

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias
Biológicas

**ESTUDIO DE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN
CÉLULAS MONONUCLEARES DE PERSONAS
SANAS Y CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÓNICA**

Bioq. Luisa Gaydou

Director de Tesis: Dr. Jorge Guillermo Ramos
Co-director de Tesis: Dra. Verónica Lis Bosquiazzo

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL - CONICET)
Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa (FBCB - UNL)
Santa Fe.

-2022-

Dedicado...

A mi mamá, por su apoyo en todos mis proyectos.

A mis hijas, Antonella y Olivia, por su cariño incondicional.

A Matías, por siempre creer en mí, y alentarme a seguir mis sueños.

Sin ustedes, este viaje no hubiera sido posible.

Gracias.

*“El conocimiento
no es una vasija que se llena,
sino un fuego que se enciende”*

Plutarco

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral por brindarme esta oportunidad, y por permitir y alentar que sus docentes alcancen formación de cuarto nivel.

A mis directores, Dr. Guillermo Ramos y Dra. Verónica Bosquiazzo, por confiar en mí y guiarme en esta etapa de crecimiento.

Al Dr. Enrique H. Luque y a la Dra. Mónica Muñoz de Toro, por brindarme un espacio donde poder llevar a cabo parte de mi trabajo de investigación.

A los integrantes del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, los actuales y los que fueron pasando y dejando su cariño, por todo su acompañamiento, ayuda y consejos.

Al personal del Laboratorio de Análisis BLUT, Ale, Dani y Cari, por la buena onda y predisposición, y por su ayuda en la recolección de muestras.

A los y las Chiquis de Clínica: Adri, Adrián, Ale, Ana, Cori, Emi, Flor, Guillita, Juli, Pame, Ro, Vero, Chuli, FlorA, Florcita y Nico. Por las horas compartidas, risas, mates, encuentros y apoyo incondicional en este camino recorrido. Haberlo transitado con ustedes fue un privilegio, son un excelente grupo profesional y, fundamentalmente, humano.

A mi mamá, mi abuela, mi hermano y mis suegros, por apoyarme y ayudarme, y fundamentalmente por alentarme a seguir creciendo.

A mi papá y a mi abuela, que me cuidan desde el cielo.

Y fundamentalmente a mis tres mosqueteros, Matías, Anto y Oli, mi motor en todos mis emprendimientos. Por su confianza, empuje, amor y aguante. Todo esto es por y para ustedes.

¡Infinitamente agradecida!

APORTES CIENTÍFICOS - TECNOLÓGICOS

Publicaciones

L Gaydou, MF Rossetti, MV Tschopp, C Stoker, VL Bosquiazzo, JG Ramos (2020). Epigenetic regulation of steroidogenic enzymes expressed in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 204:105767. doi: 10.1016/j.jsbmb.2020.105767

Patentes solicitadas

El día 27 de noviembre de 2019 se presentó en Argentina la solicitud de patente nro 20190103474, de co-titularidad UNL-CONICET, denominada: "Un proceso de detección de Leucemia Linfocítica Crónica".

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas y símbolos	6
Resumen	8
Abstract	10
INTRODUCCIÓN	12
1. Esteroidogénesis	13
1.1. Principales enzimas involucradas en la esteroidogénesis	14
1.1.1. Citocromo P450 _{scc}	14
1.1.2. Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda	14
1.1.3. Citocromo P450 _{c17}	15
1.1.4. 3 beta hidroxiesteroide deshidrogenasa	15
1.1.5. 17 beta hidroxiesteroide deshidrogenasas	15
1.1.6. Aromatasa	17
1.1.7. 5 alfa reductasa	17
1.1.8. 3 alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa	18
1.2. Regulación de la esteroidogénesis	18
1.2.1. Regulación aguda de la esteroidogénesis	18
1.2.2. Regulación crónica de la esteroidogénesis	19
1.2.3. Otros mecanismos de regulación	20
1.3. Efectos de los esteroides sobre células del sistema inmune	22
1.4. Esteroidogénesis en células del sistema inmune	22
1.5. Regulación de enzimas esteroidogénicas en células del sistema inmune	23
1.6. Esteroidogénesis en células del sistema inmune y su asociación con distintas patologías	24
2. Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)	25
2.1. Epidemiología	25
2.2. Sintomatología	25
2.3. Diagnóstico	25
2.4. Pronóstico	26
2.5. Tratamiento	28
2.6. Alteraciones epigenéticas en LLC	28
2.7. Posible rol de los esteroides en LLC	30
OBJETIVOS	32
1. Objetivo general	33
2. Objetivos específicos	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. Pacientes y muestras	35

2.	Determinación de los niveles séricos de testosterona, estradiol y progesterona	36
3.	Obtención de CMSP y placenta humana	36
4.	Análisis de ARN mensajero	37
4.1.	Extracción de ARN y transcripción reversa	37
4.2.	Estudio de la expresión de moléculas de interés por PCR en tiempo real	38
5.	Análisis proteico	41
5.1.	Generación del anticuerpo anti 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa 5	41
5.2.	Inmunocitoquímica	44
6.	Estudios de metilación	45
6.1.	Análisis bioinformático	45
6.2.	Extracción de ADN, digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y PCR en tiempo real	46
7.	Cultivos celulares	48
8.	Análisis estadísticos	49
	RESULTADOS	50
1.	Niveles séricos de testosterona, estradiol y progesterona en pacientes con LLC	51
2.	Estudios de CMSP circulantes	51
2.1.	Caracterización de la expresión de ARNm de enzimas esteroideogénicas en individuos sanos y en pacientes con LLC	51
2.2.	Obtención del antígeno para la generación del anticuerpo anti 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa 5	55
2.3.	Localización de 5 alfa reductasa 1 y aromatasas	56
2.4.	Estudio de metilación de promotores de enzimas esteroideogénicas en individuos sanos y en pacientes con LLC	57
2.5.	Caracterización de la expresión de ARNm de citoquinas en individuos sanos y en pacientes con LLC	59
2.6.	Correlación entre la expresión del ARNm de enzimas esteroideogénicas y el ARNm de las diferentes citoquinas en individuos sanos y en pacientes con LLC	61
3.	Estudios de CMSP en cultivo	63
3.1.	Caracterización de la expresión de ARNm de 5 alfa reductasa 1 y 3 en individuos sanos y en pacientes con LLC	64
3.2.	Caracterización de la expresión de ARNm de IL 2, IL 4 e IL 10 en individuos sanos y en pacientes con LLC	64
	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
1.	Determinación de los niveles séricos de testosterona, estradiol y progesterona	67
2.	Caracterización de la expresión de ARNm de enzimas esteroideogénicas y localización de 5 alfa reductasa 1 y aromatasas en CMSP de individuos sanos y de pacientes con LLC	67

