

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE HIDROXIESTRADIOLES Y METOXIESTRADIOLES SOBRE LA  
VIABILIDAD DE CÉLULAS DE LEYDIG AISLADAS.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**CECILIA HERMINDA VALENCIA ROBLES**

**TEMUCO-CHILE**

**2014**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE HIDROXIESTRADIOLES Y METOXIESTRADIOLES SOBRE LA  
VIABILIDAD DE CÉLULAS DE LEYDIG AISLADAS.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias  
Agropecuarias y Forestales de la Universidad  
de La Frontera. Como parte de los requisitos  
para optar al título de Biotecnólogo.

**CECILIA HERMINDA VALENCIA ROBLES**  
**PROFESOR GUÍA: Dr. ALEXIS PARADA BUSTAMANTE**

**TEMUCO-CHILE**

**2014**

"EFECTO DE HIDROXIESTRADIOLES Y METOXIESTRADIOLES SOBRE LA  
VIABILIDAD DE CÉLULAS DE LEYDIG AISLADAS"

PROFESOR GUÍA

: \_\_\_\_\_  
Alexis Parada Bustamante  
Dr. en Ciencias Biológicas  
Profesor Asistente  
Instituto de Investigaciones Materno  
Infantil, Universidad de Chile

PROFESOR CONSEJERO

: \_\_\_\_\_  
Jorge Farías Avendaño  
Dr. en Biotecnología  
Profesor Asociado  
Depto. de Ingeniería Química  
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi gratitud con las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo de tesis, ya que sin su ayuda, motivación, apoyo y cariño no hubiese sido posible el término de este proceso.

Principalmente agradecer a Yanet Silva por su apoyo incondicional durante todos mis años de estudio, por el esfuerzo y amor que ha dedicado a la crianza de mi hijo Felipe y la confianza que puso en este proyecto y en mí desde el comienzo al fin de este. A Omar Figueroa, padre de mi hijo y principal apoyo de mi vida.

Agradecer además a Jimena Conejeros y su familia, quienes me acogieron en la dificultad y fueron un apoyo sólido, que me permitió trabajar y sustentarme durante este periodo.

Agradecer a mi familia, mi madre quien a su manera me brindo apoyo, a mi padre que me enseñó el valor del esfuerzo y que el trabajo duro rinde frutos. A mis hermanos que también aportaron su grano de arena, espero que ellos también tengan la oportunidad que tuve, de adquirir conocimiento y sobre todo de tratar con tanta gente que de no ser por mi paso por esta Universidad no habría llegado a conocer y estimar, a Bárbara por su cariño y disposición a Ignacio, Fernando, Belén, Magdalena, Pedro y Victoria por su apoyo a pesar de la distancia.

Finalmente a mi profesor guía de tesis Dr Alexis Parada Bustamante, por la confianza puesta en mi trabajo, por la energía invertida en hacer de mi persona y de todos sus alumnos, mejores profesionales, por su comprensión, exigencia y simpatía, por el ambiente de trabajo que genera que finalmente se traduce en este trabajo tan productivo.

## ÍNDICE

Capítulo		Página
1.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
2.	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1	Estructura testicular.	3
2.2	Las células de Leydig.	3
2.3	Infertilidad masculina.	4
2.4	Disfunción de las células de Leydig como factor de infertilidad masculina.	5
2.5	Estradiol y su conversión a hidroxiestradioles y metoxiestradioles.	6
2.6	Hidroxiestradioles y metoxiestradioles son metabolitos de estradiol con actividad biológica.	9
2.7	Posible relación de una alterada producción de hidroxiestradioles y metoxiestradioles con infertilidad masculina.	10
3	<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	12
3.1	Hipótesis.	13
3.2	Objetivo general.	13
3.3	Objetivos específicos.	13
4	<b>METODOLOGÍA</b>	14
4.1	Dependencias.	14
4.2	Cultivo celular.	14

4.3	Drogas y metabolitos de estradiol.	15
4.4	Ensayo de MTS.	15
4.5	Ensayo de TUNEL.	16
4.6	Extracción de proteínas totales y western-blot.	17
4.7	Inmunohistoquímica.	21
4.8	Análisis estadístico.	24
5	<b>RESULTADOS.</b>	25
5.1	Estandarización condiciones óptimas de cultivo células TM3.	25
5.2	Expresión de CYP1A1, CYP1B1 y COMT en testículo de ratón y en células TM3.	26
5.3	Efecto de metabolitos de estradiol sobre la viabilidad de células TM3.	29
5.4	2OHE <sub>2</sub> , 2ME <sub>2</sub> y 4ME <sub>2</sub> inducen fragmentación del DNA en células TM3.	31
5.5	Participación de activación de procesos apoptóticos en la muerte celular inducida por 2OHE <sub>2</sub> , 2ME <sub>2</sub> , y 4ME <sub>2</sub> .	34
5.6	Evaluación de la participación del receptor de estrógenos y de un incremento del estrés oxidativo en la disminución de la viabilidad celular inducida por 2OHE <sub>2</sub> , 2ME <sub>2</sub> y 4ME <sub>2</sub> .	37

<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	41
<b>7</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	50
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Conversión secuencial de estradiol a hidroxiestradioles y a metoxiestradioles.
- Figura 2 Imagen representativa de células TM3 en cultivo.
- Figura 3 Expresión de la enzima COMT en la línea celular TM3 y en el testículo de ratón.
- Figura 4 Expresión de las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 en extracto celular de testículo de ratón y en un extracto proteico de células TM3 en condiciones basales.
- Figura 5 Expresión y localización de las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT en el testículo de ratón.
- Figura 6 Efecto de los metabolitos de estradiol sobre la viabilidad de las células TM3.
- Figura 7 Fotografías representativas del ensayo de TUNEL en células TM3.
- Figura 8 Cuantificación porcentaje de células TM3 TUNEL positivas.
- Figura 9 Fotografía representativa del ensayo de western blot para la detección de caspasa 3 en su forma escindida en células TM3 tratadas con los distintos metabolitos de estradiol o su vehículo.
- Figura 10 Fotografía representativa de un western blot para la detección de PARP en su forma escindida y no-escindida en células tratadas con los distintos metabolitos de estradiol o su vehículo y cuantificación de la relación PARP escindida/PARP no-escindida.
- Figura 11 Efecto de un antagonista del receptor de estrógenos (ICI182780) sobre la viabilidad de células TM3 tratadas con los distintos metabolitos de estradiol.
- Figura 12 Efecto del antioxidante N-Acetilcisteína (NAC) sobre la viabilidad de células TM3 tratadas por 24 horas con los distintos metabolitos de estradiol.

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1	Anticuerpos y condiciones utilizadas para ensayos de western blot
Tabla 2	Anticuerpos y condiciones utilizadas para ensayos de inmunohistoquímica

## RESUMEN

La infertilidad afecta a un 15% de las parejas a nivel mundial y en un 30% de los casos el origen de esta incapacidad reproductiva está asociada a una disfunción masculina. Una falla primaria de la espermatogénesis, la cual está definida como una falla testicular intrínseca en el proceso espermatogénico, es uno de los diagnósticos de infertilidad masculina más comunes en Chile; sin embargo, en alrededor de un 50 % de los casos la etiología de esta condición es aún desconocida.

Las células de Leydig son las encargadas de la producción hormonal en el testículo, por lo que una disminución en la viabilidad de este tipo celular y/o alteraciones en la producción de las hormonas producidas por ellas, gatillados por distintos factores internos y/o externos, podrían ser factores etiológicos de una falla espermatogénica primaria.

Estradiol ( $E_2$ ) es normalmente producido en el testículo de mamíferos por las células de Leydig a través de la aromatización de testosterona. Su metabolización a compuestos menos activos ocurre principalmente en el hígado. En tejidos periféricos,  $E_2$  también puede ser metabolizado a 2-Hidroxiestradiol ( $2OHE_2$ ) o a 4-Hidroxiestradiol ( $4OHE_2$ ) y luego a 2-Metoxiestradiol ( $2ME_2$ ) o a 4-Metoxiestradiol ( $4ME_2$ ). Estudios previos han determinado que las enzimas que producen estos metabolitos de estradiol se expresan en el testículo humano y que altas concentraciones de algunos de estos metabolitos afectan negativamente la viabilidad de espermatozoides y de las células de Sertoli, sugiriendo que un aumento anormal en las concentraciones intratesticulares de algunos de estos metabolitos podría estar relacionado con la etiología de la infertilidad masculina; sin embargo, ningún estudio ha determinado el efecto de estos metabolitos sobre la viabilidad de las células de Leydig.

El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar si las células de Leydig de ratón adulto y la línea celular TM3 (obtenida a partir de células de Leydig de ratón) tendrían la capacidad de producir hidroxiestradioles y metoxiestradioles para luego evaluar el efecto de distintas concentraciones de  $2OHE_2$ ,  $4OHE_2$ ,  $2ME_2$  y  $4ME_2$  sobre la viabilidad de las células de Leydig *in vitro* y los posibles mecanismos por los cuales estos metabolitos afectarían a las células de Leydig. Para esto último, utilizamos como modelo experimental la línea celular TM3.

Determinamos que las células de Leydig de ratón adulto, al igual que las células TM3 expresan las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT en un patrón similar al observado en testículo humano. Por otra parte a través de la evaluación de la reducción *in vivo* del compuesto 3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (Ensayo de MTS), determinamos que altas concentraciones de 2OHE<sub>2</sub> (10 y 20μM), 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> (20μM) disminuyeron significativamente la viabilidad de las células TM3 a las 24 horas de tratamiento, lo cual fue confirmado a través del ensayo de TUNEL.

2OHE<sub>2</sub> 10 μM, pero no 2OHE<sub>2</sub> 20 μM, indujo la escisión de caspasa 3 y PARP-1, sugiriendo que sólo 2OHE<sub>2</sub> 10 μM induce la activación de procesos apoptóticos dependientes de caspasas. Por otro lado, 2ME<sub>2</sub> 20 μM indujo la escisión de caspasa 3, pero no de PARP-1, sugiriendo que este metabolito activa procesos apoptóticos dependientes de caspasas que no desembocan en la escisión de PARP-1. Finalmente, 4ME<sub>2</sub> no indujo la escisión de caspasa 3 ni de PARP-1, sugiriendo que este metabolito disminuye la viabilidad de las células de Leydig a través de mecanismos que no involucran procesos apoptóticos dependientes de caspasas. Determinamos además que los mecanismos celulares por los cuales estos metabolitos de E<sub>2</sub> afectan negativamente la viabilidad de las células de Leydig serían independientes del receptor de estrógenos y no involucrarían un aumento del estrés oxidativo, ya que el efecto de 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> no fueron bloqueados por el antagonista del receptor de estrógenos ICI 182780, ni por el antioxidante N-Acetilcisteína.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que hidroxiestradioles y metoxiestradioles se producirían normalmente en el testículo de murinos al igual que en humanos y que estos se generarían principalmente en las células de Leydig; Sin embargo, altas concentraciones de 2OHE<sub>2</sub>, al igual que 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> disminuyen significativamente la viabilidad de las células de Leydig *in vitro* a través de diferentes mecanismos. Estos resultados, en conjunto a los previos obtenidos en nuestro laboratorio, confirmarían que un aumento en las concentraciones intratesticulares de estos metabolitos afectarían negativamente la fisiología testicular, lo cual podría estar relacionado con la etiología de la infertilidad masculina.

## SUMMARY

Infertility affects 15% of couples worldwide and a reproductive failure associated with a male dysfunction is responsible about 30% of these cases. A primary failure of spermatogenesis, defined as an intrinsic testicular failure in spermatogenesis process, is one of the most common causes of male infertility in Chile; however, the etiology of this condition is still unknown in about 50% of cases.

Leydig cells are responsible for hormone production in testis, reason by which a decrease in the viability of this cell type and/or alterations in its functioning, triggered by internal and/or external factors, could be an etiologic factor of a primary spermatogenic failure.

Estradiol ( $E_2$ ) is normally produced in mammalian testis by Leydig cells by aromatization of testosterone. Its metabolization to less active compounds occurs mainly in the liver. In peripheral tissues,  $E_2$  can also be metabolized to 2-hydroxyestradiol ( $2OHE_2$ ) or 4-hydroxyestradiol ( $4OHE_2$ ) and then to 2-methoxyestradiol ( $2ME_2$ ) or 4-methoxyestradiol ( $4ME_2$ ). Previous studies have determined that the enzymes that produce these estradiol metabolites are expressed in the human testis and high concentrations of some of these estradiol metabolites negatively affect the viability of sperm and Sertoli cells, suggesting that an abnormal increase of some of these metabolites at intratesticular level could be related to the etiology of male infertility; however, no studies have explored the effect of these metabolites on Leydig cells viability.

The aim of this investigation was to evaluate whether Leydig cells from adult mouse and TM3 cell line (obtained from mouse Leydig cells) would have the capacity to produce hydroxyestradiols and methoxyestradiols to then evaluate the effect of different concentrations of  $2OHE_2$ ,  $4OHE_2$ ,  $2ME_2$  and  $4ME_2$  on viability of Leydig cells *in vitro* and the possible mechanisms by which these metabolites affect Leydig cells. For the latter, we used the cell line TM3 as experimental model.

We determined that Leydig cells from of adult mice and TM3 cell expressed the enzymes CYP1A1, CYP1B1 and COMT in a similar pattern observed in human testis. Moreover by

evaluating reduction *in vivo* of the compound 3 - (4,5-Dimethyl-2-yl) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS assay), we determined that high concentrations of 2OHE<sub>2</sub> (10 and 20 μM), 2ME<sub>2</sub> (20 μM) and 4ME<sub>2</sub> (20 μM) significantly decreased the viability of TM3 cells 24 hours after treatment, a result that was confirmed by TUNEL assay.

2OHE<sub>2</sub> 10 μM induced the cleavage of both caspase-3 and PARP-1, suggesting that 2OHE<sub>2</sub> 10 μM induces death cell by caspase-dependent apoptotic pathways. Furthermore, 2ME<sub>2</sub> 20 μM, induces cleavage of caspase 3, but not cleavage of PARP-1, suggesting that this metabolite activates caspase-dependent apoptotic pathways which do not lead in the cleavage of PARP-1. Finally, 4ME<sub>2</sub> does not induce cleavage of caspase-3 and PARP-1, suggesting that this metabolite decrease the viability of Leydig cells through mechanisms that do not involve caspase dependent apoptotic processes. We also determined that the cellular mechanisms by which these E<sub>2</sub> metabolites negatively affect the viability of Leydig cells are estrogen receptor independent and do not involve an intracellular oxidative stress increase, because the effects of 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> and 4ME<sub>2</sub> were not blocked by either the estrogen antagonist receptor ICI 182780 or by the antioxidant N-Acetylcysteine.

The results obtained in this thesis indicate that hydroxyestradiols and methoxyestradiols normally occur in the murine testis as in humans and that these are mainly occur in the Leydig cells, however high concentrations of 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> and 4ME<sub>2</sub> significantly decrease the viability of Leydig cells *in vitro* different mechanisms. These and other results previously obtained in our laboratory confirm that an increase in the intratesticular concentrations of these estradiol metabolites would negatively affect the testicular physiology and this condition may be related to the etiology of male infertility.

## 1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país la disminución de la tasa de natalidad es un tema preocupante a nivel de salud y políticas públicas. Esta llega a 1,9 hijos por mujer lo que puede impactar negativamente en la calidad de vida de las generaciones futuras debido a la disminución de la población laboralmente activa. Las razones de este comportamiento demográfico se explican en parte por cambios en el estilo de vida de la sociedad como el retraso en la edad para tener hijos, por hábitos poco saludables y por la presencia de contaminantes ambientales.

Una de las causas de esta menor tasa de natalidad son problemas de infertilidad en la pareja, la cual afecta a un 15% del total de parejas que intentan tener un hijo. Diversos estudios han determinado que una disfunción masculina es el factor responsable en alrededor de un 30% de esta incapacidad reproductiva. Se han identificado varios agentes etiológicos de la infertilidad masculina, como por ejemplo la exposición a compuestos tóxicos, mutaciones genéticas y microdeleciones del cromosoma Y; sin embargo, los agentes que generan esta condición son desconocidos en cerca del 50% de los casos.

Una de las principales características observadas en hombres con problemas de infertilidad es la alteración en la producción de las hormonas sexuales y los mecanismos por cuales estas actúan en sus células blanco. En el testículo de mamíferos, las células de Leydig son las encargadas de producir la mayoría de las hormonas esteroidales claves para el proceso espermatogénico. Se ha determinado que alteraciones en el funcionamiento y/o en la viabilidad de las células de Leydig generan infertilidad masculina; sin embargo, los factores fisiológicos y/o medioambientales que ejercen efectos deletéreos sobre las células de Leydig y los mecanismos por los cuales estos actúan no han sido completamente identificados.

Estradiol ( $E_2$ ) es una hormona producida normalmente en el testículo de mamíferos, principalmente en las células de Leydig, por la conversión de testosterona a través de la enzima Aromatasa. En diversos tejidos, estradiol puede ser inactivado a través de su conversión a compuestos con menor actividad estrogénica por diferentes reacciones enzimáticas. Entre los metabolitos de  $E_2$  más estudiados se encuentran los hidroxiestradioles y los metoxiestradioles.

