AMP on the synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 238(2), pp. 378–387. doi: 10.1016/0003-9861(85)90178-x.

- Ando, T. *et al.* (2001) 'Involvement of the Interaction between p21 and Proliferating Cell Nuclear Antigen for the Maintenance of G2/M Arrest after DNA Damage', *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), pp. 42971–42977. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M106460200>.
- Arantes-Rodrigues, R. *et al.* (2013) 'Meloxicam in the treatment of in vitro and in vivo models of urinary bladder cancer.', *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 67(4), pp. 277–284. doi: 10.1016/j.biopha.2013.01.010.
- Arkali, G., Aksakal, M. and Kaya, Ş. Ö. (2021) 'Protective effects of carvacrol against diabetes-induced reproductive damage in male rats: Modulation of Nrf2/HO-1 signalling pathway and inhibition of Nf-kB-mediated testicular apoptosis and inflammation.', *Andrologia*, 53(2), p. e13899. doi: 10.1111/and.13899.
- Arosio, P. *et al.* (2015) 'The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection.', *The Biochemical journal*, 472(1), pp. 1–15. doi: 10.1042/BJ20150787.
- Ascoli, M. (1981) 'Characterization of Several Clonal Lines of Cultured Leydig Tumor Cells: Gonadotropin Receptors and Steroidogenic Responses', *Endocrinology*, 108(1), pp. 88–95.
- Ascoli, M. (1985) 'Functions and Regulation of Cell Surface Receptors in Cultured Leydig Tumor Cells', in CONN, P. M. B. T.-T. R. (ed.) *The Receptors, vol. II*. Academic Press, pp. 367–400. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-185202-3.50017-2>.
- Ascoli, M. and Puett, D. (1978) 'Gonadotropin binding and stimulation of steroidogenesis in Leydig tumor cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1), pp. 99–102. doi: 10.1073/pnas.75.1.99.
- Ashrafzadeh, M. *et al.* (2020) 'Curcumin Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection Against Oxidative Injury.', *Current molecular medicine*, 20(2), pp. 116–133. doi: 10.2174/1566524019666191016150757.
- Bae, W. J. *et al.* (2016) 'Protective Effect of Decursin Extracted from *Angelica gigas* in Male Infertility via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway.', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, p. 5901098. doi: 10.1155/2016/5901098.
- Bakalska, M. *et al.* (2003) 'Morphofunctional Aspects of Rat Leydig Cell Development.', *Acta morphologica et anthropologica*, 8.
- Baker, P. J. and O'Shaughnessy, P. J. (2001) 'Expression of prostaglandin D synthetase during development in the mouse testis.', *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(4), pp. 553–559. doi: 10.1530/rep.0.1220553.
- Balaji, T., Ramanathan, M. and Padmanabhan Menon, V. (2007) 'Localization of cyclooxygenase-2 in mice testis and assessment of its possible role through suppressing its expression using nimesulide: a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor.', *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 76(6), pp. 341–348. doi: 10.1016/j.plefa.2007.04.006.
- Barbosa, M. G. *et al.* (2020) 'Pre-pubertal exposure to ibuprofen impairs sperm parameters in male adult rats and compromises the next generation.', *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 83(15–16), pp. 559–572. doi: 10.1080/15287394.2020.1786483.
- Barrett, K. E. *et al.* (2019) *Ganong's Review of Medical Physiology*. 26th ed. New York, USA: McGraw-Hill Medical.
- Barsoum, I. B. *et al.* (2009) 'Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism.', *Developmental biology*, 329(1), pp. 96–103. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.02.025.
- Basak, S. *et al.* (2020) 'Curcumin stimulates angiogenesis through VEGF and expression of HLA-G in first-trimester human placental trophoblasts.', *Cell biology international*, 44(5), pp. 1237–1251. doi: 10.1002/cbin.11324.

- Bernard, N. *et al.* (2000) 'Cyclooxygenases 1 and 2 and thromboxane synthase in kidneys of Lyon hypertensive rats.', *American journal of hypertension*, 13(4 Pt 1), pp. 404–409. doi: 10.1016/s0895-7061(99)00211-3.
- Betteridge, D. J. (2000) 'What is oxidative stress?', *Metabolism: clinical and experimental*, 49(2 Suppl 1), pp. 3–8. doi: 10.1016/s0026-0495(00)80077-3.
- Biswas, C. *et al.* (2014) 'Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses', *Journal of Biological Chemistry*, 289(39), pp. 26882–26894. doi: 10.1074/jbc.M114.567685.
- Biswas, S. K. (2016) 'Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Edited by A. Daiber, 2016, p. 5698931. doi: 10.1155/2016/5698931.
- Bokemeyer, C. *et al.* (1993) 'Comparison of 5 vs 10 micrograms/kg per day of GM-CSF following dose-intensified chemotherapy with cisplatin, etoposide, and ifosfamide in patients with advanced testicular cancer.', *Annals of hematology*, 67(2), pp. 75–79. doi: 10.1007/BF01788130.
- Bornstein, S. R., Rutkowski, H. and Vrezas, I. (2004) 'Cytokines and steroidogenesis.', *Molecular and cellular endocrinology*, 215(1–2), pp. 135–141. doi: 10.1016/j.mce.2003.11.022.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Brennan, J., Tilmann, C. and Capel, B. (2003) 'Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad.', *Genes & development*, 17(6), pp. 800–810. doi: 10.1101/gad.1052503.
- Cella, M. *et al.* (2006) 'Heme oxygenase-carbon monoxide (HO-CO) system in rat uterus: effect of sexual steroids and prostaglandins.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 99(1), pp. 59–66. doi: 10.1016/j.jsbmb.2005.11.007.
- Chainani-Wu, N. (2003) 'Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*).', *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 9(1), pp. 161–168. doi: 10.1089/107555303321223035.
- Chandrasekharan, S. *et al.* (2005) 'Coupling of COX-1 to mPGES1 for prostaglandin E2 biosynthesis in the murine mammary gland.', *Journal of lipid research*, 46(12), pp. 2636–2648. doi: 10.1194/jlr.M500213-JLR200.
- Charrier-Savournin, F. B. *et al.* (2004) 'p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress.', *Molecular biology of the cell*, 15(9), pp. 3965–3976. doi: 10.1091/mbc.e03-12-0871.
- Chatterjee, S. (2016) 'Chapter Two - Oxidative Stress, Inflammation, and Disease', in Dziubla, T. and Butterfield, D. A. B. T.-O. S. and B. (eds) *Oxidative stress and biomaterials*. Academic Press, pp. 35–58. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4>.
- Chau, L.-Y. (2015) 'Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy.', *Journal of biomedical science*, 22(1), p. 22. doi: 10.1186/s12929-015-0128-0.
- Chen, C.-Y. *et al.* (2013) 'Carbon monoxide may enhance bile secretion by increasing glutathione excretion and Mrp2 expression in rats.', *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 76(5), pp. 258–264. doi: 10.1016/j.jcma.2013.02.001.
- Chen, H. *et al.* (2017) 'Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation.', *Molecular and cellular endocrinology*, 445, pp. 65–73. doi: 10.1016/j.mce.2016.10.010.