3.	Estudio de metilación de promotores de enzimas esteroideogénicas en CMSP de individuos sanos y de pacientes con LLC	70
4.	Caracterización de la expresión de ARNm de citoquinas, y correlación de la misma con la expresión de ARNm de enzimas esteroideogénicas en CMSP de individuos sanos y de pacientes con LLC	72
	CONCLUSIÓN	75
	BIBLIOGRAFÍA	77

Abreviaturas y símbolos

17OHP	17 hidroxiprogesterona
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 α -HSD	3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4-isomerasa
5 α -R	5 α reductasa
A	adultos
Aco	anticonceptivos orales
ACTH	hormona adrenocorticotropa
ADNc	ADN copia
AJ	adultos jóvenes
AM	adultos mayores
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARNnc	ARN no codificante
BCR	receptor de células B
CMSP	células mononucleares de sangre periférica
Ct	ciclo umbral
DAB	diaminobencidina
DHEA	dehidroepiandrosterona
DHT	dihidrotestosterona
DMSO	dimetilsulfóxido
DNMT	ADN metiltransferasa
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfatos
E1	estrona
E2	estradiol
Fo	folicular
GCh	gonadotropina coriónica humana
ICQ	inmunocitoquímica
IFN	interferón
IL	interleuquina
LH	hormona luteinizante
LLC	leucemia linfocítica crónica
LPS	lipopolisacárido
Lu	lútea
mLLC	LLC mutado (se refiere al estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas)

M-LLC	mujeres con LLC
M	mujeres
miARN	micro ARN
MS	mujeres sanas
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NF- κ B	del inglés, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
P4	progesterona
P450aro	aromatasa
P450c17	citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa
P450scc	citocromo P450 de escisión de la cadena lateral
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PKC	proteína quinasa C
PWM	mitógeno de la fitolaca
RA	receptor de andrógenos
RE	receptor de estrógenos
SF	solución fisiológica
StAR	proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
TNF	factor de necrosis tumoral
uLLC	LLC no mutado (se refiere al estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas)
UTR	del inglés, untranslated region
V-LLC	varones con LLC
V	varones
VS	varones sanos
Zap-70	del inglés, Zeta-chain-associated Protein 70

Resumen

Diversos estudios han demostrado que la síntesis de hormonas esteroideas ocurre en diferentes órganos y tejidos además de las gónadas, tales como glándulas adrenales, cerebro, intestino, piel, tejido adiposo y hueso. En los últimos 30 años, se ha evidenciado también la presencia de enzimas esteroideogénicas en células del sistema inmune, tales como linfocitos, macrófagos y basófilos de individuos sanos de ambos sexos y diferentes edades. Sin embargo, hay discrepancias respecto a cuáles son las enzimas presentes en cada subpoblación celular, y las vías esteroideogénicas activas. En situaciones patológicas, la producción local de estrógenos por parte de las células del sistema inmune ha sido implicada en la patogénesis del cáncer de mama y en artritis reumatoidea.

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es la leucemia más común en nuestra sociedad, afectando principalmente a varones mayores (relación hombre:mujer 1,9:1), con una edad media de diagnóstico de 70 años, aunque a veces puede iniciar en edades más tempranas (30 - 40 años). Se caracteriza por la proliferación y acumulación clonal de células B maduras CD5 positivas en sangre, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo. Dada la mayor incidencia y peor pronóstico de la enfermedad en varones respecto a las mujeres, algunos autores han estudiado el posible rol de las hormonas sexuales en la LLC. Además, se ha observado la presencia de receptores de estrógenos y andrógenos en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos sanos, así como la presencia del receptor de estrógenos en CMSP de individuos con LLC. Sin embargo, no hay estudios respecto a la síntesis de hormonas esteroideas dentro de las células mononucleares de pacientes con la enfermedad.

En las últimas 3 décadas, ha cobrado importancia el rol de las modificaciones epigenéticas en la oncogénesis. Los cambios epigenéticos alteran los patrones de expresión génica sin modificar la secuencia de ADN, y lo hacen principalmente a través de tres mecanismos diferentes: metilación del ADN, modificaciones de las histonas y miARN. Hay un creciente interés en estudiar las modificaciones epigenéticas en leucemia para encontrar nuevos biomarcadores de detección temprana de la patología, diagnóstico, pronóstico, y para predecir la respuesta al tratamiento. Además, el hecho de que las alteraciones epigenéticas sean reversibles hace que éstas sean una diana de interés para nuevos tratamientos. En los últimos años, el metiloma de la LLC ha sido ampliamente estudiado. Se ha visto que, en general, el ADN de pacientes con esta enfermedad está hipometilado, y que ésta condición se asoció a procesos claves en la patogénesis de LLC. Además, se ha evidenciado que ciertos genes asociados a un pronóstico más favorable estaban hipermetilados.

Es por eso que el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la vía de la esteroideogénesis en células mononucleares de individuos normales y de pacientes con LLC, relacionarla con la expresión de interleuquinas, y evaluar la regulación de la vía por mecanismos epigenéticos o mediante el uso de promotores alternativos.

Determinamos que las CMSP expresan muchas de las enzimas que se requieren para la síntesis de esteroides, reforzando la idea de que estas células podrían tener mecanismos de acción no tradicionales. La expresión del ARNm de varias enzimas asociadas al metabolismo de la testosterona se encontró disminuida en CMSP

de pacientes con LLC, tales como 5α -R 1, 5α -R 3, 3α -HSD 3, 17β -HSD 1 y 17β -HSD 5. A su vez, los resultados obtenidos en ensayos de cultivo celular realizados in vitro parecen indicar que en las CMSP de individuos sanos, la testosterona actuaría como regulador positivo de la expresión génica de la 5α -R 1 ya que el agregado exógeno de esta hormona estimula la expresión de ARN mensajero de la enzima. Esto no ocurre en individuos con LLC, sugiriendo que la vía androgénica no estaría activa, posiblemente debido a una disfunción o ausencia de receptores de andrógenos en las CMSP de estos pacientes. También observamos que la mayoría de las citoquinas analizadas presentan una menor expresión de ARNm en las células mononucleares de pacientes con LLC, y que en la patología aparecen asociaciones entre citoquinas y enzimas cuya función aún no es clara, la cual sería un tema de investigación a estudiar en el futuro. Por último, evidenciamos alteraciones en los estados de metilación de las regiones promotoras de 17β -HSD 1, 17β -HSD 5 y 5α -R 1 en la patología, que en el caso de mujeres con LLC, podría estar asociado con una menor expresión de la proteína. Estos resultados muestran que la vía de síntesis de esteroides, principalmente la androgénica, podría ser de elevada importancia para mantener el normal funcionamiento de CMSP.