Evidencia experimental indica que un aumento en la producción de estos metabolitos de estradiol a nivel intratesticular estaría relacionado a infertilidad masculina. Por ejemplo, en nuestro laboratorio hemos establecido que las enzimas que generan hidroxiestradioles y metoxiestradioles se expresan en el testículo humano y que altas concentraciones de algunos de estos metabolitos disminuyen la viabilidad de las células de Sertoli; sin embargo el efecto de estos últimos sobre las células de Leydig no ha sido dilucidado.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estructura testicular

La estructura del testículo de mamíferos está conformada por dos compartimentos anatómicamente distintos, los túbulos seminíferos y el intersticio. Los túbulos seminíferos son las unidades funcionales del testículo, ya que es el lugar donde ocurre la espermatogénesis. Alrededor del 90% del peso de cada testículo es generado por los túbulos seminíferos y su estructura básica consiste de una capa de células mioides peritubulares, de las células germinales y de las células de Sertoli.

Entre los túbulos seminíferos se encuentra el denominado intersticio o espacio intersticial, lugar donde se ubican los capilares sanguíneos, macrófagos y principalmente las células de Leydig, las cuales son las encargadas de producir las hormonas esteroidales (especialmente estradiol y testosterona) que son claves para el desarrollo de la espermatogénesis. A pesar de la separación anatómica entre los túbulos seminíferos y el espacio intersticial, estos están funcionalmente acoplados por vías endocrinas y paracrinas (Ge et al., 2009).

### 2.2 Las células de Leydig.

La célula de Leydig fue descrita por primera vez por el histólogo alemán Franz Leydig en 1850 y su principal función es la síntesis de testosterona. Estas células presentan una cito-arquitectura típica de las células secretoras de hormonas esteroidales; tales como un abundante retículo endoplasmático liso, numerosas mitocondrias, abundantes gotas lipídicas en el citoplasma y un núcleo en posición excéntrica con heterocromatina periférica y un nucléolo evidente (Schulze, 1984)

La síntesis de testosterona involucra varias reacciones enzimáticas y varias de las enzimas responsables para la generación de testosterona están presentes en diferentes tipos celulares; sin embargo, la célula de Leydig es la única capaz de producir testosterona a partir de la captación y modificación enzimática de la molécula de colesterol.

La esteroidogénesis en las células de Leydig adultas es principalmente controlada por la hormona Luteinizante (LH), la cual es sintetizada en la adenohipófisis y cuya producción y liberación a la vez es regulada por la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), sintetizada en el hipotálamo (Cooke et al., 1992). En la célula de Leydig, la LH interactúa con el receptor de LH ubicado en la membrana plasmática, lo cual induce la activación de la enzima adenilato ciclasa y un aumento intracelular del segundo mensajero AMP cíclico. Las principales vías por las cuales LH estimula la síntesis de testosterona a través de un aumento en los niveles de AMPc es incrementando la síntesis y activación de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) en la membrana interna de las mitocondrias presentes en las células de Leydig, lo cual permite la translocación de la molécula de colesterol desde el citosol al interior de la mitocondria (Lin et al., 1995, Sugawara et al., 1995, Stocco and Clark, 1996) y aumentando la síntesis de la enzima p450 scc, la cual es la encargada de convertir colesterol a pregnenolona, la primera reacción enzimática de la vía esteroidogénica para generar testosterona (Rouiller et al., 1990). Además de inducir un aumento intracelular de AMPc, la LH activa otros sistemas de señalización intracelulares en las células de Leydig, incluyendo la liberación de calcio desde compartimentos internos y la síntesis de ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos, los cuales también regularían la vía esteroidogénica encargada de generar testosterona (Cooke et al., 1992).

### **2.3 Infertilidad masculina.**

La infertilidad, definida como la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo después de 1 año de exposición al coito sin anticoncepción, afecta a un 15% de las parejas a nivel mundial según lo reportado por la OMS. Estudios epidemiológicos han determinado que en alrededor de un 30% de los casos, el origen de esta incapacidad reproductiva está asociada a una disfunción masculina (Wong et al., 2000), siendo una falla primaria de la espermatogénesis (definida como

una falla testicular intrínseca en el proceso espermatogénico), uno de los diagnósticos de infertilidad masculina más comunes en Chile (Devoto et al., 2000). La exposición a compuestos tóxicos, mutaciones genéticas y microdeleciones del cromosoma Y han sido identificadas como las principales causas de la falla primaria en la espermatogénesis (Jurewicz et al., 2009); sin embargo, en alrededor de un 30 % de los casos la etiología es aún desconocida. (Devoto et al., 2000).

#### **2.4 Disfunción de las células de Leydig como factor de infertilidad masculina.**

Las células de Leydig son la principal fuente de producción de las llamadas hormonas sexuales en el hombre, especialmente de la testosterona (Ge et al., 2009). Se ha determinado que la testosterona es esencial para la espermatogénesis, ya que mutaciones genéticas del receptor de andrógenos que alteran negativamente su funcionalidad y/o una disminución en las concentraciones séricas de testosterona están asociadas con fallas en el proceso espermatogénico (Zhang et al., 2012). Además, entre el 12 y el 15% de los hombres que presentan una falla espermatogénica primaria presentan bajos niveles de testosterona (Andersson et al., 2004).

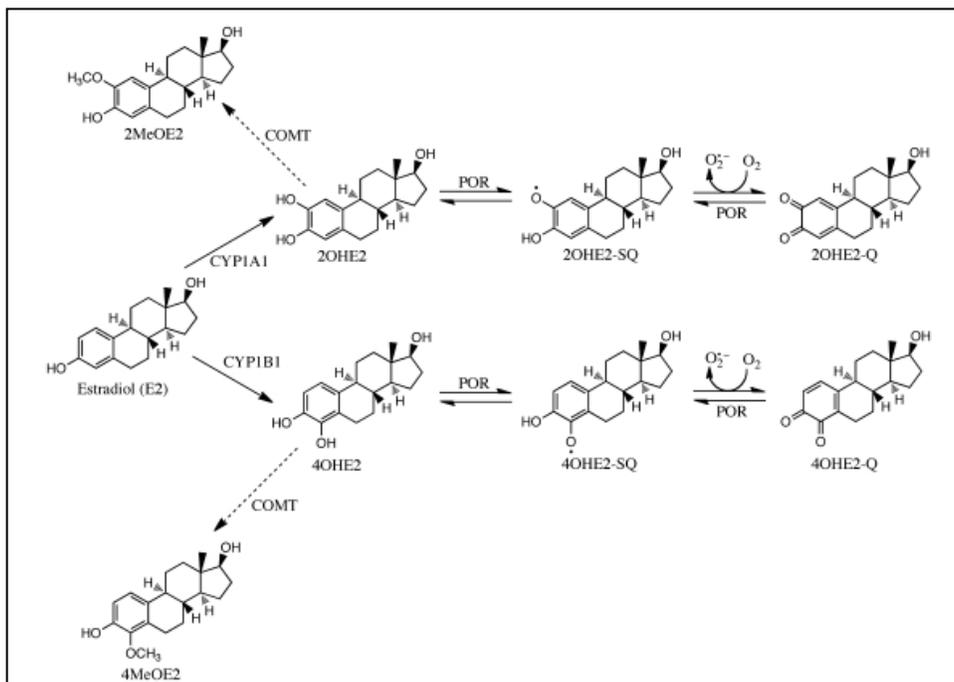
En un importante número de casos, el mecanismo por el cual distintos compuestos inducen una falla espermatogénica primaria involucra alteraciones en el funcionamiento de las células de Leydig. Por ejemplo, se ha reportado que algunos disruptores endocrinos que inducen infertilidad masculina, tales como Benzopirenos y Bisfenol A, generan sus efectos disminuyendo la viabilidad de las células de Leydig, lo cual provoca una disminución en los niveles de testosterona (Dankers et al., 2013, N'Tumba-Byn et al., 2012, Chung et al., 2011, Li et al., 2009, Stoker et al., 2000). Este mismo mecanismo es el que ejercen ciertos elementos químicos considerados contaminantes ambientales para inducir infertilidad masculina, tales como el cadmio (Yang et al., 2003, Zhang et al., 2011b), el níquel (Krockova et al., 2011) y el manganeso (Cheng et al., 2003).

Los mecanismos intracelulares por los cuales estos y otros compuestos afectan el funcionamiento y viabilidad de las células de Leydig involucran una disminución en la expresión de algunas enzimas claves en el proceso esteroideogénico, tales como StAR y 3 $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa (Chung et al., 2011, Fowler et al., 2007) y la activación de procesos apoptóticos dependientes de caspasas (Li et al., 2009). Se ha determinado que la activación de los procesos apoptóticos involucra generalmente un aumento previo del estrés oxidativo, lo cual es producido por un incremento en las especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular (Aggarwal et al., 2010, Aggarwal et al., 2012, Ozen et al., 2008, Abou-Donia et al., 2003)

## **2.5 Estradiol y su conversión a hidroxiestradiol y metoxiestradiol.**

El testículo de mamíferos normalmente produce estradiol ( $E_2$ ) a partir de testosterona a través del complejo enzimático Aromatasa, el cual se expresa en las células de Sertoli, Leydig y germinales (Lardone et al., 2010). En general, la acción del estradiol en sus células blanco termina cuando es transformado a compuestos más hidrofílicos a través de reacciones enzimáticas de oxidación y conjugación, las cuales incluyen sulfonaciones, O-metilaciones, hidroxilaciones y glucurodinaciones (Zhu and Conney, 1998). Aun cuando la conversión de  $E_2$  a metabolitos inactivos ocurre principalmente en el hígado, se ha determinado que algunos órganos periféricos, incluyendo el útero, la placenta y el cerebro expresan las enzimas requeridas para inactivar estradiol (Tsuchiya et al., 2005). Una de estas vías enzimáticas consiste en la conversión de  $E_2$  a hidroxiestradiol y metoxiestradiol. Esta reacción involucra una primera oxidación en uno de los 18 carbonos que conforman el anillo aromático de  $E_2$ , una reacción catalizada por isoformas de la enzima citocromo P450, la cual origina moléculas de hidroxiestradiol. Luego el grupo hidroxilo previamente añadido es reemplazado por un grupo metilo, a través de una reacción de conjugación catalizada por la enzima Catecol-O-Metiltransferasa (COMT), la cual origina moléculas de metoxiestradiol (Zhu and Conney, 1998). En tejidos periféricos,  $E_2$  es principalmente hidroxilado en dos sitios específicos. La hidroxilación en el carbono 2, catalizada por la enzima citocromo p450, isoforma 1A1 (CYP1A1), genera 2-hidroxiestradiol (2OHE $_2$ ) y la hidroxilación en el carbono 4, catalizada por la enzima citocromo p450, isoforma 1B1 (CYP1B1)

produce 4-hidroxiestradiol (4OHE<sub>2</sub>) (Dawling et al., 2004). Posteriormente, COMT genera 2-metoxiestradiol (2ME<sub>2</sub>) a partir de 2OHE<sub>2</sub> y 4-metoxiestradiol (4ME<sub>2</sub>) a partir de 4OHE<sub>2</sub> (Figura 1).



**Figura 1:** Conversión secuencial de Estradiol a 2-4-hidroxiestradiol y luego a 2-4-metoxiestradiol. Estradiol es metabolizado a 2OHE<sub>2</sub> y 4OHE<sub>2</sub> por la acción de CYP1A1 y CYP1B1 respectivamente, para posteriormente ser convertidos a 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> por la enzima COMT. La oxidación de un electrón de 2OHE<sub>2</sub> ó 4OHE<sub>2</sub> por la enzima NADPH-cP450 reductasa (POR) genera hidroxiestradiol semiquinonas (-SQ) e hidroxiestradiol quinonas (-Q), una reacción acompañada por la liberación de una molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>), la cual luego se transforma en el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) por reacciones de óxido-reducción. O<sub>2</sub><sup>-</sup> es una de las especies reactivas de oxígeno con mayor actividad citotóxica.

## 2.6 Hidroxiestradiolos y metoxiestradiolos son metabolitos de estradiol con actividad biológica

En los últimos años se ha demostrado que los hidroxiestradiolos y metoxiestradiolos no son moléculas inactivas y que una alterada producción intracelular de estos metabolitos de estradiol estaría asociada con algunas enfermedades, incluyendo cáncer y preeclampsia (Parada-Bustamante et al., 2013). En relación a los hidroxiestradiolos, estudios *in vitro* e *in vivo* indican que estos metabolitos de estradiol pueden actuar como agentes que promueven el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, ya que un aumento intracelular de hidroxiestradiolos llevan a su conversión a compuestos llamados hidroxiestradiol semi-quinonas y luego a hidroxiestradiol quinonas (una molécula de hidroxiestradiol con dos moléculas de oxígeno unidas por doble enlace en dos carbonos diferentes del anillo aromático, Figura 1). Las moléculas de hidroxiestradiol quinonas son capaces de reaccionar directamente con la molécula de DNA formando aductos depurinantes (una conexión directa entre una molécula de hidroxiestradiol quinona y una molécula de ADN), interacción que potencialmente induce mutaciones genéticas durante el proceso de replicación de DNA que pueden gatillar proliferación celular descontrolada (Cavalieri et al., 2000). Por otra parte, durante la transformación de hidroxiestradiol semi-quinonas a hidroxiestradiol quinonas se producen especies reactivas de oxígeno (Figura 1), las cuales pueden inducir profundas alteraciones en el funcionamiento celular y en algunos casos inducir muerte celular por procesos apoptóticos (Hurh et al., 2004, Kato et al., 2008, Zhang et al., 2011a, Lambert et al., 2004).

En relación a los metoxiestradiolos, las propiedades anti-cancerígenas que poseen algunos de ellos (principalmente 2ME<sub>2</sub>) han convertido a estos metabolitos de estradiol en uno de los más estudiados en los últimos años. 2ME<sub>2</sub> es capaz de inducir la muerte celular de células cancerígenas de ovario (Kato et al., 2008) y de neuroblastomas de origen humano (Zhang et al., 2011a) a través de mecanismos que aumentan los niveles intracelulares de diferentes especies reactivas de oxígeno (EROs). Además, 2ME<sub>2</sub> es capaz de inducir la muerte celular en diferentes tipos celulares a través de procesos apoptóticos mediados por la activación de proteínas caspasas (Hurh et al., 2004, Kato et al., 2008, Zhang et al., 2011a, Lambert et al., 2004). Aunque menos

estudiado, 4ME<sub>2</sub> también es capaz de inducir muerte celular por un aumento en las EROs (Markides et al., 1998, Chen et al., 2008)

Aún cuando la mayoría de los estudios han estado centrados en los efectos anti-cancerígenos de los metoxiestrادیoles, en los últimos años se ha propuesto que un incremento intracelular de estos metabolitos también puede estar asociado con condiciones patológicas tales como el arresto folicular observado en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (Salih et al., 2008a), en alteraciones en la maduración ovocitaria (Eichenlaub-Ritter et al., 2007) y en el desarrollo embrionario temprano (Lattanzi et al., 2003).

## **2.7 Posible relación de una alterada producción de hidroxiestradiol y metoxiestradiol con infertilidad masculina.**

Diversos grupos de investigadores han determinado que el testículo de diversos mamíferos expresan los mRNA que codifican para las enzimas CYP1A1 (Nishimura et al., 2003, Choudhary et al., 2003, Revel et al., 2001) y CYP1B1 (Sutter et al., 1994, Shimada et al., 1996, Nishimura et al., 2003, Leung et al., 2009, Deb et al., 2010), además de determinar la expresión a nivel proteico de COMT, al menos en la rata (Schendzielorz et al., 2011) y en el ratón (Overbye and Seglen, 2009). A pesar de que no se han determinado los niveles intratesticulares de estos metabolitos de estradiol, la expresión de CYP1A1, CYP1B1 y COMT en este órgano sugiere que los hidroxiestrادیoles y metoxiestrادیoles se producen normalmente a nivel intratesticular.

Aún cuando no se conocen los posibles efectos fisiológicos que pueden ejercer estos metabolitos a nivel intratesticular, estudios recientes indican en forma indirecta que una alterada producción intratesticular de hidroxiestrادیoles y/o metoxiestrادیoles estaría involucrado en la etiología de la infertilidad masculina (Parada-Bustamante et al., 2013) ya que ciertos tóxicos medioambientales que provocan daño testicular inducen la expresión intratesticular de la enzima CYP1A1 (Liang et al., 2012), mientras que 2OHE<sub>2</sub> y 4OHE<sub>2</sub> administrados en forma sistémica a ratas, inducen

marcadas alteraciones morfológicas en las células germinales testiculares (Seegers et al., 1991) y también disminuyen la viabilidad de espermatozoides humanos *in vitro* (Bennetts et al., 2008).