- Chen, M. *et al.* (2014) 'Wt1 Is Involved in Leydig Cell Steroid Hormone Biosynthesis by Regulating Paracrine Factor Expression in Mice', *Biology of Reproduction*, 90(4), pp. 1-9,71. doi: 10.1095/biolreprod.113.114702.
- Chen, S. *et al.* (2020) 'Curcumin inhibits zearalenone-induced apoptosis and oxidative stress in Leydig cells via modulation of the PTEN/Nrf2/Bip signaling pathway.', *Food and chemical toxicology*, 141, p. 111385. doi: 10.1016/j.fct.2020.111385.
- Chen, Z. *et al.* (2019) 'Curcumin protects against palmitic acid-induced apoptosis via the inhibition of endoplasmic reticulum stress in testicular Leydig cells.', *Reproductive biology and endocrinology*, 17(1), p. 71. doi: 10.1186/s12958-019-0517-4.
- Choi, H. C. *et al.* (2008) 'NS-398, a selective COX-2 inhibitor, inhibits proliferation of IL-1beta-stimulated vascular smooth muscle cells by induction of HO-1.', *Biochemical and biophysical research communications*, 376(4), pp. 753–757. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.056.
- Chung, H.-T. *et al.* (2008) 'Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation.', *Methods in enzymology*, 441, pp. 329–338. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01218-4.
- Ciesla, M. *et al.* (2017) 'Heme oxygenase 1 affects granulopoiesis in mice through control of myelocyte proliferation', *Immunobiology*, 222(6), pp. 846–857. doi: 10.1016/J.IMBIO.2017.05.006.
- Coates, P. M. *et al.* (2010) *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd edn.
- Conkey, D. S. *et al.* (2005) 'Testicular sex cord-stromal tumours: the Edinburgh experience 1988-2002, and a review of the literature.', *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 17(5), pp. 322–327. doi: 10.1016/j.clon.2005.04.009.
- Crosby, C. G. and DuBois, R. N. (2003) 'The cyclooxygenase-2 pathway as a target for treatment or prevention of cancer.', *Expert opinion on emerging drugs*. England, pp. 1–7. doi: 10.1517/14728214.8.1.1.
- Cruse, I. and Maines, M. D. (1988) 'Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes.', *The Journal of biological chemistry*, 263(7), pp. 3348–3353.
- Dale, H. H. and Laidlaw, P. P. (1910) 'The physiological action of beta-iminazolyethylamine.', *The Journal of physiology*, 41(5), pp. 318–344. doi: 10.1113/jphysiol.1910.sp001406.
- Davidoff, M. S. *et al.* (2004) 'Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed.', *The Journal of cell biology*, 167(5), pp. 935–944. doi: 10.1083/jcb.200409107.
- Davidson, K. T., Zhu, Z. and Fang, Y. (2016) 'Phytochemicals in the Fight Against Cancer', *Pathology and Oncology Research*, 22(4), pp. 655–660. doi: 10.1007/s12253-016-0045-x.
- Dei Cas, M. and Ghidoni, R. (2019) 'Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential.', *Nutrients*, 11(9). doi: 10.3390/nu11092147.
- Depboylu, C., Weihe, E. and Eiden, L. E. (2011) 'COX1 and COX2 expression in non-neuronal cellular compartments of the rhesus macaque brain during lentiviral infection.', *Neurobiology of disease*, 42(1), pp. 108–115. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.011.
- Dolkart, O. *et al.* (2015) 'Protective effects of rosuvastatin in a rat model of lung contusion: Stimulation of the cyclooxygenase 2-prostaglandin E-2 pathway.', *Surgery*, 157(5), pp. 944–953. doi: 10.1016/j.surg.2014.12.017.
- Dosoky, N. S. and Setzer, W. N. (2018) 'Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Curcuma Species.', *Nutrients*, 10(9). doi: 10.3390/nu10091196.
- Dubois, R. N. *et al.* (1998) 'Cyclooxygenase in biology and disease.', *FASEB journal*, 12(12), pp. 1063–1073.

- Duckles, H. *et al.* (2015) 'Heme oxygenase-1 regulates cell proliferation via carbon monoxide-mediated inhibition of T-type Ca²⁺ channels.', *European journal of physiology*, 467(2), pp. 415–427. doi: 10.1007/s00424-014-1503-5.
- Dunn, L. L. *et al.* (2014) 'New Insights into Intracellular Locations and Functions of Heme Oxygenase-1', *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(11), pp. 1723–1742. doi: 10.1089/ars.2013.5675.
- Estabrook, R. W., Franklin, M. R. and Hildebrandt, A. G. (1970) 'Factors influencing the inhibitory effect of carbon monoxide on cytochrome P-450-catalyzed mixed function oxidation reactions.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 174(1), pp. 218–232. doi: 10.1111/j.1749-6632.1970.tb49788.x.
- Ewing, J. F. and Maines, M. D. (1995) 'Distribution of constitutive (HO-2) and heat-inducible (HO-1) heme oxygenase isozymes in rat testes: HO-2 displays stage-specific expression in germ cells.', *Endocrinology*, 136(5), pp. 2294–2302. doi: 10.1210/endo.136.5.7720678.
- Figueiredo-Pereira, C. *et al.* (2020) 'CO-mediated cytoprotection is dependent on cell metabolism modulation.', *Redox biology*, 32, p. 101470. doi: 10.1016/j.redox.2020.101470.
- Forkert, P.-G. *et al.* (2002) 'Metabolism and toxicity of trichloroethylene in epididymis and testis.', *Toxicology and applied pharmacology*, 182(3), pp. 244–254. doi: 10.1006/taap.2002.9421.
- Frungieri, M. B. *et al.* (2002) 'Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: Possible relevance to human fibrotic disorders.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp. 15072–15077. doi: 10.1073/pnas.232422999.
- Frungieri, M. B. *et al.* (2006) 'Cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2 alpha in Syrian hamster Leydig cells: Inhibitory role on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-stimulated testosterone production.', *Endocrinology*, 147(9), pp. 4476–4485. doi: 10.1210/en.2006-0090.
- Frungieri, M. B. *et al.* (2015) 'Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis.', *Reproduction (Cambridge, England)*, 149(4), pp. R169-80. doi: 10.1530/REP-14-0392.
- Funk, J. L. *et al.* (2006) 'Efficacy and mechanism of action of turmeric supplements in the treatment of experimental arthritis.', *Arthritis and rheumatism*, 54(11), pp. 3452–3464. doi: 10.1002/art.22180.
- Funk, J. L. (2010) 'Turmeric', in *Encyclopedia of Dietary Supplements*, pp. 654–765.
- Gaytan, F. *et al.* (1990) 'Leydig cell involvement in the paracrine regulation of mast cells in the testicular interstitium of the rat.', *Biology of reproduction*, 43(4), pp. 665–671. doi: 10.1095/biolreprod43.4.665.
- Ge, R.-S. *et al.* (2006) 'In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103(8), pp. 2719–2724. doi: 10.1073/pnas.0507692103.
- Geminiani, J. J. *et al.* (2015) 'Testicular Leydig Cell Tumor with Metachronous Lesions: Outcomes after Metastasis Resection and Cryoablation.', *Case reports in urology*, 2015, p. 748495. doi: 10.1155/2015/748495.
- Gheorghisan-Galateanu, A. A. (2014) 'Leydig cell tumors of the testis: a case report.', *BMC research notes*, 7, p. 656. doi: 10.1186/1756-0500-7-656.
- Ghorbanzadeh, V. *et al.* (2022) 'Curcumin improves angiogenesis in the heart of aged rats: Involvement of TSP1/NF-κB/VEGF-A signaling.', *Microvascular research*, 139, p. 104258. doi: 10.1016/j.mvr.2021.104258.