Abstract

Several studies have established that steroid hormone synthesis occurs in organs and tissues besides the traditional ones (gonads), such as adrenal glands, brain, intestine, skin, fat and bone. Over the past 30 years, studies have shown that various steroidogenic enzymes are present in cells of the immune system, such as lymphocytes, macrophages and basophils of healthy individuals of both sexes and of different ages. However, there are still contradictory results regarding what enzymes, and which steroidogenic pathways, are active in each cell. In pathological situations, local production of estrogens from tissue-resident immune cells has been implicated in the pathogenesis of breast cancer and rheumatoid arthritis.

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most common form of leukemia in our society, affecting mainly adult males (1,9:1 male/female ratio), with a median age of diagnosis of 70 years, although it could present itself much early (30 - 40 years of age). It is characterized by proliferation and clonal accumulation of mature, CD5 positive B cells in blood, bone marrow, lymph nodes and spleen. Given the higher incidence and worse disease prognosis in males, some authors have studied the possible role of sex steroids in CLL. Furthermore, the presence of androgen and estrogen receptors has been established in mononuclear cells of healthy individuals, as well as the estrogen receptor in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of individuals with CLL. However, there are no studies available regarding sex steroid synthesis in mononuclear cells of patients with the disease.

In the last three decades, new evidence has emerged on how epigenetic alterations play a relevant role in oncogenesis. Epigenetic changes alter the patterns of gene expression without changing the DNA sequence, and they do so mainly by three different mechanisms: DNA methylation, histone modifications and miRNA. Epigenetic modifications in leukemia are studied with the goal of finding biomarkers for early disease detection, diagnosis, prognosis and prediction of treatment response. Furthermore, the reversible capacity of epigenetic alterations is of great interest as potential targets for therapeutic approaches. CLL methylome has been studied thoroughly. Generally, DNA from patients with this disease is hypomethylated, and this condition was linked to regions markedly involved in CLL pathogenesis. It was also noticed that certain genes associated with a more favorable prognosis displayed a hypermethylated status.

This is why the aim of our work was to study sex steroid synthesis in mononuclear cells of healthy individuals and with CLL, associate it with interleukin expression and evaluate possible regulatory mechanisms due to epigenetic modifications or by the use of alternative promoters.

In our work, we established that PBMCs express many steroidogenic enzymes, providing evidence that these cells could have non-traditional mechanisms of action. We also noticed diminished mRNA expression in CLL patients of several enzymes associated with testosterone metabolism, such as 5 α -R 1, 5 α -R 3, 3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1 y 17 β -HSD 5. Furthermore, results obtained from cultured cells appear to indicate that in healthy PBMCs, testosterone could act as a positive regulator of 5 α -R 1 gene expression, given that after adding the hormone to the cultured cells, we noticed an increment in 5 α -R 1 messenger RNA expression. The same does not occur in CLL patients, and this could imply that the androgen pathway is not active, and

also that androgen receptor expression could be absent, or its function could be altered in these individuals. We also noticed that the majority of the cytokines studied evidence lower mRNA expression in CLL tumor environment, and that in this disease, mRNA expression of certain cytokines seems to be associated to mRNA expression of some steroidogenic enzymes, although the reason for these associations is unclear and of interest. Lastly, we noticed that promoter regions of 17 β -HSD 1, 5 and 5 α -R 1 showed modifications in their methylation status in CLL, and in female patients with this disease, alterations of the 5 α -R 1 promoter could be associated with lower protein expression. These results show that steroidogenic pathways, mainly androgenic, might be of critical importance for correct functioning of PBMCs.

INTRODUCCIÓN

1. Esteroidogénesis

La esteroidogénesis es el proceso mediante el cual el colesterol es convertido a hormonas esteroideas biológicamente activas (W. L. Miller & Auchus, 2011). Esto ocurre a través de una vía clásica de síntesis, principalmente en las gónadas, quienes son la mayor fuente de esteroides (Fig. 1), y en las glándulas suprarrenales, productoras fundamentalmente de glucocorticoides y mineralocorticoides, y en menor proporción de esteroides (Antoniou-Tsigkos A, Zapanti E, s. f.; Van, 2013).