En nuestro laboratorio hemos determinado que las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT se expresan a nivel proteico en el testículo humano (Vargas et al., 2012) y que la expresión de la enzima CYP1A1 parece estar incrementada en pacientes con falla espermatogénica primaria (Molina et al., 2013). Sin embargo no se ha determinado la expresión proteica ni la localización de estas enzimas en el testículo de murinos. Por otro lado, datos recientes obtenidos también en nuestro laboratorio indican que altas concentraciones de 2OHE<sub>2</sub> y 2ME<sub>2</sub> disminuyen la viabilidad de células de Sertoli *in vitro* (Molina et al., 2012), siendo este el primer estudio que muestra un efecto deletéreo de estos metabolitos de estradiol en las células testiculares somáticas. En este último estudio determinamos además que los efectos ejercidos por 2OHE<sub>2</sub> y 2ME<sub>2</sub> sobre las células de Sertoli son independientes del receptor de estradiol; sin embargo, sólo los efectos de 2OHE<sub>2</sub> serían mediados por un aumento intracelular de las especies reactivas de oxígeno y por la activación de procesos apoptóticos dependientes de caspasas (Molina et al., 2012).

Aún cuando el correcto funcionamiento de las células de Leydig es esencial para un proceso espermatogénico exitoso, ningún estudio ha evaluado el posible efecto tóxico que podrían ejercer hidroxiestradioles y metoxiestradioles sobre este tipo celular.

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

A pesar de que una alterada conversión de estradiol a hidroxiestradioles y metoxiestradioles puede estar relacionada a la etiología de la infertilidad y a la importancia de las células de Leydig en el proceso de la espermatogénesis, ningún estudio ha determinado si estos metabolitos de estradiol se producirían en este tipo celular y si estos ejercerían efectos deletéreos directos sobre las células de Leydig. Por esta razón, en este trabajo de tesis evaluamos si las enzimas que producen hidroxiestradioles y metoxiestradioles se expresan en las células de Leydig de ratón adulto y en la línea celular TM3. Además evaluamos los efectos de 2OHE<sub>2</sub>, 4OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> sobre la viabilidad de células de Leydig en cultivo, utilizando como modelo experimental la línea celular TM3.

### **3.1 Hipótesis.**

Hidroxiestradiolos y/o metoxiestradiolos afectan negativamente la viabilidad de las células de Leydig.

### **3.2 Objetivo General.**

Determinar si las enzimas que generan hidroxiestradiolos (2OHE<sub>2</sub> y 4OHE<sub>2</sub>) y metoxiestradiolos (2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub>) se expresan en las células de Leydig de murinos y evaluar el efecto de estos metabolitos de estradiol sobre la viabilidad de las células de Leydig.

### **3.3 Objetivos Específicos.**

- 1) Analizar la expresión de las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT en el testículo de ratón y en las células TM3.
- 2) Evaluar los efectos de 2OHE<sub>2</sub>, 4OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> sobre la viabilidad de las células TM3.
- 3) Determinar los posibles mecanismos por los cuales hidroxiestradiolos y metoxiestradiolos disminuyen la viabilidad de las células TM3.

## **4. METODOLOGÍA.**

### **4.1 Dependencias.**

El presente trabajo de título se llevó a cabo en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva del Instituto de Investigaciones Materno Infantil de la Universidad de Chile, ubicado en el Hospital Clínico San Borja Arriarán, en la ciudad de Santiago.

### **4.2 Cultivo celular.**

La línea celular de Leydig TM3 fue adquirida en la empresa Estadounidense American Type Culture Collection (ATCC) y cultivadas de acuerdo a las indicaciones de esta empresa, con pequeñas modificaciones. Brevemente, las células se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle y Ham's F12 (DMEM/F12; 1:1 vol/vol), el cual fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con un 1% de una solución compuesta de antibióticos y antimicóticos. Todos los reactivos indicados se obtuvieron de la Empresa Gibco (Life technologies corp. NY, EEUU). Las células se cultivaron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y condición de humedad atmosférica en estufa de cultivo celular.

Una vez alcanzado un 70-80% de confluencia, las células fueron sub-cultivadas en placas de cultivo celular de distintos diámetros, dependiendo de las necesidades de los experimentos. 24 horas antes de los tratamientos, las células fueron privadas de SFB para eliminar la presencia de factores de crecimiento presentes en este suplemento, cuya presencia podría llevar a interpretaciones erróneas de los reales efectos inducidos por los metabolitos de estradiol aquí evaluados.

### 4.3 Drogas y metabolitos de estradiol.

El antagonista del receptor de estrógenos ICI 182780 fue adquirido en Tocris Biosciences (Ellisville, EEUU), mientras que el antioxidante N-Acetilcisteína (NAC) fue adquirido en Sigma-Aldrich (Seelze, Alemania)

Los metabolitos de estradiol 4OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub>, y 4ME<sub>2</sub> fueron adquiridos en la empresa Steraloids (Rhode Island, EEUU), mientras que 2OHE<sub>2</sub> fue adquirido en Sigma Aldrich (Seelze, Alemania)

### 4.4 Ensayo de MTS.

Para este ensayo se sub-cultivaron 10000 células TM3 por pocillo (diámetro de 8 mm), en placas de cultivo celular de 96 pocillos. 24 horas después de la privación de SFB, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de 2OHE<sub>2</sub>, 4OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> (0,001 - 0,01 - 0,1 - 1,0 - 10,0 - 20,0 µM) o con el vehículo en el cual se encuentran disueltos estos metabolitos de estradiol (alcohol etílico 0.001%). En otro set de experimentos, las células fueron tratadas con 2ME<sub>2</sub> (20 µM), 4ME<sub>2</sub> (20 µM) o 2OHE<sub>2</sub> (10-20 µM) y en forma concomitante con ICI182780 (10 µM) o N-Acetilcisteína (3 mM).

24 horas post-tratamientos, se determinó la viabilidad celular usando el kit comercial CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay (Promega, Madison, WI EEUU). En este kit, el reactivo MTS (3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium), es bio-reducido por las células viables a un producto colorimétrico llamado Formazán, siendo la cantidad de producto formado directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

Brevemente, el ensayo consiste en agregar directamente el reactivo MTS al medio de cultivo, luego incubar las células en estufa de cultivo durante 30-40 minutos, para finalmente cuantificar la formación de Formazán, utilizando un lector de Elisa (BioRad, Hércules, CA, EEUU), calibrado a una longitud de onda de 490 nm.

La viabilidad celular en la sección resultados se representó en relación a la viabilidad celular observada en el grupo de células controles (viabilidad igual al 100%), las cuales se trataron con el vehículo en el cual están preparados los metabolitos (etanol 0.001%).

Todos los experimentos de viabilidad celular se realizaron cuatro veces (N=4), cada uno de ellos en triplicado o cuadruplicado.

#### **4.5 Ensayo de TUNEL.**

Para este ensayo se sembraron 20000 células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro previamente autoclavados y silanizados. Los cubreobjetos fueron luego incubados en placas de cultivo celular de 12 pocillos con 2ME<sub>2</sub> (20 µM), 4ME<sub>2</sub> (20 µM), 2OHE<sub>2</sub> (10-20 µM) o vehículo (0,001% etanol). 24 horas posterior al tratamiento, se realizaron dos lavados en buffer fosfato salino (PBS) frío, para luego fijar las células por una hora en formalina. Posteriormente, las células se permeabilizaron con el detergente Tritón X-100 (Winckler, Santiago, Chile) disuelto en buffer citrato de sodio, concentración 10 mM, pH 6.0 (Winckler, Santiago, Chile).

Para evaluar la degradación del DNA, las células fueron incubadas con nucleótidos marcados con un fluoróforo y la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa suministrados en el kit comercial "In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para luego realizar una contra-tinción de núcleos con yoduro de propidio por 30 segundos. Finalmente las muestras se montaron con el medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc. CA, EEUU) para su posterior análisis mediante microscopia de fluorescencia.

Como control positivo de la técnica, previo a realizar el ensayo de TUNEL un grupo de células fueron tratadas con DNasa I libre de RNasa (Omega Bio-tek, inc. Norcross GA EEUU) durante 15 minutos a 28°C.

El porcentaje de células TUNEL positivas (con su DNA degradado) en relación al total de células observadas fue determinado analizando 16 fotografías (4 fotografías por experimento) de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub> (10-20 μM), 2ME<sub>2</sub> (20 μM), 4ME<sub>2</sub> (20 μM) o vehículo (etanol 0.001%), las cuales fueron capturadas a través de un microscopio de fluorescencia Olympus, modelo BX-51TF (Olympus Optical Co. CA, EEUU), acoplado a la cámara Cool-Snap-promedia-Cybernetics.

#### **4.6 Extracción de proteínas totales y Western-blot**

Para evaluar la expresión de las proteínas CYP1A1, CYP1B1 y COMT en el testículo de ratón adulto a través de la técnica de western blot, se utilizaron muestras de testículo obtenidos de animales de tres meses de edad de la cepa C57BL/6J, los cuales fueron gentilmente donados por el Dr. Ricardo Moreno Mauro de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los testículos fueron macerados y las proteínas totales se extrajeron utilizando buffer RIPA [120 mM NaCl, 10mM Tris (pH 6.8), 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% deoxicolato de sodio], suplementado con un cóctel de inhibidor de proteasas (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Alemania).

Para evaluar la escisión de caspasa 3 y de PARP-1 inducida por los metabolitos de estradiol en las células TM3, un total de 200000 células se sembraron en placas de 60mm, las cuales se trataron con 2OHE<sub>2</sub> (10-20 μM), 2ME<sub>2</sub> (20 μM), 4ME<sub>2</sub> (20 μM) o vehículo (etanol 0.001%) durante 24 horas. Posterior a este tiempo de incubación, se recuperaron los extractos de las células adheridas y no adheridas. Para esto, se recuperó y centrifugó el medio de cultivo (células no adheridas), para luego realizar 2 lavados con PBS 1X a las células adheridas y adicionarles 20μl de buffer de lisis [50 mM buffer HEPES (pH 7.5), 150mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100], suplementado con un cóctel de inhibidor de proteasas (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Alemania). El extracto celular obtenido de las células adheridas y no adheridas fue posteriormente almacenado en un mismo tubo.

Posteriormente, los extractos celulares (testículo total y TM3 total) fueron traspasados a tubos plásticos de 1.6 mL, para luego sonicar las muestras 2 veces por 2 segundos cada vez, centrifugarlas a 4°C a 10000 RPM por 10 minutos y finalmente recuperar el sobrenadante, el cual fue transferido a tubos rotulados que fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Las proteínas totales obtenidas fueron cuantificadas usando el método de Bradford (Bradford, 1976) el cual utiliza la reacción colorimétrica generada por la interacción del colorante azul de coomassie G-250 con los aminoácidos que conforman las proteínas (principalmente arginina, lisina e histidina). Para este ensayo, 1 µl de muestra se mezcló con 9 µL de agua destilada y con 200 µl de reactivo de Bradford 1X, para luego medir la absorbancia de esta mezcla a una longitud de onda de 595 nm en lector de ELISA (BioRad, Hércules, CA, EEUU). Para conocer la concentración proteica de las muestras (µg/µl), los valores de absorbancia obtenidos de cada muestra se extrapolaron a la curva estándar realizada, la cual se generó usando concentraciones conocidas de la proteína albúmina de suero de bovino (BSA) (Thermo Scientific, MA, EEUU).

Para la separación por peso molecular de las proteínas totales a través de western blot se utilizó el sistema Miniprotean Tetra Cell (BioRad, Hércules, CA, EEUU). Para esto, 20 µg de proteínas se denaturaron en buffer de carga [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% Azul de Bromofenol (p/v), 10% glicerol (v/v)] a 95°C por 4 minutos, y luego fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual contenía el detergente SDS (sistema SDS-PAGE). La concentración de poliacrilamida varió en cada caso, dependiendo del peso molecular de las proteínas a analizar (Tabla 1).

La separación electroforética se realizó utilizando Tris 25 mmoles/L, glicina 192 mmoles/L y SDS 0,1% (p/v) como buffer de corrida, para luego aplicar una corriente eléctrica constante de 80 V por 180 minutos. Luego, las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hércules, CA, EEUU) utilizando un buffer de transferencia compuesto por: Tris 25 mmoles/L, glicina 192 mmoles/L, metanol 20% (v/v) y aplicando corriente constante de 100 V por 60 minutos en hielo. A continuación, se comprobó la transferencia usando el colorante rojo Ponceau (0.1% Ponceau S en 5% ácido Acético (p/v)), para posteriormente bloquear las posibles uniones inespecíficas, incubando la membrana durante una hora en solución

de bloqueo compuesto por buffer TBS-T (200 mM de Tris-HCl [pH 7.6], 1.37M de NaCl y 0.01% [v/v] de Tween-20) y leche libre de grasa a una concentración final de 5% (p/v).

Posteriormente, la membrana se incubó con los distintos anticuerpos primarios disueltos en buffer de bloqueo toda la noche a 4°C en las concentraciones indicadas en la tabla 1. Al término de la incubación, la membrana se lavó con buffer TBS-T 3 veces por 5 minutos para posteriormente incubarla con el anticuerpo secundario respectivo conjugado a peroxidasa de rábano picante (tabla1) por 1 hora a temperatura ambiente. El revelado de la reacción se realizó utilizando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, MA EEUU) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La quimioluminiscencia obtenida fue registrada con el equipo Discovery 10gD (Ultralum, Claremont, CA, EE.UU.) mediante el software Ultraquant (versión 6.0.0.344) y la semi-cuantificación proteica se realizó obteniendo la densidad óptica de las bandas obtenidas mediante el programa Image J (píxeles).

La cuantificación proteica de Caspasa 3 escindida se normalizó en relación a la expresión de la enzima gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH), mientras que la concentración de PARP escindida se normalizó en relación a la proteína PARP no escindida.

**Tabla 1.** Anticuerpos y condiciones utilizadas para ensayos de western blot.

<b>Proteína (Peso molecular)</b>	<b>Número de Catálogo (Fabricante)</b>	<b>Dilución utilizada</b>	<b>Concentración gel poliacrilamida</b>
<b>Caspasa 3 escindida</b> (17-19 kDa)	9661 (Cell Signaling)	1:200	15%
<b>PARP</b> (116-89 kDa)	9542 (Cell Signaling)	1:500	10%
<b>Cyp1A1</b> (56 kDa)	H-70: sc-20772 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200	12%
<b>Cyp1B1</b> (55kDa)	A-15: sc-31666 (Santa Cruz Biotechnology)	1:100	12%
<b>COMT</b> (25- 30kDa)	AB 5873 (Chemicon International)	1:5000	10%
<b>Anti igG de conejo</b>	31460 (Thermo Scientific)	1:5000	---
<b>Anti IgG de cabra</b>	305-066-008, Lot 46712 (Jackson ImmunoResearch)	1:1250	---

#### 4.7 Inmunohistoquímica.

Para evaluar la localización de las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT en testículo de ratón adulto a través de inmunohistoquímica, se obtuvieron muestras de animales de tres meses de edad, proporcionadas gentilmente por el doctor Ricardo Moreno Mauro de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los testículos fueron extraídos, fijados en medio Bouin y luego incluidos en parafina para realizar cortes en micrótopo a 8  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes fueron montados en portaobjetos silanizados y posteriormente secados en estufa a 37°C.

Una vez obtenidos los cortes y montados sobre los portaobjetos, éstos fueron desparafinados incubándolos durante 30 minutos a 50 -70°C y luego realizando 3 lavados con Xilol de 5 minutos cada uno. A continuación, se realizó una rehidratación progresiva de los cortes con una batería de alcoholes, incubándolas durante 5 minutos con concentraciones decrecientes de etanol (100, 95, 90, 85, 70 y 50% respectivamente). La exposición antigénica se realizó utilizando el sistema Antigen Retriever 2100 (Aptum Biologics Ltd. Reino Unido) incubando los cortes en buffer citrato de sodio 0.01M (pH 6.0) por un lapso de 20 minutos a una temperatura de 121°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X por 5 minutos y luego se procedió al bloqueo de la actividad de peroxidasas endógenas incubando las muestras en una solución de peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30%, diluido en metanol en una proporción 1:9 por 15 minutos. El bloqueo de las uniones inespecíficas se realizó incubando las muestras con 200  $\mu\text{l}$  de una solución PBS/BSA 2% (p/v) por 30 minutos y luego con una solución de bloqueo provista por el kit Histostain SP Broad Spectrum (HRP) (Invitrogen, CA, EEUU).

Luego, las muestras se incubaron durante 1 hora con los distintos anticuerpos primarios utilizados en este trabajo de tesis, cuyas especificaciones y concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 2. Al finalizar este tiempo de incubación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1x y luego se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado suministrado por el kit SP Broad Spectrum (HRP) para el caso de las enzimas CYP1A1 y COMT, o con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, EEUU), para el caso de CYP1B1. Las muestras fueron a continuación incubadas con peroxidasa de rábano picante (HRP)

acoplada a la proteína avidina por 10 minutos, para luego obtener la reacción colorimétrica utilizando el kit ZYMED, DAB-Plus Substrate (Life technologies corp. NY, EEUU), según indicaciones del fabricante. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina no diluida (Merck Ltd, Alemania), se deshidrataron sumergiéndolas en concentraciones crecientes de etanol (95% y 100%) y posteriormente en xilol por periodos de 2 minutos.

Finalmente, las muestras se montaron con el medio ClearMount™ (Invitrogen, Paisley. Reino Unido) y las imágenes de las inmunohistoquímicas fueron adquiridas a través de un microscopio Olympus, modelo BX-51TF (Olympus Optical Co. CA, EEUU), acoplado a la cámara Cool-Snap-promedia-Cybernetics.