- Grangeiro, N. M. G. *et al.* (2011) 'Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor.', *Pharmacological reports : PR*, 63(1), pp. 112–119. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70405-4.
- Grión, N. *et al.* (2007) 'Induction of nitric oxide synthase and heme oxygenase activities by endotoxin in the rat adrenal cortex: Involvement of both signaling systems in the modulation of ACTH-dependent steroid production', *Journal of Endocrinology*, 194(1), pp. 11–20. doi: 10.1677/JOE-06-0199.
- Griswold, S. L. and Behringer, R. R. (2009) 'Fetal Leydig cell origin and development.', *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 3(1), pp. 1–15. doi: 10.1159/000200077.
- Guangshun, S. *et al.* (2022) 'Meloxicam Inhibits Hepatocellular Carcinoma Progression and Enhances the Sensitivity of Immunotherapy via the MicroRNA-200/PD-L1 Pathway.', *Journal of oncology*, 2022, p. 4598573. doi: 10.1155/2022/4598573.
- Gupta, S. C. *et al.* (2013) 'Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic.', *Molecular nutrition & food research*, 57(9), pp. 1510–1528. doi: 10.1002/mnfr.201100741.
- Hales, D. B. (2002) 'Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis.', *Journal of reproductive immunology*, 57(1–2), pp. 3–18. doi: 10.1016/s0165-0378(02)00020-7.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation.', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hansson, V., Skålhegg, B. S. and Taskén, K. (2000) 'Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 73(1–2), pp. 81–92.
- Harris, R. E. (2009) 'Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung.', *Inflammopharmacology*, 17(2), pp. 55–67. doi: 10.1007/s10787-009-8049-8.
- Hase, T. *et al.* (2003) 'Cyclooxygenase-1 and -2 in human testicular tumours.', *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 39(14), pp. 2043–2049. doi: 10.1016/s0959-8049(03)00485-4.
- Hashemi Goradel, N. *et al.* (2019) 'Cyclooxygenase-2 in cancer: A review.', *Journal of cellular physiology*, 234(5), pp. 5683–5699. doi: 10.1002/jcp.27411.
- Hayashi, S. *et al.* (2004) 'Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene.', *Gene*, 336(2), pp. 241–250. doi: 10.1016/j.gene.2004.04.002.
- Hayes, A. *et al.* (2006) 'COX-1 and COX-2 expression in feline oral squamous cell carcinoma.', *Journal of comparative pathology*, 135(2–3), pp. 93–99. doi: 10.1016/j.jcpa.2006.06.001.
- He, Y.-C. *et al.* (2019) 'Curcumin Nicotinate Selectively Induces Cancer Cell Apoptosis and Cycle Arrest through a P53-Mediated Mechanism.', *Molecules*, 24(22). doi: 10.3390/molecules24224179.
- Healy, L. N., Pluta, L. J. and Recio, L. (1999) 'Expression and distribution of cytochrome P450 2E1 in B6C3F1 mouse liver and testes.', *Chemico-biological interactions*, 121(2), pp. 199–207. doi: 10.1016/s0009-2797(99)00082-4.
- Hedger, M. P. and Eddy, E. M. (1987) 'The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on Percoll density gradients: an immunological, cytochemical, and functional analysis.', *Endocrinology*, 121(5), pp. 1824–1838. doi: 10.1210/endo-121-5-1824.
- Heinrich, A. and DeFalco, T. (2020) 'Essential roles of interstitial cells in testicular development and function.', *Andrology*, 8(4), pp. 903–914. doi: 10.1111/andr.12703.

- Hilton, C. W. and Pollock, W. J. (1988) 'Virilization due to a Leydig cell adrenal adenoma.', *Southern medical journal*, 81(7), pp. 924–925. doi: 10.1097/00007611-198807000-00031.
- Honma, S. *et al.* (2013) 'Amelioration of cisplatin-induced mouse renal lesions by a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor.', *European journal of pharmacology*, 715(1–3), pp. 181–188. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.05.023.
- Hou, B. *et al.* (2021) 'Reproductive toxicity of polystyrene microplastics: In vivo experimental study on testicular toxicity in mice.', *Journal of hazardous materials*, 405, p. 124028. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124028.
- Hou, C.-C. *et al.* (2005) 'Celecoxib induces heme-oxygenase expression in glomerular mesangial cells.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042, pp. 235–245. doi: 10.1196/annals.1338.026.
- Hsu, F.-F. *et al.* (2015) 'Signal peptide peptidase-mediated nuclear localization of heme oxygenase-1 promotes cancer cell proliferation and invasion independent of its enzymatic activity.', *Oncogene*, 34(18), pp. 2360–2370. doi: 10.1038/onc.2014.166.
- Hu, J.-L. *et al.* (2013) 'Upregulation of HO-1 is accompanied by activation of p38MAPK and mTOR in human oesophageal squamous carcinoma cells.', *Cell biology international*, 37(6), pp. 584–592. doi: 10.1002/cbin.10075.
- Hutson, J. C. (1992) 'Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat.', *Cell and tissue research*, 267(2), pp. 385–389. doi: 10.1007/BF00302977.
- Inkster, S., Yue, W. and Brodie, A. (1995) 'Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(6), pp. 1941–1947. doi: 10.1210/jcem.80.6.7539819.
- Iturriaga, M. P. *et al.* (2017) 'Meloxicam decreases the migration and invasion of CF41.Mg canine mammary carcinoma cells.', *Oncology letters*, 14(2), pp. 2198–2206. doi: 10.3892/ol.2017.6400.
- Jackson, B. A. *et al.* (1993) 'Effects of transforming growth factor beta and interleukin-1 beta on expression of cyclooxygenase 1 and 2 and phospholipase A2 mRNA in lung fibroblasts and endothelial cells in culture.', *Biochemical and biophysical research communications*, 197(3), pp. 1465–1474. doi: 10.1006/bbrc.1993.2642.
- Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L. and Sakariah, K. K. (2005) 'Chemistry and biological activities of *C. longa*', *Trends in Food Science & Technology*, 16(12), pp. 533–548. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.08.006>.
- Ji, Y.-L. *et al.* (2012) 'Ascorbic acid protects against cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in testes.', *Reproductive toxicology*, 34(3), pp. 357–363. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.04.011.
- Jiang, J. *et al.* (2004) 'Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells.', *Journal of neurochemistry*, 90(5), pp. 1036–1049. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02577.x.
- Jiang, Y., Kuo, C. L., Pernecky, S. J., Coon, M. J., *et al.* (1998) 'Cytochrome P450 2E1 mRNA in the rat prostate: detection and quantitation by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction.', *Molecular and cellular probes*, 12(5), pp. 263–271. doi: 10.1006/mcpr.1998.0177.
- Jiang, Y., Kuo, C. L., Pernecky, S. J. and Piper, W. N. (1998) 'The detection of cytochrome P450 2E1 and its catalytic activity in rat testis.', *Biochemical and biophysical research communications*, 246(3), pp. 578–583. doi: 10.1006/bbrc.1998.8665.
- Jo, Y. and Stocco, D. M. (2004) 'Regulation of steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein in R2C cells by DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita,

- critical region on the X chromosome, gene-1).', *Endocrinology*, 145(12), pp. 5629–5637. doi: 10.1210/en.2004-0941.
- Jonker-Pool, G. *et al.* (2004) 'Male sexuality after cancer treatment--needs for information and support: testicular cancer compared to malignant lymphoma.', *Patient education and counseling*, 52(2), pp. 143–150. doi: 10.1016/s0738-3991(03)00025-9.
- Jun, S.-Y. *et al.* (2008) 'Ectopic Leydig cells of testis An immunohistochemical study on tissue microarray.', *Annals of diagnostic pathology*, 12(1), pp. 29–32. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2007.02.003.
- Kádasi, A. *et al.* (2017) 'Direct effect of curcumin on porcine ovarian cell functions.', *Animal reproduction science*, 182, pp. 77–83. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.05.001.
- Kamble, N. *et al.* (2021) 'Marek's Disease Virus Modulates T Cell Proliferation via Activation of Cyclooxygenase 2-Dependent Prostaglandin E2.', *Frontiers in immunology*, 12, p. 801781. doi: 10.3389/fimmu.2021.801781.
- Kant, V. *et al.* (2015) 'Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats.', *The Journal of surgical research*, 193(2), pp. 978–988. doi: 10.1016/j.jss.2014.10.019.
- Katori, M. and Majima, M. (2000) 'Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors.', *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 49(8), pp. 367–392. doi: 10.1007/s000110050605.
- Keeney, D. S. and Mason, J. I. (1992) 'Regulation of expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase is mediated by cAMP in rat Leydig cells and H540 rat Leydig tumor cells.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 43(8), pp. 915–922. doi: 10.1016/0960-0760(92)90319-E.
- Khan, U. W. and Rai, U. (2007) 'Differential effects of histamine on Leydig cell and testicular macrophage activities in wall lizards: precise role of H1/H2 receptor subtypes.', *The Journal of endocrinology*, 194(2), pp. 441–448. doi: 10.1677/JOE-06-0225.
- Kim, H.-K. *et al.* (2018) 'Transmembrane BAX Inhibitor Motif-6 (TMBIM6) protects against cisplatin-induced testicular toxicity.', *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(3), pp. 378–389. doi: 10.1093/humrep/dex381.
- Kim, I., Young, R. H. and Scully, R. E. (1985) 'Leydig cell tumors of the testis. A clinicopathological analysis of 40 cases and review of the literature.', *The American journal of surgical pathology*, 9(3), pp. 177–192. doi: 10.1097/00000478-198503000-00002.
- Klonisch, T., Fowler, P. A. and Hombach-Klonisch, S. (2004) 'Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development', *Developmental Biology*, 270(1), pp. 1–18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.018>.
- Kolluru, G. *et al.* (2017) 'Gasotransmitter Heterocellular Signaling.', *Antioxid Redox Signal*, 1(26(16)), pp. 936–960.
- Kostic, T. S. *et al.* (1999) 'Involvement of inducible nitric oxide synthase in stress-impaired testicular steroidogenesis.', *The Journal of endocrinology*, 163(3), pp. 409–416. doi: 10.1677/joe.0.1630409.
- Kotha, R. R. and Luthria, D. L. (2019) 'Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects.', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(16). doi: 10.3390/molecules24162930.
- Koumas, L. and Phipps, R. P. (2002) 'Differential COX localization and PG release in Thy-1(+) and Thy-1(-) human female reproductive tract fibroblasts.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 283(2), pp. C599-608. doi: 10.1152/ajpcell.00065.2002.