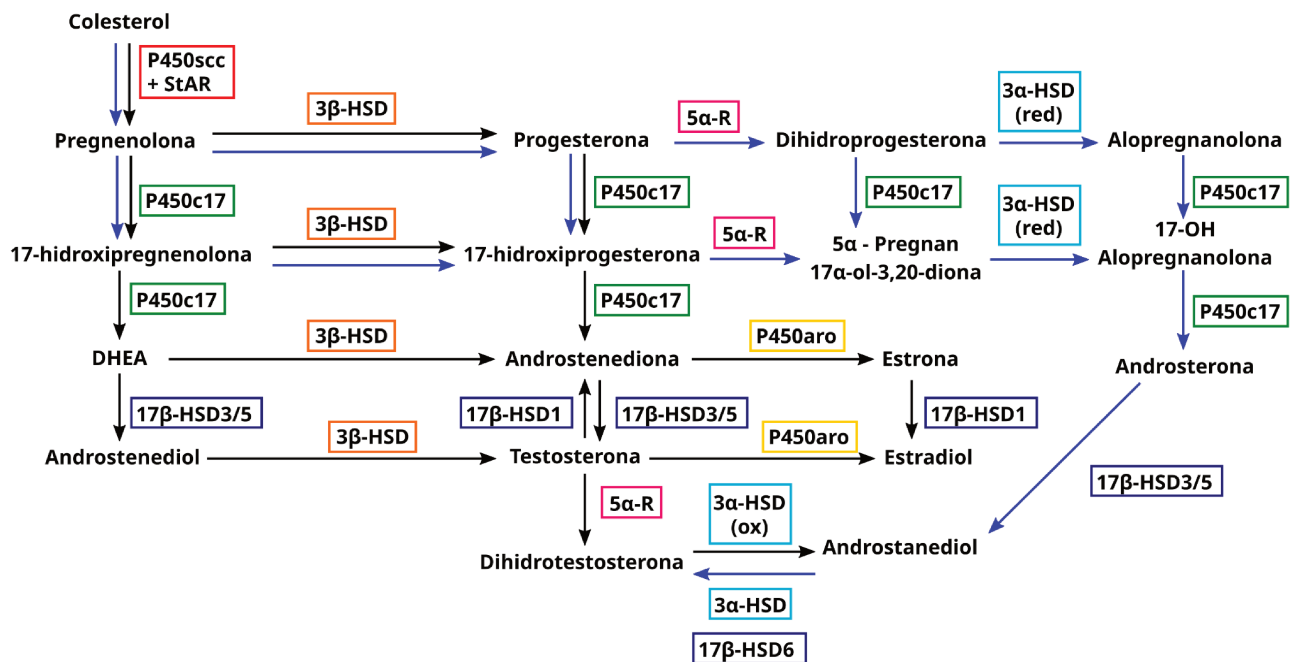


Figura 1. Vías de síntesis de esteroides. La vía clásica se indica con las flechas negras, y la vía alternativa de síntesis de andrógenos se indica con las flechas azules. P450scc: citocromo P450 de escisión de la cadena lateral; StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; P450c17: citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4-isomerasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; P450aro: aromatasas; 5 α -R: 5 α reductasa; 3 α -HSD: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. DHEA: dehidroepiandrosterona, red: reducción; ox: oxidación. Figura modificada de Miller & Auchus (2019).

Sin embargo, actualmente se sabe que además del modelo endocrino tradicional que establece que los esteroides se producen en las gónadas, la síntesis de estas hormonas ocurre en diversos órganos y tejidos más allá de los tradicionales, los llamados periféricos, de manera intracrina. La intracrinología reconoce la capacidad de cualquier tipo celular de producir y metabolizar esteroides, y por lo tanto regular la señalización de los mismos de manera autónoma (Rubinow, 2018). Los tejidos periféricos identificados como productores de esteroides son el cerebro (Reddy, 2010), intestinos (Bouguen et al., 2015), piel (Slominski et al., 2015), tejido adiposo (Li et al., 2015), hueso (Barakat et al., 2016) y riñón (Pagotto et al., 2011), y en muchos de ellos está activa una vía alternativa de síntesis de andrógenos (Fig. 1), la cual conduce a la producción de dihidrotestosterona (DHT) sin utilizar testosterona como intermediario (W. L. Miller & Auchus, 2019; Van, 2013).

Los ésteres de colesterol LDL son endocitados a la célula a través de receptores y luego se reservan o pasan a colesterol libre que se utiliza para la síntesis de hormonas (W. L. Miller & Auchus, 2011).

1.1. Principales enzimas involucradas en la esteroidogénesis

Las enzimas esteroidogénicas pertenecen a dos grupos: enzimas citocromo P450 e hidroxisteroide deshidrogenasas (HSD, Fig. 1). Las citocromo P450 pueden ser de tipo 1 (localizadas en la mitocondria), o de tipo 2 (localizadas en retículo endoplasmático). Las HSD pueden pertenecer a las aldo - ceto reductasas (AKR) o a las reductasas / deshidrogenasas de cadena corta (SDR). Las actividades de estas enzimas están moduladas por modificaciones post - traduccionales y por cofactores (W. L. Miller & Auchus, 2011). Las reacciones catalizadas por las citocromo P450 son irreversibles en condiciones fisiológicas, mientras que las HSD pueden ocurrir en ambas direcciones, ya sea oxidando o reduciendo los compuestos, y ello depende del cofactor disponible (Manenda et al., 2016).

1.1.1. Citocromo P450scc

El primer paso en la síntesis de esteroides, y también el limitante, es la conversión de colesterol a pregnenolona por la enzima P450scc (citocromo P450 de escisión de la cadena lateral, del inglés scc, *side chain cleavage*). Esta enzima es codificada por una única copia del gen CYP11A1 (Manenda et al., 2016; W. L. Miller & Auchus, 2011; Payne & Hales, 2004).

El proceso de conversión de colesterol a pregnenolona se realiza a través de tres reacciones químicas secuenciales: la hidroxilación del colesterol en su posición 22, la hidroxilación del 22-hidroxicolesterol en su posición 20, y la ruptura del enlace C20 - C22 del 20(R), 22(R) dihidroxicolesterol, generando finalmente pregnenolona (W. L. Miller & Auchus, 2011; Payne & Hales, 2004).

La P450scc se localiza en la membrana interna de la mitocondria, y es la única enzima descubierta que puede romper los enlaces de carbono entre las posiciones 20 y 22 del colesterol (Manenda et al., 2016). Su expresión es inducible por adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en las zonas reticular y fascicular de las suprarrenales, testículo y ovario, y por el sistema de proteína quinasa (PK) C en la zona glomerular. Por otro lado, su expresión en placenta es constitutiva. También se ha detectado actividad de esta enzima en el cerebro (W. L. Miller & Auchus, 2011).

1.1.2. Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

La proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR del inglés, *Steroidogenic Acute Regulatory protein*) es codificada por el gen STAR, y es la responsable de enviar colesterol desde la membrana externa de la mitocondria hacia la interna, donde es sustrato de la citocromo P450scc (W. L. Miller & Auchus, 2011). Numerosas evidencias sugieren que esta proteína también sería limitante en la síntesis de esteroides, participando en el control agudo de la esteroidogénesis (Selvaraj et al., 2018).

La expresión de StAR ha sido demostrada en la corteza adrenal, células de la teca y de la granulosa en ovario, cuerpo lúteo, y células de Leydig, así como también en cerebro, corazón pulmón, piel y tejido adiposo (Anuka et al., 2013; Selvaraj et al., 2018).

1.1.3. Citocromo P450c17

Ésta es la citocromo P450 17A1, y está codificada por el gen CYP17A1. Es fundamental en la producción de andrógenos y estrógenos (Manenda et al., 2016). Presenta actividad 17 α hidroxilasa y 17,20 liasa. Cataliza la hidroxilación del carbono 17 de la pregnenolona para formar 17 α -hidroxipregnenolona, y del C17 de la progesterona (P4) para producir 17 α -hidroxiprogesterona. Esos metabolitos luego son convertidos a dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, respectivamente, por la actividad 17, 20 liasa de esta enzima (Yoshimoto & Auchus, 2015).