**Tabla 2.** Anticuerpos y condiciones utilizadas para ensayos de inmunohistoquímica.

<b>Proteína (Peso molecular)</b>	<b>Número de Catálogo (Fabricante)</b>	<b>Dilución</b>
<b>Cyp1A1</b> (56 kDa)	H-70: sc-20772 (Santa Cruz Biotechnology)	1:50
<b>Cyp1B1</b> (55kDa)	A-15: sc-31666 (Santa Cruz Biotechnology)	1:250
<b>COMT</b> (25- 30kDa)	AB 5873 (Chemicon International)	1:500
<b>Anti igG de conejo</b>	95-9943 (kit <i>Histostain SP Broad Spectrum</i> )	---
<b>Anti igG de cabra</b>	305-066-008, Lot 46712 (Jackson ImmunoResearch)	1:500

#### **4.8 Análisis estadístico**

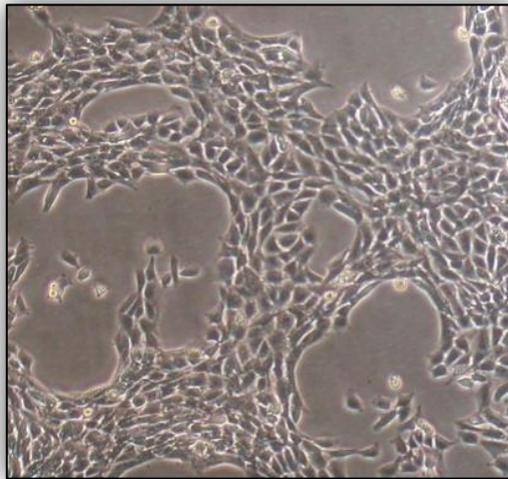
Para determinar si habían diferencias estadísticas entre los distintos grupos analizados. se utilizó el programa computacional GraphPad Prism 4.0. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de test de Dunns, considerando un  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estandarización condiciones óptimas de cultivo células TM3.

El uso de las células TM3 en el laboratorio de andrología molecular del IDIMI comenzó con el desarrollo de esta tesis. Por esta razón, el primer objetivo de este trabajo fue estandarizar las condiciones óptimas de crecimiento y cultivo de esta línea celular.

La empresa ATCC, distribuidora de las células TM3, recomendaba que el medio de cultivo DMEM:F12 fuera suplementado con 5% de SFB y 2.5% de suero de caballo; sin embargo, determinamos que este tipo celular crecía en forma óptima cuando el medio de cultivo fue suplementado sólo con SFB al 10%. Una foto representativa de células TM3 crecidas bajo estas últimas condiciones se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Imagen representativa de células TM3 en cultivo.

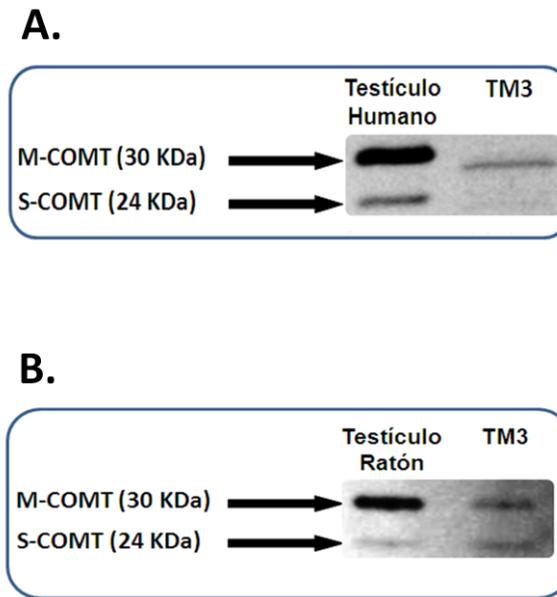
## 5.2 Expresión de CYP1A1, CYP1B1 y COMT en testículo de ratón y en células TM3

Debido a que ningún estudio había determinado la expresión a nivel proteico ni la localización de las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 en el testículo de murinos y sólo un estudio previo había mostrado la expresión de COMT, pero no su localización; en este trabajo de tesis exploramos si las enzimas encargadas de producir estos metabolitos de estradiol se expresaban en el testículo de ratones adultos utilizando las técnicas de western blot e inmunohistoquímica. Además, determinamos si las células TM3 expresaban estas enzimas en condiciones basales.

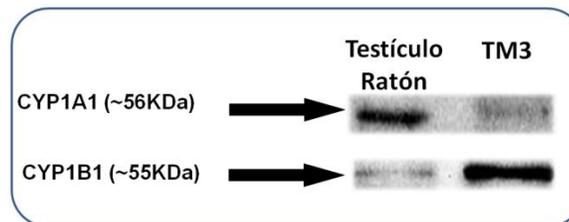
Establecimos que COMT se expresa a nivel proteico tanto en testículo de ratón adulto como en las células TM3, siendo en ambos casos la isoforma M-COMT mucho más abundante que la isoforma S-COMT (Figura 3), un patrón previamente observado en el testículo humano. En relación a la localización de esta enzima en el testículo de ratón, determinamos que se expresa principalmente en las células de Leydig y en la zona apical del túbulo seminífero (Figura 5)

En relación a CYP1A1 y CYP1B1, determinamos que ambas enzimas se expresan a nivel proteico en el testículo de ratón y en las células TM3 (Figura 4). En relación a su localización en el testículo de ratón, CYP1A1 fue principalmente inmunodetectada en las células de Leydig y en menor grado en las células de Sertoli, mientras que CYP1B1 fue detectada principalmente en las células de Leydig y en la zona basal del túbulo seminífero (Figura 5).

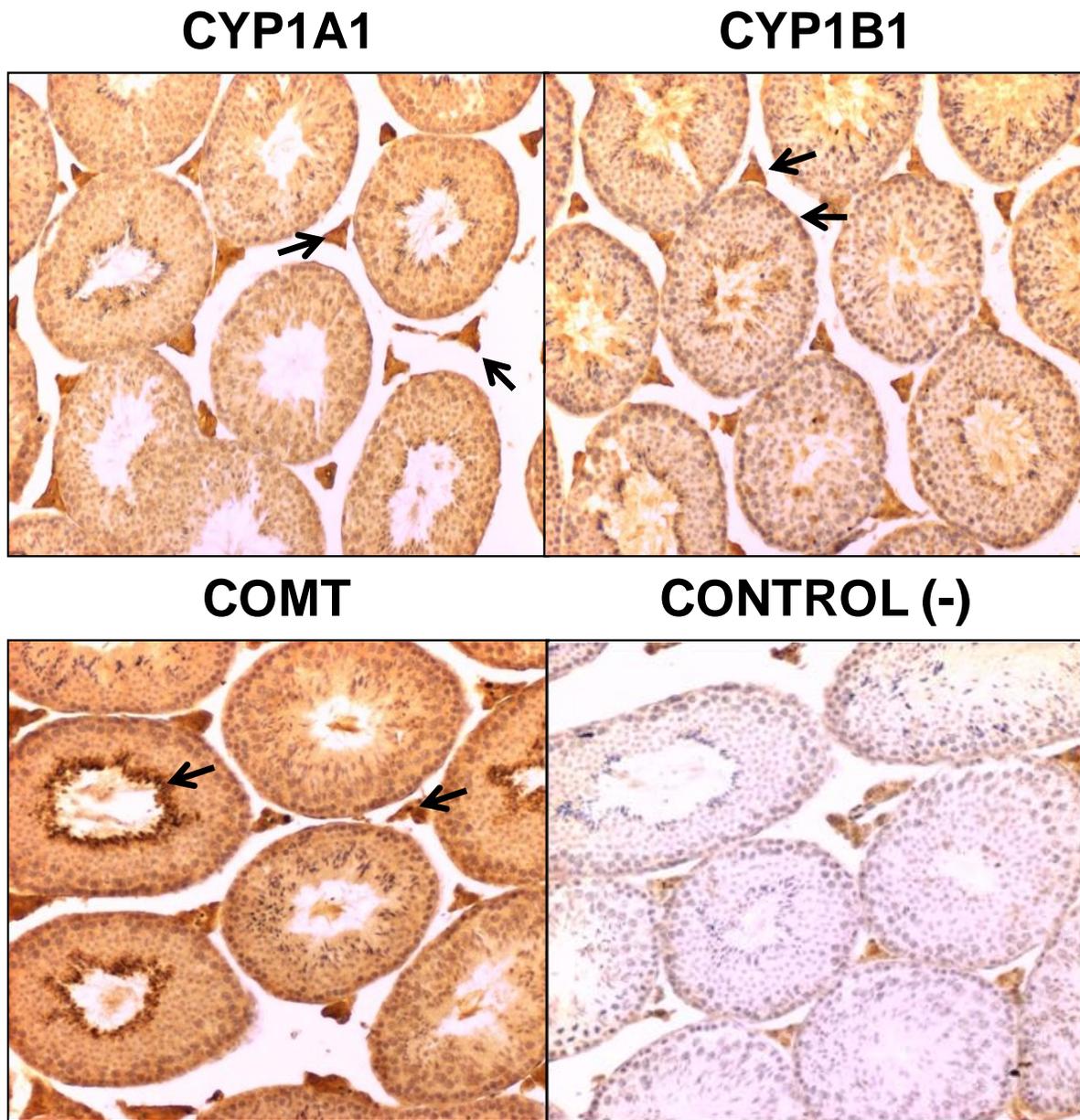
Estos resultados indican que CYP1A1, CYP1B1 y COMT se expresan en el testículo de ratón adulto y principalmente en las células de Leydig, mientras que las células TM3 también expresan estas tres enzimas en condiciones basales.



**Figura 3.** Expresión de la enzima COMT en la línea celular TM3 y en el testículo de ratón. (A) fotografía representativa de un western blot realizado para detectar COMT en el testículo humano y en la línea celular TM3. (B) fotografía representativa de un western blot realizado para detectar COMT en el testículo de ratón y en la línea celular TM3. Se puede observar en ambos casos la expresión de las isoformas de membrana (M-COMT) y la soluble (S-COMT).



**Figura 4.** Expresión de las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 en extracto celular de testículo de ratón y en un extracto proteico de células TM3 en condiciones basales.



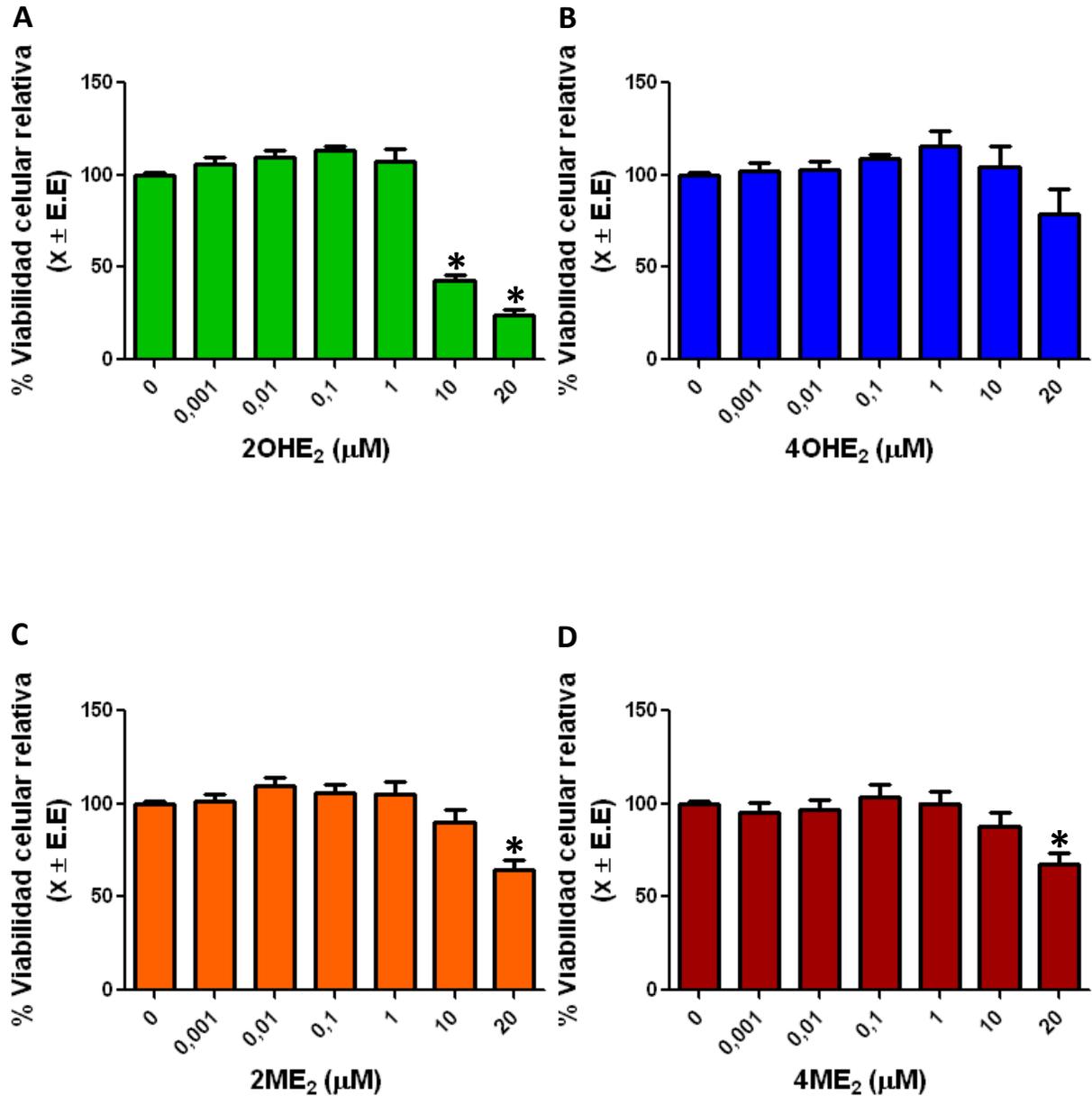
**Figura 5.** Expresión y localización de las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT en el testículo de ratón. Las flechas negras indican el principal sitio de inmunodetección (color marrón) de cada una de las proteínas estudiadas. Se muestra además el control negativo de la técnica, donde se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Todas las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina (marca azul)

### 5.3 Efecto de metabolitos de estradiol sobre la viabilidad de células TM3.

Para determinar los posibles efectos deletéreos de hidroxiestradioles y metoxiestradioles sobre las células TM3, éstas se incubaron con distintas concentraciones de 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub>, 4OHE<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> (rango de 100nM - 20µM) durante 24 horas para posteriormente realizar el ensayo de MTS. El efecto de la incubación con los distintos metabolitos de estradiol sobre la viabilidad celular está representada en relación a la viabilidad observada en el grupo de células controles (viabilidad igual al 100%), las cuales se trataron con el vehículo en el cual están preparados los metabolitos (etanol 0.001%). (Figura 6)

Determinamos que la viabilidad de las células TM3 tratadas con 20µM de 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> fue significativamente menor en comparación a las células tratadas con vehículo ( $64.9 \pm 4.6\%$  y  $67.6 \pm 6.2$  respectivamente). De forma interesante, determinamos que 2OHE<sub>2</sub> también disminuyó significativamente la viabilidad de las células TM3 a las concentraciones de 10 y 20 µM ( $43.0 \pm 2.8\%$  y  $24.5 \pm 2.6\%$  respectivamente), siendo el efecto ejercido por este metabolito mucho más marcado que el generado por 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub>

Finalmente, determinamos que 4OHE<sub>2</sub> no alteró significativamente la viabilidad de las células TM3 a ninguna de las concentraciones estudiadas ( $p > 0.05$ , test de Dunns).