- Kozakowska, M. *et al.* (2018) 'Lack of Heme Oxygenase-1 Induces Inflammatory Reaction and Proliferation of Muscle Satellite Cells after Cardiotoxin-Induced Skeletal Muscle Injury.', *The American journal of pathology*, 188(2), pp. 491–506. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.10.017.
- Kubota, H. *et al.* (2011) 'Cyclooxygenase-2 protects germ cells against spermatogenesis disturbance in experimental cryptorchidism model mice.', *Journal of andrology*, 32(1), pp. 77–85. doi: 10.2164/jandrol.109.008888.
- Kuiri-Hänninen, T., Sankilampi, U. and Dunkel, L. (2014) 'Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty.', *Hormone research in paediatrics*, 82(2), pp. 73–80. doi: 10.1159/000362414.
- Kumar, J., Haldar, C. and Verma, R. (2020) 'Fluoride Compromises Testicular Redox Sensor, Gap Junction Protein, and Metabolic Status: Amelioration by Melatonin.', *Biological trace element research*, 196(2), pp. 552–564. doi: 10.1007/s12011-019-01946-6.
- Kumar, J., Verma, R. and Haldar, C. (2021) 'Melatonin ameliorates Bisphenol S induced testicular damages by modulating Nrf-2/HO-1 and SIRT-1/FOXO-1 expressions.', *Environmental toxicology*, 36(3), pp. 396–407. doi: 10.1002/tox.23045.
- Kumar, S. and Bandyopadhyay, U. (2005) 'Free heme toxicity and its detoxification systems in human.', *Toxicology letters*, 157(3), pp. 175–188. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.03.004.
- Kunnumakkara, A. B., Anand, P. and Aggarwal, B. B. (2008) 'Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins.', *Cancer letters*, 269(2), pp. 199–225. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.009.
- Lampiasi, N. *et al.* (2006) 'The selective cyclooxygenase-1 inhibitor SC-560 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells.', *International journal of molecular medicine*, 17(2), pp. 245–252.
- Langenbach, R. *et al.* (1999) 'Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 889, pp. 52–61. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08723.x.
- Lanzafame, S., Leonardi, R. and Torrisi, A. (2004) 'Extratesticular Leydig cell tumor of the spermatic cord.', *The Journal of urology*, 171(3), pp. 1238–1239. doi: 10.1097/01.ju.0000112611.42159.0c.
- Laue, L. L. *et al.* (1996) 'Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia.', *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 10(8), pp. 987–997. doi: 10.1210/mend.10.8.8843415.
- Lee, D. S., Lee, M. K. and Kim, J. H. (2009) 'Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells.', *Anticancer research*, 29(12), pp. 5039–5044.
- Lee, P. J. *et al.* (1996) 'Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(19), pp. 10393–10398. doi: 10.1073/pnas.93.19.10393.
- Leisegang, K. and Dutta, S. (2021) 'Do lifestyle practices impede male fertility?', *Andrologia*, 53(1), p. e13595. doi: 10.1111/and.13595.
- Leonhartsberger, N. *et al.* (2011) 'Increased incidence of Leydig cell tumours of the testis in the era of improved imaging techniques.', *BJU international*, 108(10), pp. 1603–1607. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10177.x.
- Li, H. E. *et al.* (1991) 'Localization of immunoreactive beta-endorphin and adrenocorticotrophic hormone and pro-opiomelanocortin mRNA to rat testicular interstitial tissue macrophages.', *Biology of Reproduction*, 45(2), pp. 282–289. doi: 10.1095/biolreprod45.2.282.

- Li, J. *et al.* (2006) 'Specific COX-2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells.', *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(12), pp. 1814–1820. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04366.x.
- Li, L. *et al.* (2014) 'Heat shock protein 32/heme oxygenase-1 protects mouse Sertoli cells from hyperthermia-induced apoptosis by CO activation of sGC signalling pathways.', *Cell biology international*, 38(1), pp. 64–71. doi: 10.1002/cbin.10177.
- Li, T. *et al.* (2016) 'Meloxicam suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by targeting COX-2/PGE2-regulated activation of the β -catenin signaling pathway.', *Oncology reports*, 35(6), pp. 3614–3622. doi: 10.3892/or.2016.4764.
- Li, Y. *et al.* (2013) 'Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis.', *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 11, p. 23. doi: 10.1186/1477-7827-11-23.
- Lin, Q. *et al.* (2007) 'Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress.', *The Journal of biological chemistry*, 282(28), pp. 20621–20633. doi: 10.1074/jbc.M607954200.
- Lin, Y. C. *et al.* (2018) 'Curcumin downregulates 8-br-cAMP-induced steroidogenesis in mouse Leydig cells by suppressing the expression of Cyp11a1 and StAR independently of the PKA-CREB pathway.', *Endocrine journal*, 65(8), pp. 833–840. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0010.
- Lindl, T. *et al.* (2005) 'An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays.', *Alternatives to laboratory animals*, 33(6), pp. 591–601. doi: 10.1177/026119290503300614.
- Liu, Yanling *et al.* (2021) 'LncRNA FENDRR promotes apoptosis of Leydig cells in late-onset hypogonadism by facilitating the degradation of Nrf2.', *Cell and tissue research*, 386(2), pp. 379–389. doi: 10.1007/s00441-021-03497-6.
- Loboda, A. *et al.* (2016) 'Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), pp. 3221–3247. doi: 10.1007/s00018-016-2223-0.
- Lukyanenko, Y. O., Chen, J. J. and Hutson, J. C. (2001) 'Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells.', *Biology of reproduction*, 64(3), pp. 790–796. doi: 10.1095/biolreprod64.3.790.
- Maines, M. D. (1984) 'Characterization of heme oxygenase activity in Leydig and Sertoli cells of the rat testes. Differential distribution of activity and response to cadmium.', *Biochemical pharmacology*, 33(9), pp. 1493–1502. doi: 10.1016/0006-2952(84)90418-0.
- Maines, M. D., Chung, A. S. and Kutty, R. K. (1982) 'The inhibition of testicular heme oxygenase activity by cadmium. A novel cellular response.', *The Journal of biological chemistry*, 257(23), pp. 14116–14121.
- Maines, M. D. and Ewing, J. F. (1996) 'Stress response of the rat testis: in situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia.', *Biology of reproduction*, 54(5), pp. 1070–1079. doi: 10.1095/biolreprod54.5.1070.
- Maines, M. D. and Gibbs, P. E. M. (2005) '30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events.', *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), pp. 568–577. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.121.
- Maines, M. D., Trakshel, G. M. and Kutty, R. K. (1986) 'Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible.', *The Journal of biological chemistry*, 261(1), pp. 411–419.