La expresión de esta enzima ha sido demostrada en células de Leydig, células de la teca, células de la granulosa luteinizadas, zona reticular y fascicular de suprarrenales. No se encuentra en placenta humana (Payne & Hales, 2004). También se ha detectado expresión de esta enzima en intestino (Bouguen et al., 2015), tejido adiposo (Li et al., 2015), piel (Nikolakis et al., 2016) y áreas del cerebro (Pelletier, 2010).

1.1.4. 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa

Las isoenzimas 3 β -HSD/isomerasas son responsables de la oxidación e isomerización de pregnenolona a P4, 17-hidroxipregnenolona a 17-hidroxiprogesterona (17OHP), DHEA a androstenediona y androstenediol a testosterona (Simard et al., 2005). Se localizan principalmente asociadas a la membrana mitocondrial y microsomal (W. L. Miller & Auchus, 2011; Payne & Hales, 2004).

En seres humanos, existen dos isoenzimas, codificadas por dos genes distintos, las cuales comparten un 93,5% de su secuencia aminoacídica (W. L. Miller & Auchus, 2011). La 3 β -HSD 1, codificada por el gen 3 β HSD1, es la isoforma principal en placenta y tejidos periféricos como mama, hígado y cerebro. La 3 β -HSD 2, codificada por el gen 3 β HSD2, es la isoforma principal en suprarrenales, ovario y testículos (Simard et al., 2005).

1.1.5. 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasas

Las isoenzimas de esta familia de HSD presentan características particulares: 1) existen muchas 17 β -HSD diferentes; 2) algunas son preferentemente oxidasas, mientras que otras son principalmente reductasas; 3) difieren en su preferencia por sustrato y sitios de expresión; 4) hay inconsistencias en cuanto a su nomenclatura, en especial en lo que refiere a las isoenzimas de roedores; 5) algunas proteínas clasificadas como 17 β -HSD tienen poca actividad de 17 β -HSD, y están involucradas en otras reacciones (W. L. Miller & Auchus, 2011). Actualmente se han identificado 14 subtipos de 17 β -HSD en mamíferos, 13 de las cuales están involucradas en el metabolismo de esteroides humanos, como se muestra en la tabla 1 (Manenda et al., 2016). En humanos, la 17 β -HSD 9 pertenece al grupo de SDR que metaboliza retinol (Marchais-Oberwinkler et al., 2011), por eso no se incluye en la clasificación.

Tabla 1. Clasificación de las 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasas.

Tipo	Gen	Preferencia de cofactor	Sustrato específico de la	Localización celular	Localización tisular
------	-----	-------------------------	---------------------------	----------------------	----------------------

			vía esteroidogénica		
1	HSD17B1	NADP/NADPH	Estrógenos, andrógenos	Citosol	Placenta, ovarios, endometrio, mama
2	HSD17B2	NAD/NADH	Estrógenos, andrógenos, progestágenos	Retículo endoplasmático	Hígado, intestino, endometrio, placenta, páncreas, próstata, colon
3	HSD17B3	NADP/NADPH	Estrógenos, andrógenos	Retículo endoplasmático	Testículos, cerebro, sangre, piel, tejido adiposo
4	HSD17B4	NAD/NADH	Estrógenos	Peroxisomas	Hígado, corazón, próstata, testículos, pulmón, músculo esquelético, riñón, páncreas, timo, ovarios, intestino, placenta, cerebro, bazo, colon, linfocitos
5	AKR1C3 (HSD17B5)	NAD(P)/NAD(P)H	Estrógenos, andrógenos, progestágenos	Citosol	Próstata, mama, hígado, riñón, pulmón, corazón, intestino delgado, colon, útero, testículos, cerebro, músculo esquelético, tejido adiposo
6	HSD17B6	NAD(P)/NAD(P)H	Andrógenos	Microsomas	Hígado, testículos, pulmón, bazo, cerebro, ovarios, riñón, suprarrenales, próstata.
7	HSD17B7	NADP/NADPH	Estrógenos, andrógenos, progestágenos	Retículo endoplasmático	Ovarios, útero, placenta, hígado, mama, testículos, cerebro, suprarrenales, intestino delgado, pulmón, timo, próstata, tejido adiposo
8	HSD17B8	NAD/NADH	Estrógenos, andrógenos	Mitocondria	Próstata, placenta, riñón, cerebro, cerebelo, corazón, pulmón, intestino delgado, ovarios, testículos, suprarrenales, estómago
10	HSD17B10	NAD/NADH	Estrógenos, andrógenos, progestágenos	Mitocondria	Hígado, intestino delgado, colon, riñón, corazón, cerebro, placenta, pulmón, ovarios, testículos, bazo, timo, próstata, glóbulos blancos
11	HSD17B11	NAD/NADH	Estrógenos, andrógenos	Retículo endoplasmático, gotas lipídicas	Hígado, páncreas, intestino, riñón, suprarrenales, corazón, pulmón, testículos, ovarios, placenta, glándulas sebáceas
12	HSD17B12	NADP/NADPH	Estrógenos	Retículo endoplasmático	Corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, suprarrenales, testículos, placenta, cerebro, páncreas,

					estómago, intestino, tráquea, pulmón, próstata, aorta, vejiga, bazo, piel, ovario, mama, útero, vagina
13	HSD17B13	desconocido	desconocidos	Retículo endoplasmático, gotas lipídicas	Hígado, médula, pulmón, ovarios, testículos, riñón, músculo esquelético, cerebro, vejiga
14	HSD17B14	NAD/NADH	Estrógenos, andrógenos	Citosol	Cerebro, hígado, placenta, mama

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida; NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida.

Las 17β -HSD catalizan la conversión bidireccional entre las formas activas e inactivas de hormonas esteroideas. Están nombradas de acuerdo a su capacidad para oxidar o reducir las funciones 17-hidroxi o 17-ceto de ciertos esteroides. Esta catálisis es dependiente de los cofactores nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o NAD fosfato (NADP), en sus formas oxidadas y/o reducidas (NAD(P)/NAD(P)H), presentes en el medio, y de la localización celular (Lukacik et al., 2006; Manenda et al., 2016; Moeller & Adamski, 2009).