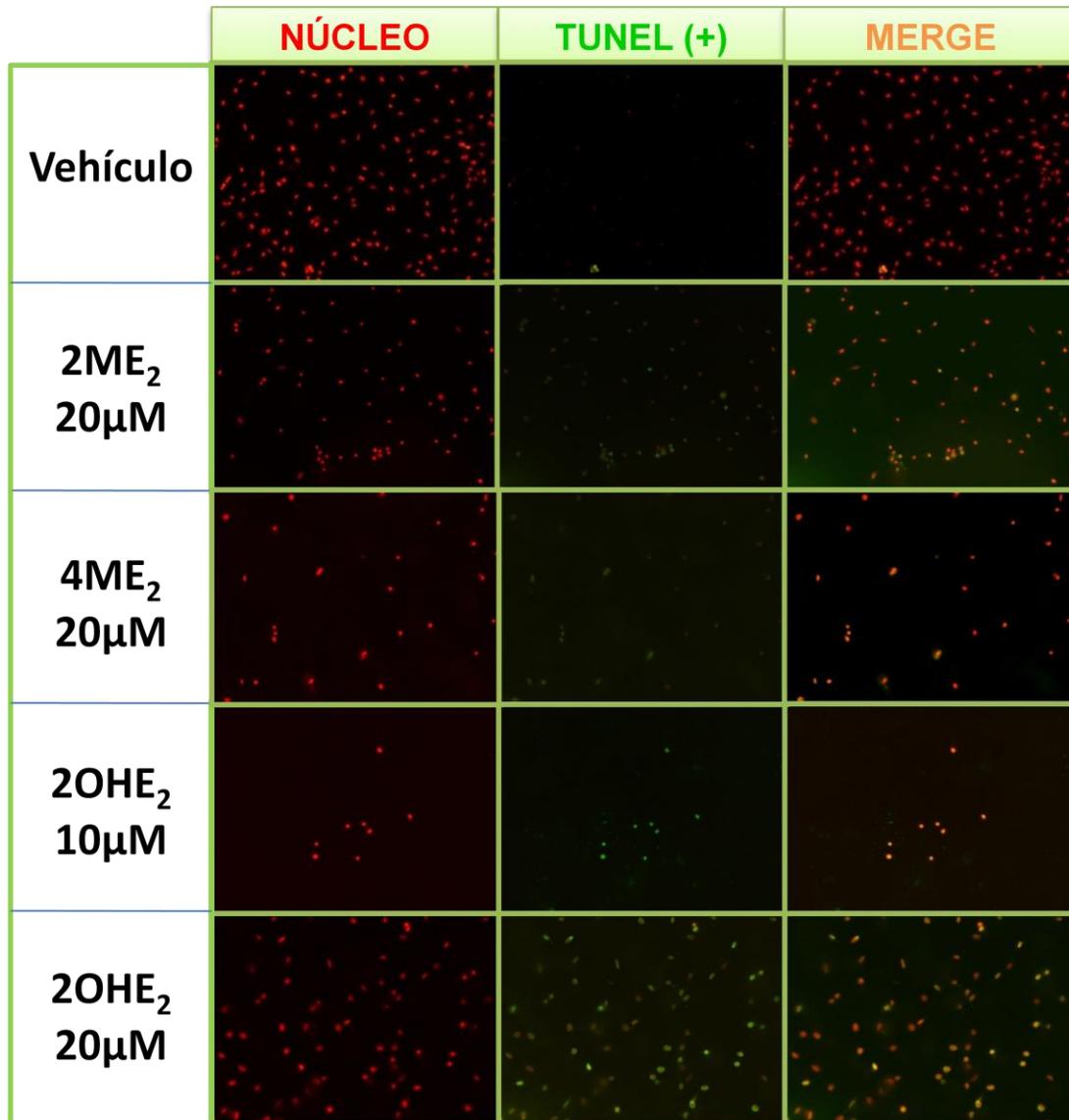
**Figura 6.** Efecto de los metabolitos de estradiol sobre la viabilidad de las células TM3. Las células fueron incubadas con 2OHE<sub>2</sub> (A), 4OHE<sub>2</sub> (B), 2ME<sub>2</sub> (C) y 4ME<sub>2</sub> (D) por 24 horas a las dosis indicadas. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar de un total de 4 experimentos. Cada experimento fue realizado en cuadruplicado. \* =  $p < 0.05$  en relación al vehículo, Test de Dunns.

#### 5.4 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> inducen fragmentación del DNA en células TM3.

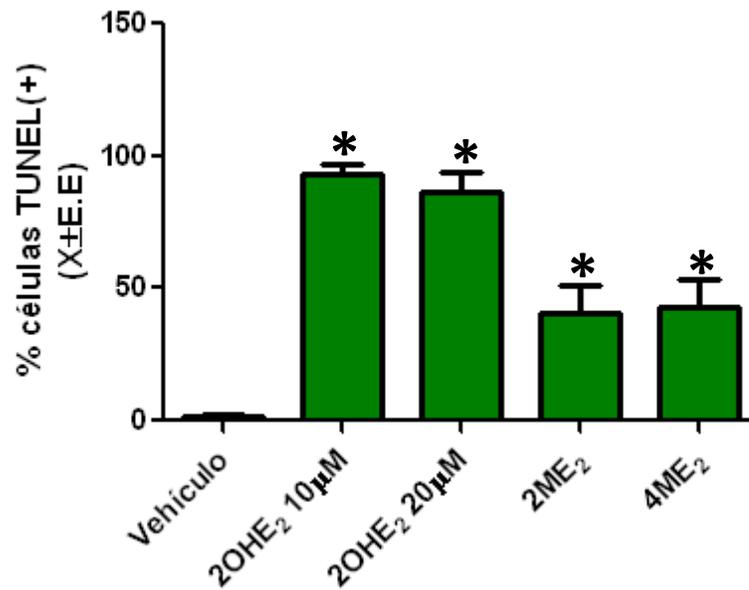
Para determinar si la disminución de la viabilidad celular observada en las células tratadas con 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4OHE<sub>2</sub> se debía a la activación de mecanismos que inducen muerte celular, más que a una inhibición de la proliferación celular, evaluamos la tasa de fragmentación del DNA en células TM3 tratadas con estos metabolitos de estradiol.

La figura 7 muestra fotografías representativas de células TM3 posterior al ensayo de TUNEL, las cuales fueron previamente tratadas con 2ME<sub>2</sub> (20µM), 4ME<sub>2</sub> (20µM), 2OHE<sub>2</sub> (10 y 20µM) o vehículo durante 24 horas. En estas fotografías se muestran los núcleos del total de células presentes en el campo de observación (fluorescencia roja), las células con su DNA fragmentado (fluorescencia verde) y la superposición de ambas imágenes (MERGE, fluorescencia naranja-amarillo).

En la figura 8 se muestra la cuantificación de las células con DNA fragmentado (fluorescencia verde) en relación al total de células observadas en cada campo visual (fluorescencia roja). En esta se observa que el porcentaje de células TUNEL positivas en el grupo de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub> 10µM ( $92.77 \pm 4.19$ ), 2OHE<sub>2</sub> 20µM ( $86.55 \pm 7.59$ ), 2ME<sub>2</sub> 20µM ( $40.34 \pm 10.93$ ) y 4ME<sub>2</sub> 20µM ( $42.85 \pm 10.71$ ), fue significativamente mayor al porcentaje de células TUNEL positivas observadas en el grupo vehículo ( $1.89 \pm 0.53$ ). De forma interesante, el grupo de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub> fue el que mostró el mayor porcentaje de células TUNEL positivas, lo que concuerda con la observación de que este metabolito fue el que disminuyó en forma más dramática la viabilidad de las células TM3, evaluada a través del ensayo MTS.



**Figura 7.** Fotografías representativas del ensayo de TUNEL en células TM3 tratadas con vehículo y los distintos metabolitos de estradiol que inducen muerte celular o su vehículo.



**Figura 8.** Porcentaje de células TM3 TUNEL positivas, 24 horas posteriores al tratamiento con los distintos metabolitos de estradiol que inducen muerte celular, o su vehículo. Los valores son expresados como porcentaje  $\pm$  error estándar (N=4). Cada experimento fue realizado en duplicado, \*= p<0.05 en relación el grupo vehículo, Test de Dunns.

### **5.5 Participación de activación de procesos apoptóticos en la muerte celular inducida por 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub>**

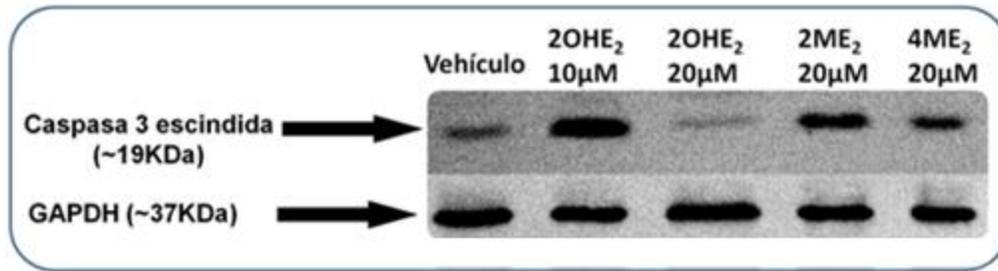
Para evaluar si la fragmentación del DNA inducida por 2ME<sub>2</sub>, 4ME<sub>2</sub> y 2OHE<sub>2</sub> es mediada por la activación de procesos apoptóticos dependientes de caspasas, células TM3 se trataron con 2ME<sub>2</sub> (20μM) 4ME<sub>2</sub> (20μM), 2OHE<sub>2</sub> (10 y 20 μM) o vehículo durante 24 horas, para luego detectar la presencia de la proteína Caspasa 3 en su forma escindida.

La Figura 9 muestra que los niveles proteicos de caspasa 3 escindida en el grupo de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub> 10 μM y 2ME<sub>2</sub> 20 μM son significativamente mayores a los niveles observados en el grupo control ( $4.69 \pm 0.58$  y  $3.16 \pm 0.37$  respectivamente,  $p < 0.05$ , Test de Dunns), mientras que los niveles de esta proteína en los grupos tratados con 2OHE<sub>2</sub> 20 μM y 4ME<sub>2</sub> 20 μM no son estadísticamente diferentes a los encontrados en el grupo control ( $p > 0.05$ , Test de Dunns).

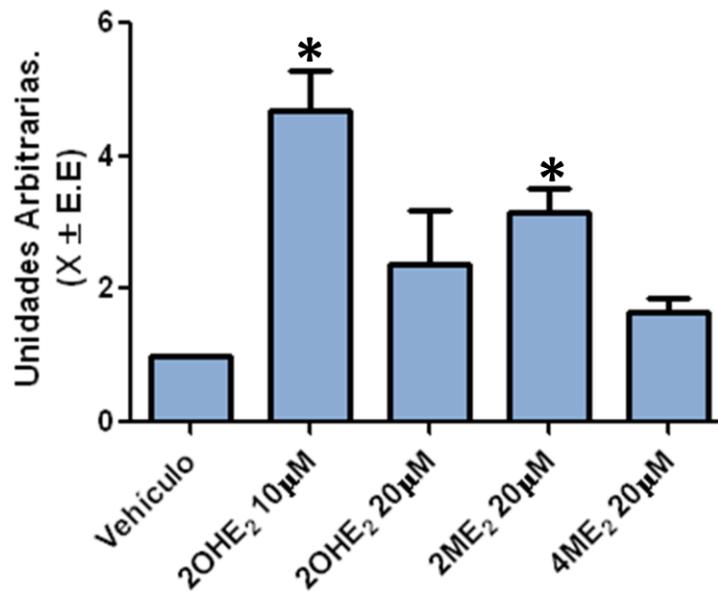
Para determinar si la vía por la cual 2ME<sub>2</sub>, 4ME<sub>2</sub> y 2OHE<sub>2</sub> inducen la fragmentación del DNA en células TM3 es mediada además por la escisión de la proteína PARP, células TM3 se trataron con 2ME<sub>2</sub> (20μM) 4ME<sub>2</sub> (20μM), 2OHE<sub>2</sub> (10 y 20μM) o vehículo durante 24 horas, para luego detectar la presencia de la proteína PARP-1 en su forma escindida y no escindida.

La Figura 10 muestra que los niveles proteicos de PARP-1 escindida (en relación a los niveles proteicos de PARP-1 no escindida) en el grupo de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub> 10 μM son significativamente mayores a los niveles observados en el grupo control ( $1.6 \pm 0.22$  versus  $0.2 \pm 0.02$   $p < 0.05$ , Test de Dunns), mientras que la razón PARP-1 escindida/PARP-1 no escindida en los grupos tratados con 2ME<sub>2</sub> 20 μM, 4ME<sub>2</sub> 20 μM y 2OHE<sub>2</sub> 20 μM no fueron estadísticamente diferentes a los encontrados en el grupo control ( $p > 0.05$ , Test de Dunns).

A.

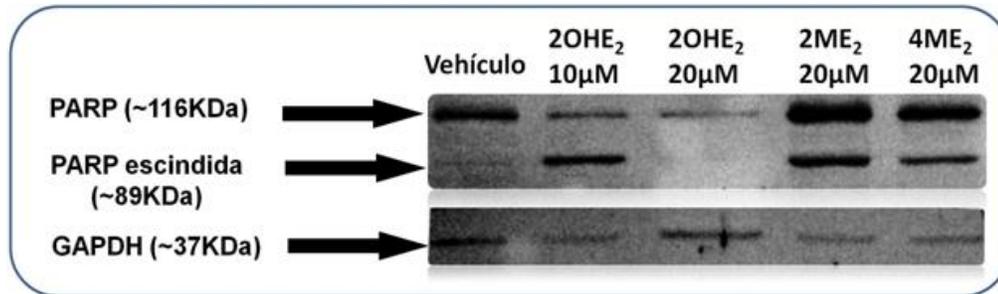


B.

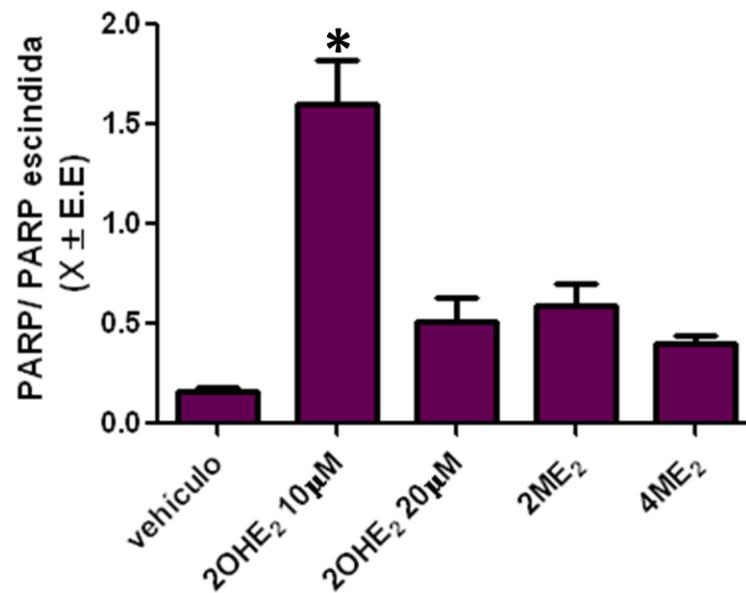


**Figura 9.** Fotografía representativa del ensayo de western blot para la detección de caspasa 3 en su forma escindida en células tratadas con los distintos metabolitos de estradiol o su vehículo (A); se muestra además los niveles proteicos de GAPDH en los distintos tratamientos, los cuales fueron usados para realizar semicuantificación de la concentración proteica de caspasa 3 escindida. Cuantificación relación caspasa 3/GAPDH en extractos proteicos de células TM3 tratadas por 24 horas con los metabolitos de estradiol indicados o su vehículo (B); Los valores son expresados como la media ± error estándar (N=5). \*= p<0.05 en relación al grupo vehículo, Test de Dunns.

A.



B.



**Figura 10.** Fotografía representativa de un western blot para la detección de PARP-1 en su forma escindida y no-escindida en células tratadas con los distintos metabolitos de estradiol o su vehículo (A). Cuantificación relación PARP-1 escindida/PARP-1 no-escindida en extractos proteicos de células TM3 tratadas por 24 horas con los metabolitos de estradiol indicados o su vehículo (B); Los valores son expresados como la media ± error estándar (N=5). \* =  $p < 0.05$  en relación al grupo vehículo, Test de Dunns.

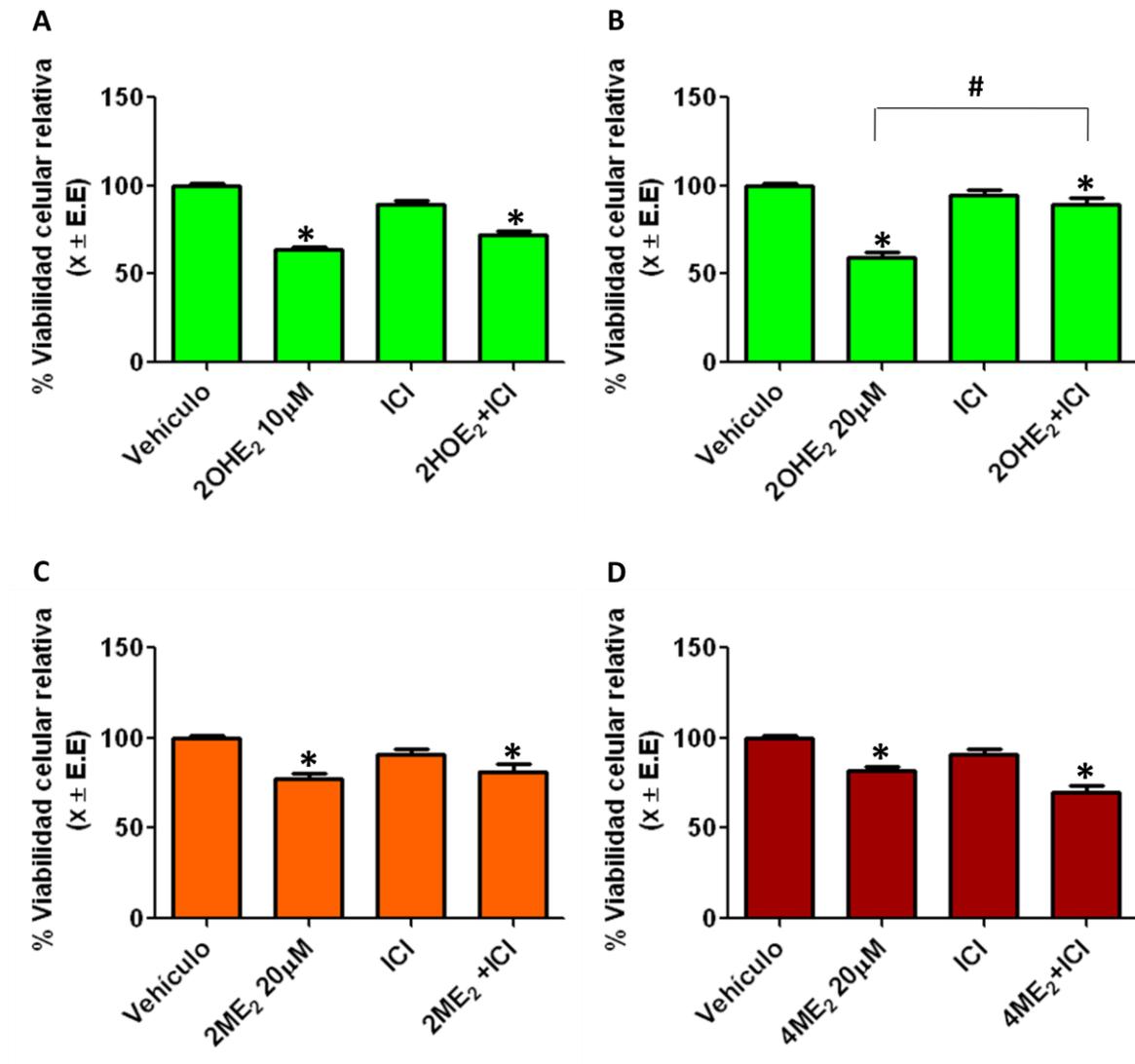
## 5.6 Evaluación de la participación del receptor de estrógenos y de un incremento del estrés oxidativo en la disminución de la viabilidad celular inducida por 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub>

**Participación del receptor de estrógenos.** Dado que la línea celular TM3 expresa el Receptor de estrógenos  $\alpha$  (Yoshida et al., 2007) y que algunos efectos de 2OHE<sub>2</sub> y 2ME<sub>2</sub> son mediados por el receptor de estrógenos (RE) (Jobe et al., 2010, Parada-Bustamante et al., 2010), evaluamos si los efectos de 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> sobre la viabilidad en las células TM3 eran mediados por el RE utilizando ICI 182780, un antagonista específico de este receptor (Figura 11).