- Mann, U., Shiff, B. and Patel, P. (2020) 'Reasons for worldwide decline in male fertility.', *Current opinion in urology*, 30(3), pp. 296–301. doi: 10.1097/MOU.0000000000000745.
- Manna, P. R. *et al.* (2016) 'Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease.', *Endocrine*, 51(1), pp. 7–21. doi: 10.1007/s12020-015-0715-6.
- Maremanda, K. P., Khan, S. and Jena, G. B. (2016) 'Role of Zinc Supplementation in Testicular and Epididymal Damages in Diabetic Rat: Involvement of Nrf2, SOD1, and GPX5.', *Biological trace element research*, 173(2), pp. 452–464. doi: 10.1007/s12011-016-0674-7.
- Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. (2001) 'G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms.', *Trends in pharmacological sciences*, 22(7), pp. 368–376. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01678-3.
- Martinez Calejman, C. *et al.* (2011) 'Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFκB-dependent mechanism involving COX-2 activation.', *Molecular and cellular endocrinology*, 337(1–2), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.mce.2010.12.036.
- Mascaró, M. *et al.* (2021) 'Nuclear Localization of Heme Oxygenase-1 in Pathophysiological Conditions: Does It Explain the Dual Role in Cancer?', *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(1). doi: 10.3390/antiox10010087.
- Maślanka, T. (2013) 'Dexamethasone inhibits and meloxicam promotes proliferation of bovine NK cells.', *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 35(2), pp. 225–234. doi: 10.3109/08923973.2013.764504.
- Matzkin, M. E. *et al.* (2009) 'Testosterone induction of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression and prostaglandin F(2α) production in hamster Leydig cells.', *Reproduction*, 138(1), pp. 163–175. doi: 10.1530/REP-09-0023.
- Matzkin, M. E. *et al.* (2010) 'Cyclooxygenase-2 in testes of infertile men: evidence for the induction of prostaglandin synthesis by interleukin-1β.', *Fertility and sterility*, 94(5), pp. 1933–1936. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.01.039.
- Matzkin, M. E. *et al.* (2016) 'Alterations in oxidative, inflammatory and apoptotic events in short-lived and long-lived mice testes.', *Aging*, 8(1), pp. 95–110. doi: 10.18632/aging.100875.
- Matzkin, M. E. *et al.* (2019) 'β-adrenergic receptors in the up-regulation of COX2 expression and prostaglandin production in testicular macrophages: Possible relevance to male idiopathic infertility.', *Molecular and cellular endocrinology*, 498, p. 110545. doi: 10.1016/j.mce.2019.110545.
- Mazaud-Guittot, S. *et al.* (2013) 'Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent.', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(11), pp. E1757-67. doi: 10.1210/jc.2013-2531.
- McCoubrey, W. K. J., Huang, T. J. and Maines, M. D. (1997) 'Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3.', *European journal of biochemistry*, 247(2), pp. 725–732. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x.
- Mead, J. *et al.* (1986) 'Prostaglandins, thromboxanes, and prostacyclin.', in *Lipids: Chemistry, Biochemistry, and Nutrition*, pp. 149–216.
- Melmed, S. *et al.* (2018) *Williams Textbook of Endocrinology*. 13th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.
- Mendelson, C., Dufau, M. and Catt, K. (1975) 'Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells.', *The Journal of biological chemistry*, 250(22), pp. 8818–8823.
- Millena, A. C. *et al.* (2004) 'Autocrine regulation of steroidogenic function of Leydig cells by transforming growth factor-α.', *Molecular and cellular endocrinology*, 224(1–2), pp. 29–39. doi: 10.1016/j.mce.2004.07.004.

- Mitazaki, S. *et al.* (2018) 'Dimethylthiourea ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in ovariectomized mice.', *Biomedicine & pharmacotherapy*, 104, pp. 427–436. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.065.
- Mondillo, C. *et al.* (2005) 'Dual role of histamine in modulation of Leydig cell steroidogenesis via HRH1 and HRH2 receptor subtypes', *Biology of reproduction*, 73(5), pp. 899–907. doi: biolreprod.105.041285 [pii]r10.1095/biolreprod.105.041285.
- Mondillo, C. *et al.* (2007) 'Prolonged histamine deficiency in histidine decarboxylase gene knockout mice affects Leydig cell function.', *Journal of andrology*, 28(1), pp. 86–91. doi: 10.2164/jandrol.106.000257.
- Mondillo, C. *et al.* (2009) 'Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats.', *Biology of reproduction*, 80(1), pp. 144–52. doi: 10.1095/biolreprod.108.069484.
- Moniot, B. *et al.* (2014) 'Prostaglandin D2 acts through the Dp2 receptor to influence male germ cell differentiation in the foetal mouse testis.', *Development*, 141(18), pp. 3561–3571. doi: 10.1242/dev.103408.
- Montejo, C. *et al.* (2010) 'Effective antiproliferative effect of meloxicam on prostate cancer cells: development of a new controlled release system.', *International journal of pharmaceutics*, 387(1–2), pp. 223–229. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.036.
- Moradi-Marjaneh, R. *et al.* (2018) 'Phytosomal Curcumin Elicits Anti-tumor Properties Through Suppression of Angiogenesis, Cell Proliferation and Induction of Oxidative Stress in Colorectal Cancer.', *Current pharmaceutical design*, 24(39), pp. 4626–4638. doi: 10.2174/1381612825666190110145151.
- Müllers, E. *et al.* (2014) 'Nuclear translocation of Cyclin B1 marks the restriction point for terminal cell cycle exit in G2 phase', *Cell Cycle*, 13(17), pp. 2733–2743. doi: 10.4161/15384101.2015.945831.
- Muñoz-Sánchez, J. and Cháñez-Cárdenas, M. E. (2014) 'A review on hemoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response.', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, p. 604981. doi: 10.1155/2014/604981.
- Narumiya, S. (2007) 'Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors.', *Proceedings of the Japan Academy*, 83(9–10), pp. 296–319. doi: 10.2183/pjab/83.296.
- National Cancer Institute (2022) *PDQ Curcumin (Curcuma, Turmeric) and Cancer., PDQ® Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board.* Bethesda, MD.
- nee Pathak, N. D. and Lal, B. (2008) 'Nitric oxide: An autocrine regulator of Leydig cell steroidogenesis in the Asian catfish, *Clarias batrachus*.', *General and comparative endocrinology*, 158(2), pp. 161–167. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.06.009.
- Neeraja, S. *et al.* (2003) 'Expression of cyclooxygenase-2 in rat testis.', *Reproductive biomedicine online*, 6(3), pp. 302–309. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61849-4.
- Nelson, K. M. *et al.* (2017) 'The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin.', *Journal of medicinal chemistry*, 60(5), pp. 1620–1637. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975.
- Nguyen, T. *et al.* (2001) 'Discovery of a novel member of the histamine receptor family.', *Molecular pharmacology*, 59(3), pp. 427–433. doi: 10.1124/mol.59.3.427.
- Nieto-Alamilla, G. *et al.* (2016) 'The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function.', *Molecular pharmacology*, 90(5), pp. 649–673. doi: 10.1124/mol.116.104752.
- Niswender, G. D. *et al.* (2007) 'Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function.', *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, pp. 191–206. doi: 10.5661/rdr-vi-191.