Con la excepción de 17β -HSD 5, la cual es miembro de la familia de las AKR, todas las 17β -HSD pertenecen a la superfamilia de SDR. En vertebrados la homología de secuencia entre las isoenzimas es baja, entre un 15 - 20%, y como se evidencia en la tabla 1, todas están codificadas por genes diferentes (Moeller & Adamski, 2009; Payne & Hales, 2004).

1.1.6. Aromatasa

La aromatasa (P450_{aro}) es una enzima que pertenece a la familia de los citocromos. Cataliza la conversión de androsterona y testosterona a estrona (E1) y estradiol (E2), respectivamente, mediante reacciones que involucran el uso de oxígeno, NADPH, y la citocromo P450 reductasa. Es codificada por el gen CYP19, el cual presenta exones no codificantes en la posición I, los cuales se expresan de manera específica de tejido. Esto conduce a que la enzima se exprese en cantidades variables en las gónadas, cerebro, tejido adiposo, mama, piel, placenta y hueso. Si bien el primer exón interactúa diferencialmente con los promotores específicos de tejido, esto no afecta la secuencia proteica final, ni su tamaño (Manenda et al., 2016; Payne & Hales, 2004; Simpson, 2004).

1.1.7. 5 alfa reductasa

Las 5 alfa reductasas (5α -R) tienen la capacidad de reducir los 3-oxo (3-ceto), $\Delta^{4,5}$ C 19/C21 esteroides tales como la testosterona, P4, androstenediona, epi-testosterona, cortisol, aldosterona y desoxicorticosterona (Azzouni et al., 2012). La función principal es la conversión de testosterona a DHT, un andrógeno más

potente y con mayor afinidad por el receptor (W. L. Miller & Auchus, 2011). Aún se desconoce el rol fisiológico de la 5 alfa reducción de los otros esteroides que actúan como sustratos, pero probablemente esté asociada a su degradación o excreción (Azzouni et al., 2012).

Existen tres isoenzimas, 5 α -R 1, 2 y 3, codificadas por tres genes diferentes, SRD5A1, SRD5A2 y SRD5A3, respectivamente. También existen otras dos proteínas que presentan la capacidad de 5 alfa reducción: la glicoproteína sináptica 2 (GPSN2) y la glicoproteína sináptica 2-like (GPSN2L), las cuales no participan en la síntesis de esteroides (Azzouni et al., 2012).

Las tres isoenzimas tienen expresión tisular diferencial. La 5 α -R 1 se encuentra principalmente en tejidos periféricos como piel, pulmón, cerebro, intestino, estómago, mientras que la tipo 2 se encuentra principalmente en órganos reproductivos masculinos (W. L. Miller & Auchus, 2011). La 5 α -R 3 es de expresión ubicua, encontrándose aumentada en patologías oncológicas (Azzouni et al., 2012).

1.1.8. 3 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa.

Existen cuatro 3 α -HSD en el humano, todas miembros de la superfamilia de AKR. Presentan una homología de secuencia del 86%, y están codificadas por genes distintos: AKR1C4 (3 α -HSD variante 1), AKR1C3 (3 α -HSD variante 2, también conocida como 17 β -HSD 5), AKR1C2 (3 α -HSD variante 3) y AKR1C1 (3 α -HSD variante 4) (W. L. Miller & Auchus, 2011; Penning et al., 2004).

Las cuatro variantes de la 3 α -HSD se encuentran en hígado, siendo la expresión de la tipo 1 casi específica de este órgano, aunque también se encontró esta variante en suprarrenales y gónadas. En próstata se expresan las variantes 2 y 3, y en la glándula mamaria sólo la variante 2. En cerebro se encontraron las variantes 3 y 4, y en útero la variante 4 (W. L. Miller & Auchus, 2011). Esto sugiere que probablemente la función principal de la 3 α -HSD variante 1 sea la síntesis de ácidos biliares y eliminación de hormonas esteroideas y el resto participe fundamentalmente en la vía esteroidogénica (Penning et al., 2004).

1.2. Regulación de la esteroidogénesis

1.2.1. Regulación aguda de la esteroidogénesis

Las células que producen hormonas peptídicas almacenan las mismas en vesículas de manera tal que estén disponibles para su rápida liberación. Esto no ocurre en las células que producen hormonas esteroideas. Es por ello que una respuesta esteroidogénica rápida requiere de una igualmente rápida síntesis de esteroides *de novo* (Li et al., 2015). La hormona adrenocorticotropa (ACTH), y se cree que también la hormona luteinizante (LH), actúa promoviendo el crecimiento de células esteroideas y manteniendo la maquinaria de síntesis hormonal de tres formas (Fig. 2). 1) Promueve el crecimiento de las suprarrenales a través de la estimulación de los factores IGF2 (del inglés, *Insulin Growth Factor 2*) y EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*). Esto ocurre en semanas o meses. 2) A través de la vía del AMPc, junto con la angiotensina a través de la vía de calcio / calmodulina, promueve la transcripción de genes de enzimas esteroidogénicas y proteínas asociadas. Esto ocurre en días (Bremer & Miller, 2014). 3) Estimula rápidamente la transcripción

de la proteína StAR, y la fosforilación post transcripcional de la misma, para incrementar el flujo de colesterol de la membrana externa de la mitocondria hacia la membrana interna. Si bien existe la esteroidogénesis independiente de StAR, los mecanismos por los cuales ésto ocurre son aún desconocidos (Bremer & Miller, 2014; Li et al., 2015; W. L. Miller & Auchus, 2011).