En relación a los metoxiestrادیoles, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> a la dosis de 20  $\mu$ M disminuyeron significativamente la viabilidad celular en comparación a las células tratadas con el vehículo ( $77.59 \pm 2.44$  y  $81.82 \pm 2.58\%$  respectivamente,  $p < 0.05$ , Test de Dunns), mientras que esta diferencia en relación al grupo control se mantuvo cuando estos metabolitos se co-incubaron con ICI182780 (2ME<sub>2</sub> + ICI =  $81.39 \pm 4.25$ ; 4ME<sub>2</sub> + ICI =  $69.98 \pm 3.39$ ;  $p < 0.05$ , Test de Dunns)

En relación a 2OHE<sub>2</sub>, este metabolito disminuyó significativamente la viabilidad de las células TM3 en relación al grupo vehículo a las dosis de 10 y 20  $\mu$ M ( $63.66 \pm 2.0$  y  $59.59 \pm 2.48\%$  respectivamente,  $p < 0.05$ , Test de Dunns). Estas diferencias estadísticas en relación al grupo control se mantuvieron cuando 2OHE<sub>2</sub> a las dosis de 10 y 20  $\mu$ M se co-incubó con ICI182780 ( $72.48 \pm 2.07\%$  y  $89.13 \pm 3.88$ , respectivamente;  $p < 0.05$ , Test de Dunns).

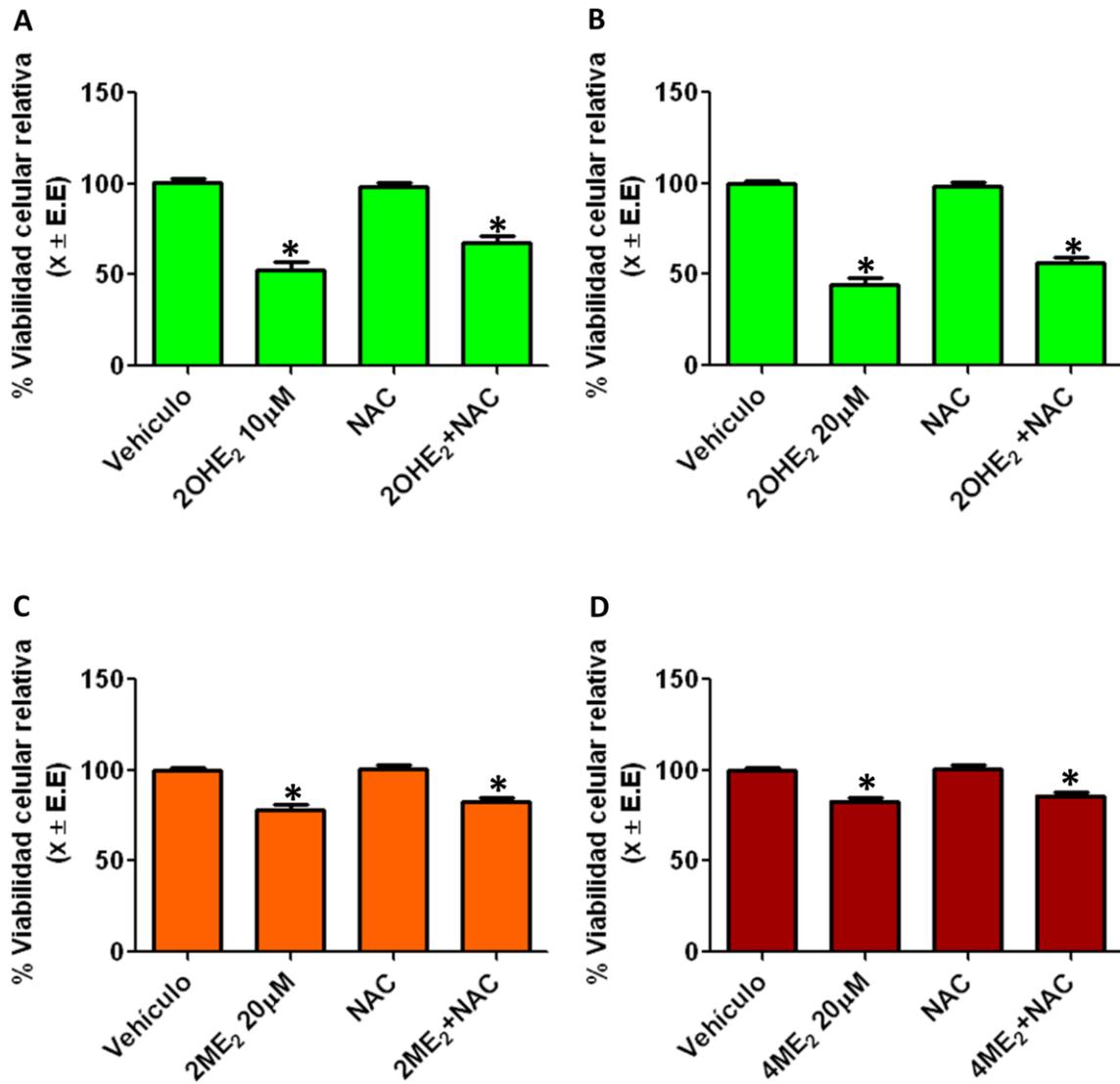
De forma interesante, el análisis estadístico entre los grupos 2OHE<sub>2</sub> 20  $\mu$ M versus 2OHE<sub>2</sub> 20  $\mu$ M + ICI182780 mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $59.59 \pm 2.48\%$  versus  $89.13 \pm 3.88$ ;  $p < 0.05$ , Test de Dunns), indicando que ICI182780 bloquea parcialmente el efecto deletéreo de 2OHE<sub>2</sub> 20  $\mu$ M.



**Figura 11.** Efecto de un antagonista del receptor de estrógenos (ICI182780) sobre la viabilidad de células TM3 tratadas por 24 horas con 2OHE<sub>2</sub> 10 μM (A), 2OHE<sub>2</sub> 20 μM (B), 2ME<sub>2</sub> 20 μM (C) y 4ME<sub>2</sub> 20 μM (D). Los datos son presentados como porcentaje ± error estándar de un total de 5 ensayos realizados en triplicado. \* = P<0.05 en comparación al grupo vehículo, # = P<0.05 entre grupo 2OHE<sub>2</sub> y 2OHE<sub>2</sub> + ICI; test de Dunns.

**Participación de un aumento en el estrés Oxidativo.** Para determinar si la muerte celular inducida por 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> era mediada por un aumento en el estrés oxidativo de las células, determinamos el efecto del antioxidante N-Acetilcisteína (NAC), sobre la disminución de la viabilidad celular inducida por estos tres metabolitos (Figura 12).

2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> a las dosis de 20μM disminuyeron significativamente la viabilidad celular en comparación a las células tratadas con el vehículo ( $78.21 \pm 2.62$  y  $82.94 \pm 2.06$  respectivamente,  $p < 0.05$ , Test de Dunns), al igual que 2OHE<sub>2</sub> a las concentraciones de 10 y 20 μM ( $52.63 \pm 4.17$  y  $44.05 \pm 4.19$  respectivamente,  $p < 0.05$ , Test de Dunns). La co-incubación con NAC no revirtió el efecto deletéreo de 2ME<sub>2</sub> 20 μM ( $82.38 \pm 2.51$ ), 4ME<sub>2</sub> 20μM ( $85.92 \pm 1.97$ ), ni tampoco el efecto de 2OHE<sub>2</sub> 10 y 20μM ( $67.65 \pm 3.62$  y  $56.56 \pm 3.07$  respectivamente). El antioxidante por sí solo no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular.



**Figura 12.** Efecto del antioxidante N-Acetilcisteína (NAC) sobre la viabilidad de células TM3 tratadas por 24 horas con 2OHE<sub>2</sub> 10 μM (A), 2OHE<sub>2</sub> 20 μM (B), 2ME<sub>2</sub> 20 μM (C) y 4ME<sub>2</sub> 20 μM (D). Los datos son presentados como la media ± el error estándar de un total de 5 ensayos realizados en triplicado. \* = P < 0.05 en comparación al grupo vehículo; test de Dunn's

## 6. DISCUSIÓN

Testosterona es una hormona clave para un correcto proceso espermatogénico, ejerciendo sus acciones principalmente en las células de Sertoli y en las células germinales. La célula de Leydig es la principal fuente de testosterona en el hombre (Ge et al., 2009), por lo cual una alteración en la viabilidad y/o funcionamiento de las células de Leydig, podría estar asociado con una falla espermatogénica primaria. Por otro lado, diferentes estudios han postulado que una alterada producción de hidroxiestradioles y metoxiestradioles a nivel intratesticular estaría relacionado con infertilidad masculina, ya que altas concentraciones de algunos de estos metabolitos disminuyen la viabilidad de espermatozoides humanos y de células de Sertoli *in vitro*; sin embargo, hasta ahora ningún estudio ha determinado el efecto de estos metabolitos de estradiol sobre las células de Leydig. Con estos antecedentes, este trabajo de tesis se centró en determinar el efecto de hidroxiestradioles y metoxiestradioles sobre la viabilidad celular de células de Leydig aisladas, utilizando como modelo de estudio la línea celular TM3.

### 6.1 Expresión de CYP1A1, CYP1B1 y COMT en testículo de ratón adulto y en células TM3.

Previamente determinamos que las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT se expresan en las células somáticas del testículo humano (Vargas et al., 2012). En las células de Leydig de los hombres con espermatogénesis conservada, se expresan principalmente las enzimas CYP1B1 y COMT, mientras que la enzima CYP1A1 fue sólo débilmente detectada (Vargas et al., 2012). El primer paso de este trabajo de tesis fue determinar si las enzimas que participan en la producción de hidroxiestradioles y metoxiestradioles se expresan en el testículo de ratón y si éstas presentan un patrón similar de expresión al detectado en el testículo humano. Además evaluamos por western blot el patrón de expresión de estas enzimas en la línea celular TM3 para evaluar si conservaban el patrón de expresión observado en el testículo de ratón intacto y de esta manera validar su utilización como modelo para evaluar los efectos de hidroxiestradioles y metoxiestradioles sobre las células de Leydig.

Determinamos por western blot que las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT se expresan en el testículo de ratón; indicando que al igual que el testículo humano, el testículo de ratón tendría la capacidad de generar hidroxiestradioles y metoxiestradioles. En el caso de COMT, establecimos que la expresión de la isoforma M-COMT es mucho mayor que el de la isoforma S-COMT, un patrón similar al observado en el testículo humano (Vargas et al., 2012). En relación a la localización de estas enzimas al interior del testículo, todas las enzimas presentaron una fuerte inmunodetección en las células de Leydig, mientras que COMT también presentó una fuerte inmunodetección en la zona luminal de las células de Sertoli. En comparación a la expresión de estas enzimas en el testículo humano, las principales diferencias radican en la mayor expresión de CYP1A1 en las células de Leydig, ya que las células de Leydig del testículo de ratón muestran una fuerte inmunoreactividad para esta enzimas, mientras que las células de Leydig del testículo humano casi no expresan CYP1A1, siendo esta enzima sólo detectada a bajos niveles en la zona basal de las células de Sertoli. En relación a COMT, esta enzima fue principalmente inmunodetectada a lo largo de todo el citoplasma de las células de Sertoli en el humano, mientras que en testículo de ratón, ésta enzima fue principalmente inmunodetectada en la zona apical de las células de Sertoli.

En relación a la expresión de CYP1A1, CYP1B1 y COMT en las células TM3, determinamos a través de western blot que las tres enzimas se expresan en este tipo celular, conservando el patrón de expresión observado en las células de Leydig de testículo de ratón intacto. Este resultado indicaría que las células TM3 serían un buen modelo para evaluar los efectos de hidroxiestradioles y metoxiestradioles sobre las células de Leydig, ya que al menos conservan el patrón de expresión de las enzimas que los producen; sin embargo, para determinar en forma inequívoca de que estas células son un buen modelo para este tipo de estudios, se debe determinar si los efectos de hidroxiestradioles y metoxiestradioles observados sobre este tipo celular son los mismos que los observados en cultivos primarios de células de Leydig de ratón, una comprobación que por razones de tiempo y logísticos no se realizó en este trabajo de tesis.

## 6.2 Viabilidad celular

En este trabajo de tesis determinamos que altas concentraciones de 2OHE<sub>2</sub> (10 y 20 μM), 2ME<sub>2</sub> (20 μM) y 4ME<sub>2</sub> (20 μM) generan una disminución significativa de la viabilidad en células TM3. Estos resultados son similares a los efectos que ejercen hidroxiestradioles y metoxiestradioles sobre la viabilidad de las células de Sertoli obtenidos en nuestro laboratorio (Molina et al., 2012); donde determinamos que 2OHE<sub>2</sub> y 2ME<sub>2</sub> a una concentración de 20 μM disminuyeron la viabilidad de este tipo celular. Estos resultados, junto a los obtenidos por Bennetts y colaboradores (2008), quienes determinaron que altas concentraciones de 2OHE<sub>2</sub> disminuye la viabilidad de espermatozoides humanos *in vitro*, indicando que un aumento en las concentraciones intratesticulares de algunos hidroxiestradioles y metoxiestradioles, principalmente de 2OHE<sub>2</sub>, generarían efectos deletéreos sobre la fisiología testicular, afectando tanto a las células de Sertoli, a las de Leydig y a los espermatozoides.

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo de tesis fue el hecho que 2ME<sub>2</sub> disminuyó significativamente la viabilidad de las células TM3. De acuerdo a la literatura, 2ME<sub>2</sub> tiene la capacidad de disminuir la viabilidad de células tumorales, pero no de células no-tumorales (Arbiser et al., 1999, Dubey et al., 2002, Fotsis et al., 1994, Lakhani et al., 2003, Zhu and Conney, 1998), con lo cual la disminución en la viabilidad de las células TM3, una línea no-tumoral de acuerdo a los investigadores que la caracterizaron (Mather, 1980) fue inesperado, al igual que este metabolito haya disminuido la viabilidad de las células de Sertoli, de acuerdo a un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (Molina et al., 2012). Estos resultados, en conjunto con el hecho que altas concentraciones de 2ME<sub>2</sub> afectarían negativamente la fisiología ovárica (Salih et al., 2008b), indicarían que un aumento inusual en las concentraciones de 2ME<sub>2</sub> podría estar relacionado a disfunciones en la gónada masculina y femenina.