- Noorafshan, A. *et al.* (2011) 'Ameliorative effects of curcumin on the structural parameters of seminiferous tubules and Leydig cells in metronidazole-treated mice: a stereological approach.', *Experimental and toxicologic pathology*, 63(7–8), pp. 627–633. doi: 10.1016/j.etp.2010.05.004.
- O'Hara, L. *et al.* (2015) 'Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(3), pp. 894–910. doi: 10.1096/fj.14-255729.
- O'Neill, G. P. and Ford-Hutchinson, A. W. (1993) 'Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues.', *FEBS letters*, 330(2), pp. 156–160. doi: 10.1016/0014-5793(93)80263-t.
- O'Reilly, M. *et al.* (2002) 'Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis.', *Journal of receptor and signal transduction research*, 22(1–4), pp. 431–448. doi: 10.1081/rrs-120014612.
- Ogawa, E. *et al.* (2017) 'Testicular gene expression of steroidogenesis-related factors in prepubertal, postpubertal, and aging dogs.', *Theriogenology*, 90, pp. 42–48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.007.
- Ohtsu, H. (2010) 'Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice.', *Advances in experimental medicine and biology*, 709, pp. 21–31. doi: 10.1007/978-1-4419-8056-4_3.
- Ozawa, N. *et al.* (2002) 'Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress.', *The Journal of clinical investigation*, 109(4), pp. 457–467. doi: 10.1172/JCI13190.
- Pagotto, R. M. *et al.* (2012) 'Proliferative Effect of Histamine on MA-10 Leydig Tumor Cells Mediated Through HRH2 Activation, Transient Elevation in cAMP Production, and Increased Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation Levels1', *Biology of Reproduction*, 87(6), pp. 1–10. doi: 10.1095/biolreprod.112.102905.
- Pang, Q. *et al.* (2010) 'Methylene chloride protects against cecal ligation and puncture-induced acute lung injury by modulating inflammatory mediators.', *International immunopharmacology*, 10(8), pp. 929–932. doi: 10.1016/j.intimp.2010.05.004.
- Parsons-Wingerter, P. *et al.* (1998) 'A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection.', *Microvascular research*, 55(3), pp. 201–214. doi: 10.1006/mvre.1998.2073.
- Parsons, M. E. and Ganellin, C. R. (2006) 'Histamine and its receptors.', *British journal of pharmacology*, 147 Suppl(Suppl 1), pp. S127–35. doi: 10.1038/sj.bjp.0706440.
- Payne, A. H., Downing, J. R. and Wong, K. L. (1980) 'Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells.', *Endocrinology*, 106(5), pp. 1424–1429. doi: 10.1210/endo-106-5-1424.
- Payne, A. H. and Hales, D. B. (2004) 'Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones', *Endocrine Reviews*, 25(6), pp. 947–970. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/er.2003-0030>.
- Payne, A. H. and Hardy, M. P. (2007) *The Leydig Cell in Health and Disease*. Humana Press. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7_5.
- Payne, A. H. and Sha, L. L. (1991) 'Multiple mechanisms for regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase, 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultur', *Endocrinology*, 129(3), pp. 1429–1435. doi: 10.1210/endo-129-3-1429.

- Perrotta, I. *et al.* (2012) 'Expression of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 in human male gametes from normal patients, and those with varicocele and diabetes: a potential molecular marker for diagnosing male infertility disorders.', *Journal of anatomy*, 221(3), pp. 209–220. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01534.x.
- Piantadosi, C. A. (2008) 'Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress.', *Free radical biology & medicine*, 45(5), pp. 562–569. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.013.
- Pignataro, O. and Ascoli, M. (1990) 'Epidermal growth factor increases the labeling of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate in MA-10 Leydig tumor cells.', *The Journal of Biological Chemistry*, 265(3), pp. 1718–23.
- Pignataro, O. P. *et al.* (1983) 'Mitochondrial biosynthesis of cholesterol in Leydig cells from rat testis.', *Molecular and cellular endocrinology*, 33(1), pp. 53–67. doi: 10.1016/0303-7207(83)90056-4.
- Piotrkowski, B. *et al.* (2009) 'Effects of heme oxygenase isozymes on Leydig cells steroidogenesis', *Journal of Endocrinology*, 203(1), pp. 155–165. doi: 10.1677/JOE-09-0061.
- Pisoschi, A. M. and Pop, A. (2015) 'The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review.', *European journal of medicinal chemistry*, 97, pp. 55–74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- Plianbangchang, P., Tungpradit, W. and Tiyaboonchai, W. (2007) 'Efficacy and Safety of Curcuminoids Loaded Solid Lipid Nanoparticles Facial Cream as an Anti-aging Agent', *Naresuan University Journal*, 15(2). Available at: <http://www.journal.nu.ac.th/NUJST/article/view/173>.
- Podesta, E. J., Dufau, M. L. and Catt, K. J. (1976) 'Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase of Leydig cells: in vitro activation and relationship to gonadotropin action upon cyclic AMP and steroidogenesis.', *FEBS letters*, 70(1), pp. 212–216. doi: 10.1016/0014-5793(76)80760-0.
- Pomeranic, Y. *et al.* (2004) 'Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells.', *The Journal of endocrinology*, 180(1), pp. 113–124. doi: 10.1677/joe.0.1800113.
- Prasad, S., Tyagi, A. K. and Aggarwal, B. B. (2014) 'Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice.', *Cancer research and treatment*, 46(1), pp. 2–18. doi: 10.4143/crt.2014.46.1.2.
- Prince, F. P. (1990) 'Ultrastructural evidence of mature Leydig cells and Leydig cell regression in the neonatal human testis.', *The Anatomical record*, 228(4), pp. 405–417. doi: 10.1002/ar.1092280406.
- Privalle, C. T., Crivello, J. F. and Jefcoate, C. R. (1983) 'Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(3), pp. 702–706. doi: 10.1073/pnas.80.3.702.
- Priyadarsini, K. I. (2014) 'The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent', *Molecules*, 19(12), pp. 20091–20112. doi: 10.3390/molecules191220091.
- Przybyła, G. W., Szychowski, K. A. and Gmiński, J. (2020) 'Paracetamol - An old drug with new mechanisms of action.', *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. doi: 10.1111/1440-1681.13392.
- Del Punta, K., Charreau, E. H. and Pignataro, O. P. (1996) 'Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis', *Endocrinology*, 137(12), pp. 5337–5343.
- Rajitha, B. *et al.* (2016) 'Inhibition of NF-κB translocation by curcumin analogs induces G0/G1 arrest and downregulates thymidylate synthase in colorectal cancer.', *Cancer letters*, 373(2), pp. 227–233. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.052.