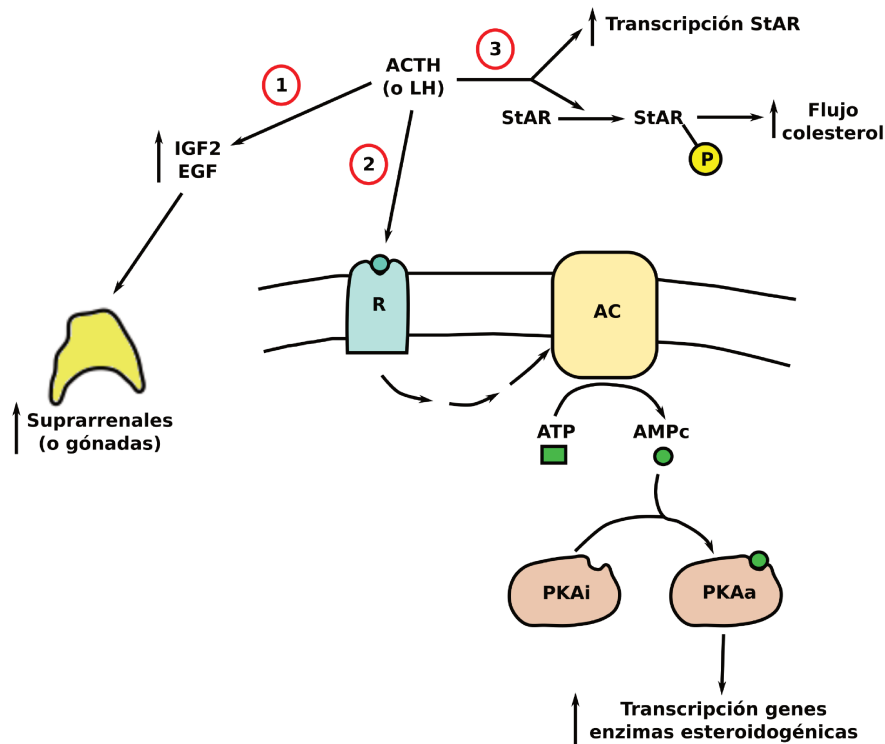


Figura 2. Regulación aguda de la esteroidogénesis. La ACTH (o LH) es quien participa de este proceso, y lo hace de tres formas. 1) Promueve el crecimiento de las suprarrenales (o gónadas para LH) a través de la estimulación del IGF2 y del EGF. 2) A través de la vía del AMPc promueve la transcripción de genes de enzimas esteroidogénicas y proteínas asociadas. 3) Estimula rápidamente la transcripción de la proteína StAR, y la fosforilación post transcripcional de la misma, para incrementar el flujo de colesterol de la membrana externa de la mitocondria hacia la membrana interna. ACTH: hormona adrenocorticotropa; LH: hormona luteinizante; IGF2: insulin growth factor 2; EGF: factor de crecimiento epidérmico; R: receptor; AC: adenilato ciclasa; AMPc: AMP cíclico; PKAi: proteína quinasa A inactiva; PKAa: proteína quinasa A activa; StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; P: fosforilado.

1.2.2. Regulación crónica de la esteroidogénesis

La regulación crónica de la esteroidogénesis está determinada cuantitativamente por la expresión de P450_{scc}, y cualitativamente por la expresión de las enzimas que siguen en la vía, fundamentalmente P450_{c17} (Bremer & Miller, 2014). La producción de AMPc debida a la unión de ACTH y LH a sus respectivos receptores es necesaria pero no suficiente para mantener una expresión continua de enzimas esteroidogénicas y la consecuente producción de esteroides (W. L. Miller & Auchus, 2011). Se ha demostrado la presencia de elementos de respuesta a AMPc en los genes de la mayoría de las enzimas citocromo P450 que participan en la esteroidogénesis. Otros factores de transcripción, como AP2 (del inglés, *Activator Protein*), SP1 (del inglés, *Specificity Protein*), SP3, NF1C (del inglés, *Nuclear Factor 1 C-Type*), NR4A1 (del inglés, *Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1*), NR4A2, GATA4 y GATA6, también participan en la regulación de

la transcripción de diversos genes de enzimas esteroidogénicas, ya sea en condición basal y como estimulada por AMPc (Bremer & Miller, 2014). El factor de transcripción SF1 (del inglés, *Steroidogenic Factor 1*) coordina la expresión de enzimas esteroidogénicas en las suprarrenales y gónadas, pero no en cerebro y placenta (Martinez-Arguelles & Papadopoulos, 2010; W. L. Miller & Auchus, 2011).

1.2.3. Otros mecanismos de regulación

Existen múltiples mecanismos de regulación post traduccional de las enzimas esteroidogénicas. Uno de ellos es la fosforilación / desfosforilación de proteínas y factores de transcripción involucrados en la vía, tales como SF1, DAX1 (del inglés, *Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*), CREB (del inglés, *cAMP Response Element-Binding*) y TORC (del inglés, *Transducer of Regulated CREB*), LSH (lipasa sensible a hormonas), StAR y P450c17 (Bremer & Miller, 2014; Clark et al., 2000; G. D. Hammer et al., 1999; W. L. Miller, 2005; Shen et al., 2015).

Otro mecanismo de regulación post traduccional es a través de las interacciones entre proteínas. Un ejemplo de ello es la interacción entre LSH y StAR, lo cual produciría un aumento de la actividad hidrolítica de LSH y junto con StAR facilitarían el movimiento de gotas lipídicas hacia la mitocondria, necesarias para la esteroidogénesis (Shen et al., 2015).

La regulación génica de proteínas y enzimas de la vía esteroidogénica también puede ocurrir a través de mecanismos epigenéticos (Fig. 3). La epigenética se define como cambios heredables en los patrones de expresión génica que ocurren sin que haya alteraciones en la secuencia primaria de ADN (mutaciones), con lo cual estos cambios son reversibles. Hay tres mecanismos principales de regulación epigenética: metilación del ADN, modificación de histonas, y ARNs no codificantes (ARNnc) (Florean et al., 2011).

La metilación del ADN es la transferencia de un grupo metilo, a través de ADN metiltransferasas (DNMTs), al carbono 5 de una citosina que se encuentra formando parte de un dinucleótido citosina - guanina unido por un enlace fosfodiéster (CpG) (Bird, 1986). Esas regiones enriquecidas en dinucleótidos CG, llamadas islas CpG, tienen un tamaño un poco mayor a 200pb, con un 55% de contenido CG, y están presentes en un 60% de los genes, generalmente cerca de regiones promotoras, y con un promedio de CpG observado/esperado mayor a 0.6 (Missaghian et al., 2009). Normalmente, estas islas no se encuentran metiladas en células diferenciadas, si bien algunas (aproximadamente el 6%) pueden presentar metilación específica de tejido (Florean et al., 2011). Se ha evidenciado que la metilación del ADN conduce a la represión transcripcional. Un mecanismo propuesto es mediante interferencia directa en la unión de factores de transcripción al ADN (Curradi et al., 2002). Un ejemplo de ello es la metilación de los sitios de unión a CREB, AP2, MYC, E2F, NF-κB (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y ETS. Sin embargo, hay otros factores de transcripción que no se ven afectados por la metilación del ADN, como CTCF y REST (Héberlé & Bardet, 2019). Otro mecanismo de inhibición propuesto sugiere que la metilación del ADN atrae proteínas que se unen específicamente a esa zona modificada, bloqueando así el acceso de factores de transcripción a ese sitio. Existen diversas proteínas que son atraídas por zonas metiladas, las cuales contienen dominios de unión al ADN metilados (MBD, del inglés, *Methylated-DNA Binding Domains*), y cuatro han

sido implicadas en la represión de la transcripción (MBD 1 a 4) (Curradi 2002). Genes asociados a la síntesis de esteroides y que se regulan por metilación de ADN son los de la P450aro y del factor de transcripción SF1 (Martínez-Argüelles & Papadopoulos, 2010).