Por otro lado, debido a que  $4\text{OHE}_2$  altera la morfología de los túbulos seminíferos en la rata cuando este fue administrado en forma sistémica (Seegers et al., 1991), pero no altera la viabilidad de espermatozoides humanos *in vitro* (Bennetts et al., 2008) ni la viabilidad de las células de Sertoli aisladas (Molina et al., 2012) ni de las células de Leydig aisladas como se determinó en esta tesis, un aumento en los niveles sistémicos, pero no en los niveles intratesticulares de este metabolito de estradiol afectaría la fisiología testicular, posiblemente afectando el eje hipotálamo-hipófisis-testículo; sin embargo esta hipótesis deber aún ser dilucidada

Las concentraciones de  $2\text{OHE}_2$ ,  $2\text{ME}_2$ , y  $4\text{ME}_2$  que disminuyen la viabilidad de las células TM3 pueden considerarse farmacológicas, ya que los niveles intratesticulares de estradiol, la hormona que origina estos metabolitos, sólo alcanzan concentraciones nanomolares (Roth et al., 2010). Sin embargo, es importante considerar que las concentraciones intratesticulares de estos metabolitos de estradiol en hombres sanos e infértiles aún no han sido determinados y que los efectos deletéreos de altas concentraciones de hidroxiestradioles y metoxiestradioles sobre las células de Leydig evaluados en esta tesis, al igual que los efectos deletéreos observados sobre las células de Sertoli (Molina et al., 2012) y espermatozoides (Bennetts et al., 2008) fueron sólo evaluados a cortos tiempos de exposición a estos metabolitos. En relación a este último punto, sería importante evaluar la viabilidad de las células de Leydig cuando estas son incubadas con concentraciones más bajas de estos metabolitos de estradiol, pero por un mayor tiempo de exposición. Por razones de tiempo, este experimento no se realizó durante este trabajo de tesis.

Debido a que el ensayo de MTS utilizado en este trabajo de tesis tiene la limitante experimental de ser un ensayo que no distingue si una disminución en la viabilidad celular se debe a una menor tasa de proliferación celular o a un aumento en la tasa de muerte celular, evaluamos si la disminución de la viabilidad de células TM3 inducida por  $2\text{OHE}_2$ ,  $2\text{ME}_2$ , y  $4\text{ME}_2$  observada a través del ensayo MTS se debía a un aumento de la tasa de muerte celular, utilizando el ensayo de

TUNEL. Determinamos que el número de células TUNEL positivas en los grupos de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub>, y 4ME<sub>2</sub> a las dosis que disminuyen la viabilidad de este tipo celular según el ensayo de MTS, fue significativamente mayor al número de células TUNEL positivas encontradas en el grupo de células control, confirmando que estos metabolitos inducen muerte celular más que una disminución en la tasa de proliferación de estas células. Determinamos además que los porcentajes de células TUNEL positivas en los grupos de células tratados con 2OHE<sub>2</sub> fueron más altos que los encontrados en los grupos tratados con 2ME<sub>2</sub>, y 4ME<sub>2</sub>, lo que es concordante a los resultados obtenidos a través del ensayo de MTS, donde 2OHE<sub>2</sub> indujo una mayor disminución de la viabilidad celular en comparación a 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub>. Finalmente, este sería el segundo trabajo en reportar que 4ME<sub>2</sub> ejerce efectos deletéreos en un tipo celular. Sólo (Chang et al., 2012) habían previamente determinado que este metabolito de estradiol aumenta la tasa de muerte de células de cáncer renal.

Uno de las vías que inducen muerte celular induciendo la fragmentación del DNA es la apoptosis. Esta vía de muerte celular es principalmente mediada por la activación de las proteínas llamadas caspasas, aunque en los últimos años se ha descrito la activación de mecanismos apoptóticos independientes de caspasas (Thayyullathil et al., 2013). En relación a la apoptosis dependiente de caspasas, la activación de las llamadas caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9) resulta en la escisión y activación de las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7), las cuales son las responsables de la proteólisis selectiva y limitada de múltiples proteínas celulares implicadas en el morfología y cambios bioquímicos asociados con la apoptosis (Crawford and Wells, 2011). Debido a que varios estudios previos han demostrado que algunos hidroxiestradioles y metoxiestradioles inducen muerte de diversos tipos celulares activando vías apoptóticas dependientes de caspasas (Kato et al., 2008, Zhang et al., 2011a), en este trabajo de tesis evaluamos si 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub>, y 4ME<sub>2</sub> inducen la escisión de caspasa 3, un indicador directo de la activación de esta vía (Elinos-Baez et al., 2003, Nunez et al., 1998, Salvesen and Riedl, 2008).

Nuestros resultados sugieren que 2OHE<sub>2</sub> 10 µM y 2ME<sub>2</sub> 20 µM, pero no 2OHE<sub>2</sub> 20 µM ni 4ME<sub>2</sub> 20 µM, inducen la muerte de las células TM3 a través de la activación de procesos apoptóticos dependientes de caspasas, ya que 24 horas posterior al tratamiento con los distintos metabolitos de estradiol que inducen muerte celular, sólo los niveles proteicos de caspasa 3 escindida en los grupos de células tratados con 2OHE<sub>2</sub> 10 µM y 2ME<sub>2</sub> 20 µM, fueron significativamente mayores a los niveles observados en el grupo control. El hecho que 2OHE<sub>2</sub> a la dosis de 10 µM aumente significativamente los niveles de caspasa 3 escindida, pero que una dosis mayor (20 µM) fue un resultado inesperado. Proponemos que 2OHE<sub>2</sub> a la dosis de 20 µM también activaría vías apoptóticas dependientes de caspasa 3, pero que ésta activación podría alcanzar su máximo nivel previo a las 24 horas de exposición a este metabolito, tiempo al cual se evaluó la escisión de caspasa 3. Esta idea estaría apoyada por el hecho que el grupo de células TM3 tratadas durante 24 horas con 2OHE<sub>2</sub> 20 µM durante 24 horas presentaban un alto número de células muertas en suspensión y las que se encontraban aún adheridas presentaban una morfología anormal (datos no mostrados). Para determinar si 2OHE<sub>2</sub> induce la escisión de caspasa 3 antes de las 24 horas de exposición, es necesario evaluar los niveles de caspasa 3 a distintos tiempos posterior a la incubación con 2OHE<sub>2</sub>, un experimento que no se realizó en este trabajo de tesis por problemas de tiempo.

En relación a 4ME<sub>2</sub>, nuestros resultados indicarían que este metabolito de estradiol no induciría degradación del DNA de las células TM3 a través de mecanismos apoptóticos dependientes de caspasas, ya que este metabolito no induce la escisión de caspasa 3; sin embargo, al igual que en el caso anterior, se debe evaluar los niveles de caspasa 3 escindida a tiempos menores de 24 horas para completamente descartar esta posibilidad.

Uno de los blancos río abajo de la activación de vías apoptóticas dependientes de caspasas es la escisión de la enzima poliADP- ribosa 1 (PARP-1) (Kaufmann et al., 1993), la cual en

condiciones fisiológicas tiene como función principal la reparación del DNA. En este trabajo de tesis evaluamos si 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> inducen la escisión de PARP-1 en las células TM3.

Los niveles de PARP-1 escindida fueron significativamente mayores en el grupo de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub> 10 μM, en comparación a los niveles encontrados en el grupo de células control. Estos resultados, en conjunto a los obtenidos con caspasa 3, indican que 2OHE<sub>2</sub> 10 μM induce la activación de vías apoptóticas dependientes de caspasas en las células TM3, las cuales tienen como uno de sus blancos la escisión de PARP-1. En relación a 2OHE<sub>2</sub> 20 μM, este metabolito no indujo en forma significativa la escisión de PARP-1. Sin embargo, por las razones indicadas anteriormente, es necesario determinar si 2OHE<sub>2</sub> a esta dosis induce la escisión de PARP-1 a menores tiempos de incubación.

2ME<sub>2</sub> no indujo en forma significativa la escisión de PARP-1. Debido a que 2ME<sub>2</sub> induce en forma significativa la escisión de caspasa 3, pero no la escisión de PARP-1, postulamos que 2ME<sub>2</sub> induce la activación de vías apoptóticas dependientes de caspasas en las células TM3, las cuales no finalizan en la escisión de PARP-1, a diferencia de lo observado en células de cáncer de mama (Fukui and Zhu, 2009) y cérvico-uterino (Chatterjee et al., 2008) humanas donde 2ME<sub>2</sub> activa vías apoptóticas dependientes de caspasas que finalizan en la escisión de PARP-1. Finalmente, 4ME<sub>2</sub> no indujo un aumento significativo de PARP-1 escindida, lo cual concuerda con el hecho de que 4ME<sub>2</sub> no induzca la escisión de caspasa 3. Los mecanismos por los cuales 4ME<sub>2</sub> disminuye la viabilidad de las células TM3 aún deben ser dilucidados; sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podríamos descartar que 4ME<sub>2</sub> induce la muerte de las células TM3 a través de mecanismos apoptóticos dependientes de caspasas.

En este trabajo de tesis nos propusimos además profundizar en los mecanismos por los cuales 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub>, y 4ME<sub>2</sub> disminuyen la viabilidad de las células de Leydig. Se ha determinado que

la línea celular TM3 expresa el receptor de estrógeno (RE)  $\alpha$  (Yoshida et al., 2007) y que algunos efectos biológicos de 2OHE<sub>2</sub> y 2ME<sub>2</sub>, son mediados por el receptor de estrógenos (RE) (Barchiesi et al., 2002, Parada-Bustamante et al., 2007, Parada-Bustamante et al., 2010). Nuestros resultados demuestran que la disminución en la viabilidad de las células TM3 inducida por 2OHE<sub>2</sub> 10  $\mu$ M, 2ME<sub>2</sub> 20  $\mu$ M y 4ME<sub>2</sub> 20  $\mu$ M es independiente de su unión al RE, ya que sus efectos no fueron bloqueados por ICI182780, uno de los antagonistas del receptor de estrógeno más usado en investigación (Barchiesi et al., 2002, Lehmann et al., 2008, Russo et al., 2003). Estos resultados concuerdan con el hecho que 2OHE<sub>2</sub> y 2ME<sub>2</sub> tiene una baja afinidad por el RE (Martucci and Fishman, 1976, Martucci and Fishman, 1977) y que 2OHE<sub>2</sub> y 2ME<sub>2</sub> inducen muerte de las células de Sertoli a través de mecanismos independientes del RE (Molina et al., 2012) . De forma interesante, determinamos que la viabilidad del grupo de células tratadas con 2OHE<sub>2</sub> 20  $\mu$ M más ICI182780 fue significativamente mayor a la viabilidad del grupo de células tratadas sólo con 2OHE<sub>2</sub> 20  $\mu$ M, pero que es significativamente menor en comparación al grupo control. Este resultado indicaría que 2OHE<sub>2</sub> 10  $\mu$ M disminuye la viabilidad de las células TM3 activando mecanismos independientes del receptor de estradiol, mientras que 2OHE<sub>2</sub> 20  $\mu$ M disminuiría la viabilidad de las células de Leydig activando mecanismos dependientes e independientes del receptor de estradiol, sin embargo esta hipótesis aún deber ser dilucidada.

Se ha determinado que los mecanismos por los cuales 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub>, y 4ME<sub>2</sub> inducen la muerte de algunos tipos celulares involucran un aumento del estrés oxidativo. Por ejemplo, 2OHE<sub>2</sub> induce una disminución en la viabilidad celular por un mecanismo que involucra especies reactivas del oxígeno en espermatozoides humanos (Bennetts et al., 2008) y en células de Sertoli aisladas (Molina et al., 2012) , el mismo mecanismo por el cual 2ME<sub>2</sub> y 4ME<sub>2</sub> disminuyen la viabilidad de neuroblastomas (Zhang et al., 2011a) y células epiteliales del pulmón (Cheng et al., 2007) respectivamente. En este trabajo de tesis determinamos que 2OHE<sub>2</sub>, 2ME<sub>2</sub>, y 4ME<sub>2</sub> no disminuyen la viabilidad de las células de Leydig induciendo un estrés oxidativo en este tipo celular, ya que la co-incubación de estos metabolitos con N-Acetilcisteína (NAC), un poderoso anti-oxidante que bloquea el efecto deletéreo que ejercen estos metabolitos en diferentes tipos

celulares (Hurh et al., 2004, Molina et al., 2012) no bloqueó el efecto deletéreo que estos ejercen sobre las células de Leydig.

El hecho que 2OHE<sub>2</sub> no disminuye la viabilidad de las células de Leydig a través de un aumento del estrés oxidativo fue un resultado inesperado, ya que este metabolito disminuye la viabilidad de espermatozoides humanos y de células de Sertoli *in vitro* incrementando las especies reactivas del oxígeno en estos tipos celulares (Molina et al., 2012, Bennetts et al., 2008). Más aún, en nuestro laboratorio determinamos previamente que la dosis de NAC utilizada en este trabajo fue capaz de inhibir el efecto deletéreo que ejerce 2OHE<sub>2</sub> 20 µM sobre las células de Sertoli (Molina et al., 2012). Los posibles mecanismos por los cuales 2OHE<sub>2</sub> disminuyen la viabilidad de las células de Leydig puede involucrar regulación en la actividad de proteínas quinasas involucradas en el ciclo celular y/o la activación de vías de muerte celular, un fenómeno ejercido por estos metabolitos en células de cáncer endometrial (Gong et al., 2011); sin embargo, si estos mecanismos están involucrados en la disminución de la viabilidad de las células de Leydig inducido por 2OHE<sub>2</sub> aún debe ser dilucidado.

## 7. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que hidroxiestradioles y metoxiestradioles se producirían normalmente en el testículo de murinos y principalmente a nivel de células de Leydig. Sin embargo, altas concentraciones de 2OHE2, 2ME2, y 4ME2 disminuyen significativamente la viabilidad de las células de Leydig *in vitro* a través de diferentes mecanismos. Estos resultados, en conjunto a los previos obtenidos en nuestro laboratorio confirmarían que un aumento en las concentraciones intratesticulares de estos metabolitos afectarían negativamente la fisiología testicular. Aún cuando los resultados de esta tesis son claros, estos deben ser validados utilizando cultivos primarios de células de Leydig.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ABOU-DONIA, M. B., SULIMAN, H. B., KHAN, W. A. & ABDEL-RAHMAN, A. A.** 2003. Testicular germ-cell apoptosis in stressed rats following combined exposure to pyridostigmine bromide, N,N-diethyl m-toluamide (DEET), and permethrin. *J Toxicol Environ Health A*, 66, 57-73.
- AGGARWAL, A., MISRO, M. M., MAHESHWARI, A. & SEHGAL, N.** 2012. Differential modulation of apoptotic gene expression by N-acetyl-L-cysteine in Leydig cells stimulated persistently with hCG in vivo. *Mol Cell Endocrinol*, 348, 155-64.
- AGGARWAL, A., MISRO, M. M., MAHESHWARI, A., SEHGAL, N. & NANDAN, D.** 2010. N-acetylcysteine counteracts oxidative stress and prevents hCG-induced apoptosis in rat Leydig cells through down regulation of caspase-8 and JNK. *Mol Reprod Dev*, 77, 900-9.
- ANDERSSON, A. M., JORGENSEN, N., FRYDELUND-LARSEN, L., RAJPERT-DE MEYTS, E. & SKAKKEBAEK, N. E.** 2004. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 3161-7.
- ARBISER, J. L., PANIGRATHY, D., KLAUBER, N., RUPNICK, M., FLYNN, E., UDAGAWA, T. & D'AMATO, R. J.** 1999. The antiangiogenic agents TNP-470 and 2-methoxyestradiol inhibit the growth of angiosarcoma in mice. *J Am Acad Dermatol*, 40, 925-9.
- BARCHIESI, F., JACKSON, E. K., GILLESPIE, D. G., ZACHARIA, L. C., FINGERLE, J. & DUBEY, R. K.** 2002. Methoxyestradiols mediate estradiol-induced antimitogenesis in human aortic SMCs. *Hypertension*, 39, 874-9.
- BENNETTS, L. E., DE IULIIS, G. N., NIXON, B., KIME, M., ZELSKI, K., MCVICAR, C. M., LEWIS, S. E. & AITKEN, R. J.** 2008. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat Res*, 641, 1-11.
- BRADFORD, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- CAVALIERI, E., FRENKEL, K., LIEHR, J. G., ROGAN, E. & ROY, D.** 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 75-93.
- COOKE, B. A., CHOI, M. C., DIRAMI, G., LOPEZ-RUIZ, M. P. & WEST, A. P.** 1992. Control of steroidogenesis in Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43, 445-9.
- CRAWFORD, E. D. & WELLS, J. A.** 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem*, 80, 1055-87.
- CHANG, I., LIU, J., MAJID, S., SAINI, S., ZAMAN, M. S., YAMAMURA, S., SHAHRYARI, V., CHIYOMARU, T., DENG, G., DAHIYA, R. & TANAKA, Y.** 2012. Catechol-O-methyltransferase-mediated metabolism of 4-hydroxyestradiol inhibits