- Rao, R. M. *et al.* (2003) 'Differential regulation of steroid hormone biosynthesis in R2C and MA-10 Leydig tumor cells: role of SR-B1-mediated selective cholesteryl ester transport.', *Biology of reproduction*, 68(1), pp. 114–121. doi: 10.1095/biolreprod.102.007518.
- Rebourcet, D. *et al.* (2017) 'Sertoli Cell Number Defines and Predicts Germ and Leydig Cell Population Sizes in the Adult Mouse Testis.', *Endocrinology*, 158(9), pp. 2955–2969. doi: 10.1210/en.2017-00196.
- Rehman, A., Pacher, P. and Haskó, G. (2021) 'Role of Macrophages in the Endocrine System.', *Trends in endocrinology and metabolism*, 32(4), pp. 238–256. doi: 10.1016/j.tem.2020.12.001.
- Rheinlaender, C. *et al.* (2006) 'Changing expression of cyclooxygenases and prostaglandin receptor EP4 during development of the human ductus arteriosus.', *Pediatric research*, 60(3), pp. 270–275. doi: 10.1203/01.pdr.0000233066.28496.7c.
- Rochette, L. *et al.* (2013) 'Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications.', *Pharmacology & therapeutics*, 137(2), pp. 133–152. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.09.007.
- Ross, J. H. (2009) 'Prepubertal testicular tumors.', *Urology*, 74(1), pp. 94–99. doi: 10.1016/j.urology.2008.12.036.
- Ross, M. H. and Pawlina, W. (2015) *Histology. A Text and Atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology*. 7th ed. Barcelona: Wolters Kluwer Health.
- Rossi, S. P. *et al.* (2016) 'Reactive oxygen species (ROS) production triggered by prostaglandin D2 (PGD2) regulates lactate dehydrogenase (LDH) expression/activity in TM4 Sertoli cells.', *Molecular and cellular endocrinology*, 434, pp. 154–165. doi: 10.1016/j.mce.2016.06.021.
- Rossitto, M. *et al.* (2015) 'Multiple roles of the prostaglandin D2 signaling pathway in reproduction.', *Reproduction*, 149(1), pp. R49–58. doi: 10.1530/REP-14-0381.
- Le Roy, C. *et al.* (1999) 'Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 69(1–6), pp. 379–384. doi: 10.1016/s0960-0760(99)00075-8.
- Ruf, C. G. *et al.* (2020) 'Leydig-cell tumour of the testis: retrospective analysis of clinical and therapeutic features in 204 cases.', *World journal of urology*, 38(11), pp. 2857–2862. doi: 10.1007/s00345-020-03079-1.
- Ryter, S. W. (2021) 'Heme Oxygenase-1, a Cardinal Modulator of Regulated Cell Death and Inflammation.', *Cells*, 10(3). doi: 10.3390/cells10030515.
- Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. K. (2006) 'Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications', *Physiology Reviews*, 86(2), pp. 583–650. doi: 10.1152/physrev.00011.2005.
- Sacca, P. *et al.* (2007) 'Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer.', *British journal of cancer*, 97(12), pp. 1683–1689. doi: 10.1038/sj.bjc.6604081.
- Saez, J. M. (1994) 'Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation.', *Endocrine reviews*, 15(5), pp. 574–626. doi: 10.1210/edrv-15-5-574.
- Sanchez, R. *et al.* (2014) 'Crosstalk between nitric oxide synthases and cyclooxygenase 2 in the adrenal cortex of rats under lipopolysaccharide treatment.', *Endocrine*, 46(3), pp. 659–667. doi: 10.1007/s12020-013-0104-y.
- Sandhoff, T. W. and McLean, M. P. (1999) 'Repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF2alpha is modulated by the negative transcription factor DAX-1.', *Endocrine*, 10(1), pp. 83–91. doi: 10.1385/ENDO:10:1:83.

- Sanna, M. D. *et al.* (2017) 'Histamine H(4) receptor agonist-induced relief from painful peripheral neuropathy is mediated by inhibition of spinal neuroinflammation and oxidative stress.', *British journal of pharmacology*, 174(1), pp. 28–40. doi: 10.1111/bph.13644.
- Sansone, A. *et al.* (2018) 'Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility.', *Reproductive biology and endocrinology*, 16(1), p. 3. doi: 10.1186/s12958-018-0320-7.
- Sass, G. *et al.* (2003) 'Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice.', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(4), pp. 909–918. doi: 10.1053/jhep.2003.50386.
- Schell, C. *et al.* (2007) 'A prostaglandin D2 system in the human testis.', *Fertility and sterility*, 88(1), pp. 233–236. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.100.
- Seidel, P. *et al.* (2010) 'DMF inhibits PDGF-BB induced airway smooth muscle cell proliferation through induction of heme-oxygenase-1.', *Respiratory research*, 11(1), p. 145. doi: 10.1186/1465-9921-11-145.
- Sha, J. *et al.* (2016) 'Curcumin induces G0/G1 arrest and apoptosis in hormone independent prostate cancer DU-145 cells by down regulating Notch signaling.', *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 84, pp. 177–184. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.037.
- Shah, B. H. *et al.* (1999) 'Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca²⁺ signaling.', *Biochemical pharmacology*, 58(7), pp. 1167–1172. doi: 10.1016/s0006-2952(99)00206-3.
- Sharifi-Rad, J. *et al.* (2020) 'Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications.', *Frontiers in pharmacology*, 11, p. 1021. doi: 10.3389/fphar.2020.01021.
- Shaul, D. B. *et al.* (1997) 'Surgical treatment of testicular trauma: effects on fertility and testicular histology.', *Journal of pediatric surgery*, 32(1), pp. 84–87. doi: 10.1016/s0022-3468(97)90101-9.
- Shinn, E. H. *et al.* (2010) 'Testis cancer survivors' health behaviors: comparison with age-matched relative and demographically matched population controls.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(13), pp. 2274–2279. doi: 10.1200/JCO.2009.23.9608.
- Shiraishi, K. and Naito, K. (2005) 'Increased expression of Leydig cell haem oxygenase-1 preserves spermatogenesis in varicocele.', *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(9), pp. 2608–2613. doi: 10.1093/humrep/dei063.
- Shishodia, S. *et al.* (2005) 'Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma.', *Biochemical pharmacology*, 70(5), pp. 700–713. doi: 10.1016/j.bcp.2005.04.043.
- Silva, N. C. *et al.* (2021) 'Catalytically active phospholipase A(2) myotoxin from *Crotalus durissus terrificus* induces proliferation and differentiation of myoblasts dependent on prostaglandins produced by both COX-1 and COX-2 pathways.', *International journal of biological macromolecules*, 187, pp. 603–613. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.121.
- Simmons, D. L., Botting, R. M. and Hla, T. (2004) 'Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.', *Pharmacological reviews*, 56(3), pp. 387–437. doi: 10.1124/pr.56.3.3.
- Sirianni, R. *et al.* (2009) 'Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates aromatase activity and decreases proliferation of Leydig tumor cells.', *The Journal of biological chemistry*, 284(42), pp. 28905–28916. doi: 10.1074/jbc.M109.041020.

- Smith, W. L. and Langenbach, R. (2001) 'Why there are two cyclooxygenase isozymes.', *The Journal of clinical investigation*, 107(12), pp. 1491–1495. doi: 10.1172/JCI13271.
- Soderling, S. H. and Beavo, J. A. (2000) 'Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions.', *Current opinion in cell biology*, 12(2), pp. 174–179. doi: 10.1016/s0955-0674(99)00073-3.
- Song, K.-H. *et al.* (2004) 'The Atypical Orphan Nuclear Receptor DAX-1 Interacts with Orphan Nuclear Receptor Nur77 and Represses Its Transactivation', *Molecular Endocrinology*, 18(8), pp. 1929–1940. doi: 10.1210/me.2004-0043.
- Sriraman, V., Anbalagan, M. and Rao, A. J. (2005) 'Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: A dynamic interplay between gonadotrophins and testicular factors', *Reproductive BioMedicine Online*, 11(4), pp. 507–518. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61147-9.
- Stocco, D. and Clark, B. (1996) 'Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells.', *Endocrine Reviews*, 17(3), pp. 221–44.
- Stocco, D. M. (2000) 'The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future.', *The Journal of endocrinology*, 164(3), pp. 247–253. doi: 10.1677/joe.0.1640247.
- Stocco, D. M. (2001) 'StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis.', *Annual review of physiology*, 63, pp. 193–213. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.193.
- Suzuki-Yamamoto, T. *et al.* (2007) 'Co-localization of prostaglandin F synthase, cyclooxygenase-1 and prostaglandin F receptor in mouse Leydig cells.', *Histochemistry and cell biology*, 128(4), pp. 317–322. doi: 10.1007/s00418-007-0316-4.
- Svechnikov, K. *et al.* (2010) 'Origin, development and regulation of human leydig cells', *Hormone Research in Paediatrics*, 73(2), pp. 93–101. doi: 10.1159/000277141.
- Teerds, K. *et al.* (1989) 'Turnover time of Leydig cells and other interstitial cells in testes of adult rats.', *Archives of andrology*, 23(2), pp. 105–111. doi: 10.3109/01485018908986831.
- Teerds, K. J. and Huhtaniemi, I. T. (2015) 'Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates.', *Human reproduction update*, 21(3), pp. 310–328. doi: 10.1093/humupd/dmv008.
- Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R. (1969) 'Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme.', *The Journal of biological chemistry*, 244(23), pp. 6388–6394.
- Trakshel, G. M. and Maines, M. D. (1988) 'Detection of two heme oxygenase isoforms in the human testis.', *Biochemical and biophysical research communications*, 154(1), pp. 285–291. doi: 10.1016/0006-291x(88)90682-1.
- Tu, Y.-P. *et al.* (2011) 'Simvastatin induces the expression of hemeoxygenase-1 against ischemia-reperfusion injury on the testes in rats.', *Toxicology letters*, 207(3), pp. 242–250. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.09.016.
- Vaziri, N. D. and Rodríguez-Iturbe, B. (2006) 'Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension.', *Nature clinical practice. Nephrology*, 2(10), pp. 582–593. doi: 10.1038/ncpneph0283.
- Vega, A. *et al.* (2012) 'Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures.', *Frontiers in endocrinology*, 3, p. 150. doi: 10.3389/fendo.2012.00150.
- Verger, P. *et al.* (1998) 'Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additives in France.', *Food additives and contaminants*, 15(7), pp. 759–766. doi: 10.1080/02652039809374707.
- Vogel, A. and Pelletier, J. (1815) 'Examen chimique de la racine de Curcuma', *Journal de Pharmacie*, 1, pp. 289–300.