- the growth of human renal cancer cells through the apoptotic pathway. *Carcinogenesis*, 33, 420-6.
- CHATTERJEE, A., CHANG, X., NAGPAL, J. K., CHANG, S., UPADHYAY, S., CALIFANO, J., TRINK, B. & SIDRANSKY, D.** 2008. Targeting human 8-oxoguanine DNA glycosylase to mitochondria protects cells from 2-methoxyestradiol-induced-mitochondria-dependent apoptosis. *Oncogene*, 27, 3710-20.
- CHEN, Y., MCMILLAN-WARD, E., KONG, J., ISRAELS, S. J. & GIBSON, S. B.** 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*, 15, 171-82.
- CHENG, J., FU, J. L. & ZHOU, Z. C.** 2003. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Toxicology*, 187, 139-48.
- CHENG, Y., CHANG, L. W., CHENG, L. C., TSAI, M. H. & LIN, P.** 2007. 4-Methoxyestradiol-induced oxidative injuries in human lung epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220, 271-7.
- CHOUDHARY, D., JANSSON, I., SCHENKMAN, J. B., SARFARAZI, M. & STOILOV, I.** 2003. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Arch Biochem Biophys*, 414, 91-100.
- CHUNG, J. Y., KIM, Y. J., KIM, J. Y., LEE, S. G., PARK, J. E., KIM, W. R., YOON, Y. D., YOO, K. S., YOO, Y. H. & KIM, J. M.** 2011. Benzo[a]pyrene reduces testosterone production in rat Leydig cells via a direct disturbance of testicular steroidogenic machinery. *Environ Health Perspect*, 119, 1569-74.
- DANKERS, A. C., ROELOFS, M. J., PIERSMA, A. H., SWEEP, F. C., RUSSEL, F. G., VAN DEN BERG, M., VAN DUURSEN, M. B. & MASEREEUW, R.** 2013. Endocrine Disruptors Differentially Target ATP-Binding Cassette Transporters in the Blood-Testis Barrier and Affect Leydig Cell Testosterone Secretion *In Vitro*. *Toxicol Sci*, 136, 382-91.
- DAWLING, S., HACHEY, D. L., ROODI, N. & PARL, F. F.** 2004. In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol*, 17, 1258-64.
- DEB, S., KAWAI, M., CHANG, T. K. & BANDIERA, S. M.** 2010. CYP1B1 expression in rat testis and Leydig cells is not inducible by aryl hydrocarbon receptor agonists. *Xenobiotica*, 40, 447-57.
- DEVOTO, E., MADARIAGA, M. & LIOI, X.** 2000. [Causes of male infertility. The contribution of the endocrine factor]. *Rev Med Chil*, 128, 184-92.
- DUBEY, R. K., GILLESPIE, D. G., ZACHARIA, L. C., ROSSELLI, M., IMTHURN, B. & JACKSON, E. K.** 2002. Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of locally applied estradiol on cardiac fibroblast growth. *Hypertension*, 39, 412-7.
- EICHENLAUB-RITTER, U., WINTERSCHIEDT, U., VOGT, E., SHEN, Y., TINNEBERG, H. R. & SORENSEN, R.** 2007. 2-methoxyestradiol induces spindle aberrations, chromosome congression failure, and nondisjunction in mouse oocytes. *Biol Reprod*, 76, 784-93.
- ELINOS-BAEZ, C. M., MALDONADO, V. & MELENDEZ-ZAJGLA, J.** 2003. [Caspases: apoptosis inducing molecules]. *Gac Med Mex*, 139, 493-9.

- FOTSIS, T., ZHANG, Y., PEPPER, M. S., ADLERCREUTZ, H., MONTESANO, R., NAWROTH, P. P. & SCHWEIGERER, L.** 1994. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*, 368, 237-9.
- FOWLER, P. A., ABRAMOVICH, D. R., HAITES, N. E., CASH, P., GROOME, N. P., AL-QAHTANI, A., MURRAY, T. J. & LEA, R. G.** 2007. Human fetal testis Leydig cell disruption by exposure to the pesticide dieldrin at low concentrations. *Hum Reprod*, 22, 2919-27.
- FUKUI, M. & ZHU, B. T.** 2009. Mechanism of 2-methoxyestradiol-induced apoptosis and growth arrest in human breast cancer cells. *Mol Carcinog*, 48, 66-78.
- GE, R., CHEN, G. & HARDY, M.** 2009. The Role of the Leydig Cell in Spermatogenic Function. In: CHENG, C. Y. (ed.) *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Springer New York.
- GONG, Q. F., LIU, E. H., XIN, R., HUANG, X. & GAO, N.** 2011. 2ME and 2OHE2 exhibit growth inhibitory effects and cell cycle arrest at G2/M in RL95-2 human endometrial cancer cells through activation of p53 and Chk1. *Mol Cell Biochem*, 352, 221-30.
- HURH, Y. J., CHEN, Z. H., NA, H. K., HAN, S. Y. & SURH, Y. J.** 2004. 2-Hydroxyestradiol induces oxidative DNA damage and apoptosis in human mammary epithelial cells. *J Toxicol Environ Health A*, 67, 1939-53.
- JOBE, S. O., RAMADOSS, J., KOCH, J. M., JIANG, Y., ZHENG, J. & MAGNESS, R. R.** 2010. Estradiol-17beta and its cytochrome P450- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites stimulate proliferation in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. *Hypertension*, 55, 1005-11.
- JUREWICZ, J., HANKE, W., RADWAN, M. & BONDE, J. P.** 2009. Environmental factors and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health*, 22, 305-29.
- KATO, S., SADARANGANI, A., LANGE, S., DELPIANO, A. M., VARGAS, M., BRANES, J., CARVAJAL, J., LIPKOWITZ, S., OWEN, G. I. & CUELLO, M. A.** 2008. 2-methoxyestradiol mediates apoptosis through caspase-dependent and independent mechanisms in ovarian cancer cells but not in normal counterparts. *Reprod Sci*, 15, 878-94.
- KAUFMANN, S. H., DESNOYERS, S., OTTAVIANO, Y., DAVIDSON, N. E. & POIRIER, G. G.** 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 53, 3976-85.
- KROCKOVA, J. Z., MASSANYI, P., SIROTKIN, A. V., PIVKO, J., MAKAREVICH, A. V., LUKAC, N., CAPCAROVA, M., TOMAN, R. & POLAKOVA, Z.** 2011. Nickel induced structural and functional alterations in mouse Leydig cells in vitro. *J Trace Elem Med Biol*, 25, 14-8.
- LAKHANI, N. J., SARKAR, M. A., VENITZ, J. & FIGG, W. D.** 2003. 2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent. *Pharmacotherapy*, 23, 165-72.
- LAMBERT, C., APEL, K., BIESALSKI, H. K. & FRANK, J.** 2004. 2-methoxyestradiol induces caspase-independent, mitochondria-centered apoptosis in DS-sarcoma cells. *International Journal of Cancer*, 108, 493-501.
- LARDONE, M. C., CASTILLO, P., VALDEVENTO, R., EBENSPERGER, M., RONCO, A. M., POMMER, R., PIOTTANTE, A. & CASTRO, A.** 2010. P450-aromatase

- activity and expression in human testicular tissues with severe spermatogenic failure. *Int J Androl*, 33, 650-60.
- LATTANZI, M. L., SANTOS, C. B., MUDRY, M. D. & BARANAO, J. L.** 2003. Exposure of bovine oocytes to the endogenous metabolite 2-methoxyestradiol during in vitro maturation inhibits early embryonic development. *Biol Reprod*, 69, 1793-800.
- LEHMANN, L., JIANG, L. & WAGNER, J.** 2008. Soy isoflavones decrease the catechol-O-methyltransferase-mediated inactivation of 4-hydroxyestradiol in cultured MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, 29, 363-70.
- LEUNG, G. S., KAWAI, M., TAI, J. K., CHEN, J., BANDIERA, S. M. & CHANG, T. K.** 2009. Developmental expression and endocrine regulation of CYP1B1 in rat testis. *Drug Metab Dispos*, 37, 523-8.
- LI, Y. J., SONG, T. B., CAI, Y. Y., ZHOU, J. S., SONG, X., ZHAO, X. & WU, X. L.** 2009. Bisphenol A exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci*, 108, 427-36.
- LIANG, J., ZHU, H., LI, C., DING, Y., ZHOU, Z. & WU, Q.** 2012. Neonatal exposure to benzo[a]pyrene decreases the levels of serum testosterone and histone H3K14 acetylation of the StAR promoter in the testes of SD rats. *Toxicology*, 302, 285-91.
- LIN, D., SUGAWARA, T., STRAUSS, J. F., 3RD, CLARK, B. J., STOCCO, D. M., SAENGER, P., ROGOL, A. & MILLER, W. L.** 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267, 1828-31.
- MARKIDES, C. S., ROY, D. & LIEHR, J. G.** 1998. Concentration dependence of prooxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. *Arch Biochem Biophys*, 360, 105-12.
- MARTUCCI, C. & FISHMAN, J.** 1976. Uterine estrogen receptor binding of catecholestrogens and of estetrol (1,3,5(10)-estratriene-3,15alpha,16alpha,17beta-tetrol). *Steroids*, 27, 325-33.
- MARTUCCI, C. & FISHMAN, J.** 1977. Direction of estradiol metabolism as a control of its hormonal action--uterotrophic activity of estradiol metabolites. *Endocrinology*, 101, 1709-15.
- MATHER, J. P.** 1980. Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines. *Biol Reprod*, 23, 243-52.
- MOLINA, C., VALENCIA, C., VARGAS, C., CASTRO, A. & PARADA-BUSTAMANTE, A.** 2013. Incrementados niveles de 2-hidroxiestradiol como posible factor asociado a infertilidad masculina. *XXIII reunión bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (SCHRD)*. Cancún México
- MOLINA, C., VARGAS, C., TAPIA-PIZARRO, A., CASTRO, A. & PARADA-BUSTAMANTE, A.** Efecto de hidroxiestradiolos y metoxiestradiolos sobre la viabilidad de células de Sertoli en cultivo., 2012 XXIII reunión anual de la sociedad chilena de reproducción y desarrollo (SCHRD).
- N'TUMBA-BYN, T., MOISON, D., LACROIX, M., LECUREUIL, C., LESAGE, L., PRUD'HOMME, S. M., POZZI-GAUDIN, S., FRYDMAN, R., BENACHI, A., LIVERA, G., ROUILLER-FABRE, V. & HABERT, R.** 2012. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One*, 7, e51579.

- NISHIMURA, M., YAGUTI, H., YOSHITSUGU, H., NAITO, S. & SATOH, T.** 2003. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, 123, 369-75.
- NUNEZ, G., BENEDICT, M. A., HU, Y. & INOHARA, N.** 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17, 3237-45.
- OVERBYE, A. & SEGLEN, P. O.** 2009. Phosphorylated and non-phosphorylated forms of catechol O-methyltransferase in rat liver, brain and other tissues. *Biochem J*, 417, 535-45.
- OZEN, O. A., KUS, M. A., KUS, I., ALKOC, O. A. & SONGUR, A.** 2008. Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: an immunohistochemical and biochemical study. *Syst Biol Reprod Med*, 54, 169-76.
- PARADA-BUSTAMANTE, A., ORIHUELA, P. A., MOLINA, C., CARDENAS, H., REUQUÉN, P., VALENCIA, C. & RINCÓN, R.** 2013. Hydroxyestradiols and Methoxyestradiols as Endogenous Factors Associated to Physiological and Physiopathological Conditions. In: PALMERI, R. & GRIMAUDO, S. (eds.) *Estradiol: Synthesis, Health Effects and Drug Interactions*. Nova Science Publishers.
- PARADA-BUSTAMANTE, A., ORIHUELA, P. A., RIOS, M., CUEVAS, C. A., OROSTICA, M. L., VELASQUEZ, L. A., VILLALON, M. J. & CROXATTO, H. B.** 2010. A non-genomic signaling pathway shut down by mating changes the estradiol-induced gene expression profile in the rat oviduct. *Reproduction*, 139, 631-44.
- PARADA-BUSTAMANTE, A., ORIHUELA, P. A., RIOS, M., NAVARRETE-GOMEZ, P. A., CUEVAS, C. A., VELASQUEZ, L. A., VILLALON, M. J. & CROXATTO, H. B.** 2007. Catechol-o-methyltransferase and methoxyestradiols participate in the intraoviductal nongenomic pathway through which estradiol accelerates egg transport in cycling rats. *Biol Reprod*, 77, 934-41.
- REVEL, A., RAANANI, H., YOUNGLAI, E., XU, J., HAN, R., SAVOURET, J. F. & CASPER, R. F.** 2001. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol*, 15, 479-86.
- ROTH, M. Y., LIN, K., AMORY, J. K., MATSUMOTO, A. M., ANAWALT, B. D., SNYDER, C. N., KALHORN, T. F., BREMNER, W. J. & PAGE, S. T.** 2010. Serum LH correlates highly with intratesticular steroid levels in normal men. *J Androl*, 31, 138-45.
- ROUILLER, V., GANGNERAU, M. N., VAYSSIERE, J. L. & PICON, R.** 1990. Cholesterol side-chain cleavage activity in rat fetal gonads: a limiting step for ovarian steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 72, 111-20.
- RUSSO, J., HASAN LAREEF, M., BALOGH, G., GUO, S. & RUSSO, I. H.** 2003. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 87, 1-25.
- SALIH, S. M., JAMALUDDIN, M., SALAMA, S. A., FADL, A. A., NAGAMANI, M. & AL-HENDY, A.** 2008a. Regulation of catechol O-methyltransferase expression in granulosa cells: a potential role for follicular arrest in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 89, 1414-21.
- SALIH, S. M., SALAMA, S. A., FADL, A. A., NAGAMANI, M. & AL-HENDY, A.** 2008b. Expression and cyclic variations of catechol-O-methyl transferase in human endometrial stroma. *Fertil Steril*, 90, 789-97.

- SALVESEN, G. S. & RIEDL, S. J.** 2008. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 615, 13-23.
- SCHENDZIELORZ, N., RYSA, A., REENILA, I., RAASMAJA, A. & MANNISTO, P. T.** 2011. Complex estrogenic regulation of catechol-O-methyltransferase (COMT) in rats. *J Physiol Pharmacol*, 62, 483-90.
- SCHULZE, C.** 1984. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 88, 1-104.
- SEEGERS, J. C., VAN ASWEGEN, C. H., NIEUWOUDT, B. L. & JOUBERT, W. S.** 1991. Morphological effects of the catecholestrogens on cells of the seminiferous tubules of Sprague-Dawley rats. *Andrologia*, 23, 339-45.
- SHIMADA, T., HAYES, C. L., YAMAZAKI, H., AMIN, S., HECHT, S. S., GUENGERICH, F. P. & SUTTER, T. R.** 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res*, 56, 2979-84.
- STOCCO, D. M. & CLARK, B. J.** 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*, 17, 221-44.
- STOKER, T. E., LAWS, S. C., GUIDICI, D. L. & COOPER, R. L.** 2000. The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicol Sci*, 58, 50-9.
- SUGAWARA, T., LIN, D., HOLT, J. A., MARTIN, K. O., JAVITT, N. B., MILLER, W. L. & STRAUSS, J. F., 3RD** 1995. Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry*, 34, 12506-12.
- SUTTER, T. R., TANG, Y. M., HAYES, C. L., WO, Y. Y., JABS, E. W., LI, X., YIN, H., CODY, C. W. & GREENLEE, W. F.** 1994. Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem*, 269, 13092-9.
- THAYYULLATHIL, F., PALLICHANKANDY, S., RAHMAN, A., KIZHAKKAYIL, J., CHATHOTH, S., PATEL, M. & GALADARI, S.** 2013. Caspase-3 mediated release of SAC domain containing fragment from Par-4 is necessary for the sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Mol Signal*, 8, 2.
- TSUCHIYA, Y., NAKAJIMA, M. & YOKOI, T.** 2005. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, 227, 115-24.
- VARGAS, C., MOLINA C, EBENSPERGER M, VALDEVENTO R, LARDONE MC, PIOTTANTE A, FLOREZ M, CASTRO A & AND A, P.-B.** Expresión de las enzimas CYP1A1, CYP1B1 y COMT en tejido testicular humano con espermatogénesis conservada. XXIII reunión anual de la sociedad chilena de reproducción y desarrollo (SCHR). 2012 Viña del Mar
- WONG, W. Y., THOMAS, C. M., MERKUS, J. M., ZIELHUIS, G. A. & STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.** 2000. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril*, 73, 435-42.
- YANG, J. M., ARNUSH, M., CHEN, Q. Y., WU, X. D., PANG, B. & JIANG, X. Z.** 2003. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. *Reprod Toxicol*, 17, 553-60.
- YOSHIDA, S., HIRANO, S., SHIKAGAWA, K., HIRATA, S., ROKUTA, S., TAKANO, H., ICHINOSE, T. & TAKEDA, K.** 2007. Diesel exhaust particles suppress expression of

- sex steroid hormone receptors in TM3 mouse Leydig cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 24, 292-6.
- ZHANG, Q., MA, Y., CHENG, Y. F., LI, W. J., ZHANG, Z. & CHEN, S. Y.** 2011a. Involvement of reactive oxygen species in 2-methoxyestradiol-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Cancer Lett*, 313, 201-10.
- ZHANG, Q., ZOU, P., ZHAN, H., ZHANG, M., ZHANG, L., GE, R. S. & HUANG, Y.** 2011b. Dihydrolipoamide dehydrogenase and cAMP are associated with cadmium-mediated Leydig cell damage. *Toxicol Lett*, 205, 183-9.
- ZHANG, Q. X., ZHANG, X. Y., ZHANG, Z. M., LU, W., LIU, L., LI, G., CAI, Z. M., GUI, Y. T. & CHANG, C.** 2012. Identification of testosterone-/androgen receptor-regulated genes in mouse Sertoli cells. *Asian J Androl*, 14, 294-300.
- ZHU, B. T. & CONNEY, A. H.** 1998. Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res*, 58, 2269-77.