- van Vugt, M. A. T. M. and Yaffe, M. B. (2010) 'Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: giving it some gas to shut off the breaks!', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(11), pp. 2097–2101. doi: 10.4161/cc.9.11.11840.
- Wang, X. *et al.* (2000) 'The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression.', *The Journal of biological chemistry*, 275(26), pp. 20204–20209. doi: 10.1074/jbc.M003113200.
- Wang, X. *et al.* (2003) 'Inhibition of cyclooxygenase-2 activity enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory gene expression in MA-10 mouse Leydig cells.', *Endocrinology*, 144(8), pp. 3368–3375. doi: 10.1210/en.2002-0081.
- Wang, X. *et al.* (2005) 'Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis.', *Endocrinology*, 146(10), pp. 4202–4208. doi: 10.1210/en.2005-0298.
- Wang, X. J. *et al.* (2002) 'Interaction between arachidonic acid and cAMP signaling pathways enhances steroidogenesis and StAR gene expression in MA-10 Leydig tumor cells.', *Molecular and cellular endocrinology*, 188(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00748-1.
- Wang, X. J. *et al.* (2003) 'Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression.', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85(2–5), pp. 159–166. doi: 10.1016/s0960-0760(03)00189-4.
- Waza, A. A. *et al.* (2018) 'A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil.', *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 67(7), pp. 579–588. doi: 10.1007/s00011-018-1151-x.
- Wegiel, B. *et al.* (2014) 'Heme Oxygenase-1: A Metabolic Nike', *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(11), pp. 1709–1722. doi: 10.1089/ars.2013.5667.
- Welter, H. *et al.* (2013) 'Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients.', *Andrology*, 1(2), pp. 318–324. doi: 10.1111/j.2047-2927.2012.00030.x.
- Winnall, W. R. *et al.* (2007) 'Constitutive expression of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by somatic and spermatogenic cells is responsible for prostaglandin E2 production in the adult rat testis.', *Biology of reproduction*, 76(5), pp. 759–768. doi: 10.1095/biolreprod.106.053124.
- Xu, W. *et al.* (2018) 'Calretinin Participates in Regulating Steroidogenesis by PLC-Ca(2+)-PKC Pathway in Leydig Cells.', *Scientific reports*, 8(1), p. 7403. doi: 10.1038/s41598-018-25427-3.
- Xu, X.-Y. *et al.* (2018) 'Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives.', *Nutrients*, 10(10). doi: 10.3390/nu10101553.
- Yadav, C. H. *et al.* (2015) 'Cardioprotective role of H₃R agonist imetit on isoproterenol-induced hemodynamic changes and oxidative stress in rats.', *Toxicology mechanisms and methods*, 25(4), pp. 235–240. doi: 10.3109/15376516.2014.997946.
- Yan, Y. *et al.* (2020) 'Carbon Monoxide Inhibits T Cell Proliferation by Suppressing Reactive Oxygen Species Signaling.', *Antioxidants & redox signaling*, 32(7), pp. 429–446. doi: 10.1089/ars.2019.7814.
- Yang, S.-H. *et al.* (2019) 'Sulforaphane Protect Against Cadmium-Induced Oxidative Damage in mouse Leydig Cells by Activating Nrf2/ARE Signaling Pathway.', *International journal of molecular sciences*, 20(3). doi: 10.3390/ijms20030630.
- Yang, S. *et al.* (2007) 'The protective role of heme oxygenase-1 induction on testicular tissues after testicular torsion and detorsion.', *The Journal of urology*, 177(5), pp. 1928–1933. doi: 10.1016/j.juro.2007.01.015.

- Yang, S. H. *et al.* (2019) 'Protective role of curcumin in cadmium-induced testicular injury in mice by attenuating oxidative stress via Nrf2/ARE pathway.', *Environmental science and pollution research international*, 26(33), pp. 34575–34583. doi: 10.1007/s11356-019-06587-9.
- Yao, H. H.-C., Whoriskey, W. and Capel, B. (2002) 'Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis.', *Genes & development*, 16(11), pp. 1433–1440. doi: 10.1101/gad.981202.
- Yazawa, T. *et al.* (2019) 'Cyclooxygenase-2 is acutely induced by CCAAT/enhancer-binding protein β to produce prostaglandin E (2) and F (2 α) following gonadotropin stimulation in Leydig cells.', *Molecular reproduction and development*, 86(7), pp. 786–797. doi: 10.1002/mrd.23163.
- Ye, L. *et al.* (2017) 'Insights into the development of the adult Leydig cell lineage from stem Leydig cells', *Frontiers in Physiology*, 8(JUN), pp. 1–18. doi: 10.3389/fphys.2017.00430.
- Yildizbayrak, N. and Erkan, M. (2019) 'Therapeutic effect of curcumin on acrylamide-induced apoptosis mediated by MAPK signaling pathway in Leydig cells.', *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 33(7), p. e22326. doi: 10.1002/jbt.22326.
- Yoshida, T., Ishikawa, K. and Sato, M. (1991) 'Degradation of heme by a soluble peptide of heme oxygenase obtained from rat liver microsomes by mild trypsinization.', *European journal of biochemistry*, 199(3), pp. 729–733. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16177.x.
- Yoshida, T. and Migita, C. T. (2000) 'Mechanism of heme degradation by heme oxygenase.', *Journal of inorganic biochemistry*, 82(1–4), pp. 33–41. doi: 10.1016/s0162-0134(00)00156-2.
- Zerani, M. *et al.* (2011) 'In vitro effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on Leydig cells of adult alpaca (*Lama pacos*) testis: GnRH receptor immunolocalization, testosterone and prostaglandin synthesis, and cyclooxygenase activities.', *Domestic animal endocrinology*, 40(1), pp. 51–59. doi: 10.1016/j.domaniend.2010.08.006.
- Zhang, C. *et al.* (2018) 'Curcumin induces apoptosis and inhibits angiogenesis in murine malignant mesothelioma.', *International journal of oncology*, 53(6), pp. 2531–2541. doi: 10.3892/ijo.2018.4569.
- Zhang, F. *et al.* (2014) 'Curcumin attenuates angiogenesis in liver fibrosis and inhibits angiogenic properties of hepatic stellate cells.', *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(7), pp. 1392–1406. doi: 10.1111/jcmm.12286.
- Zhou, H. *et al.* (2021) 'Curcumin promotes cell cycle arrest and apoptosis of acute myeloid leukemia cells by inactivating AKT.', *Oncology reports*, 45(4). doi: 10.3892/or.2021.7962.
- Zhu, Y. and Bu, S. (2017) 'Curcumin Induces Autophagy, Apoptosis, and Cell Cycle Arrest in Human Pancreatic Cancer Cells.', *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2017, p. 5787218. doi: 10.1155/2017/5787218.