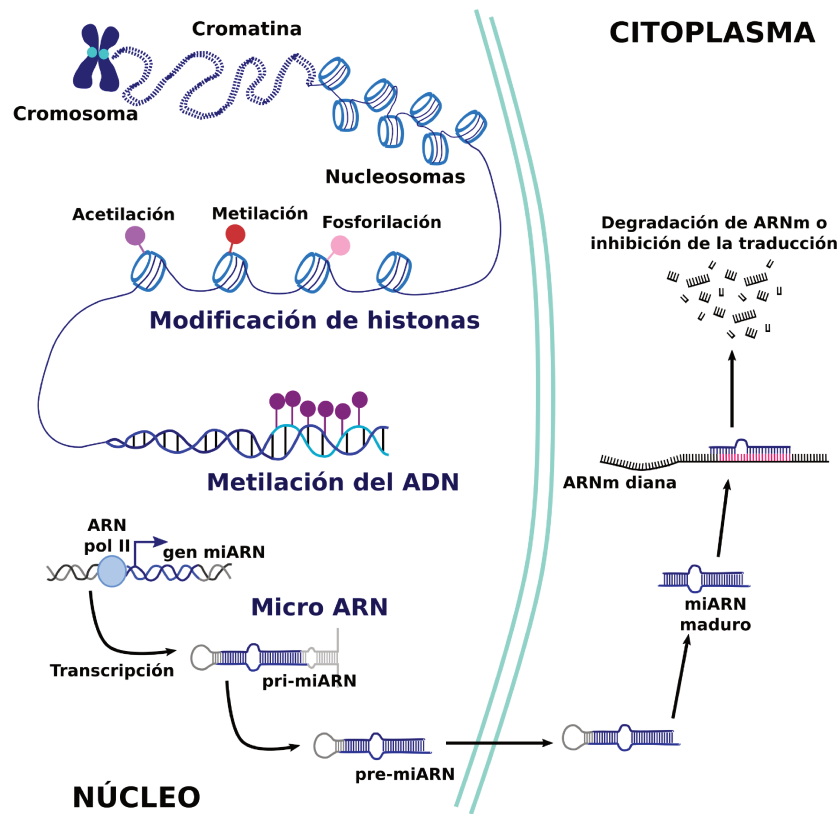


Figura 3. Mecanismos epigenéticos de regulación. La expresión génica puede regularse antes de la transcripción a través de modificaciones en las histonas o metilación del ADN. Ambos mecanismos producen una remodelación de la estructura de cromatina, permitiendo que los genes estén más o menos accesibles para los factores de transcripción. Por otro lado, los miARN regulan la expresión génica a nivel post transcripcional. Esta regulación la hacen mediante la unión a zonas complementarias de ARNm, lo que conlleva a la degradación del mismo o a la represión de la traducción. ARN pol II: ARN polimerasa II; miARN: microARN; pri-miARN: miARN primario; ARNm: ARN mensajero. Figura modificada de Rotondo et al (2021).

Las histonas son capaces de sufrir modificaciones covalentes tales como acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación o ubiquitinación. Se ha visto, por ejemplo, que la unión de factores de transcripción al promotor proximal de StAR induce cambios en la estructura de la cromatina, a través de modificaciones en los estados de metilación y acetilación de histonas, conduciendo a un aumento en la transcripción del gen (Martínez-Argüelles & Papadopoulos, 2010).

El otro mecanismo epigenético de regulación más conocido es la acción de los ARNnc. Los ARNnc más estudiados son los microARN (miARN), los cuales son ARNs endógenos cortos, de unos 22 nucleótidos de longitud, que regulan de manera post transcripcional la expresión de los ARNm a través de la unión a regiones 3'-UTR (del inglés, *Untranslated Regions*) o 5'-UTR parcialmente complementarias. Esto lleva a la degradación del ARNm diana, o a su inhibición traduccional (Florea et al., 2011). Un único miARN puede regular la expresión de cientos de genes diana, y un único gen puede ser regulado por múltiples miARN (Shen et al., 2015). Por ejemplo, se han identificado miARN que regulan la expresión del receptor de

LH/GCh (gonadotropina coriónica humana) y de enzimas esteroidogénicas de forma específica de tejido (Menon et al., 2013).

1.3. Efectos de los esteroides sobre células del sistema inmune

Es conocido el efecto de los esteroides sobre células del sistema inmune, tanto fenotípica como funcionalmente, regulando la inmunidad adaptativa e innata. Los andrógenos y estrógenos regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis de células inmunes, así como también la producción de citoquinas e inmunoglobulinas (Chakraborty et al., 2021; Cutolo et al., 2005; Trigunaite et al., 2015). Si bien los efectos de los esteroides no se pueden generalizar, debido a que la misma hormona puede actuar como inmunosupresor o inmunoestimulante, se han observado diferencias asociadas al sexo. Debido a la acción de los estrógenos las mujeres presentan mayores niveles de inmunoglobulinas y respuestas inmunes humorales y celulares más fuertes que los hombres (Bhatia et al., 2014; Morales-Montor et al., 2011). Por otro lado, los andrógenos tienen propiedades generalmente inmunosupresoras, confiriendo protección en situaciones de autoinmunidad, suprimiendo el potencial inflamatorio de linfocitos periféricos y de la respuesta de anticuerpos a infecciones y vacunación, y promoviendo el desarrollo de células inmunes regulatorias y cáncer (Bupp & Jorgensen, 2018; Furman et al., 2014).

El accionar de los esteroides sobre células del sistema inmune es posible gracias a la presencia de receptores específicos. La testosterona y DHT ejercen su acción celular mediante la unión al receptor de andrógeno (RA), mientras que E1 y E2 lo hacen a través de los receptores de estrógenos (RE) α y β . Sumado a ellos, se ha identificado un receptor de estrógenos no nuclear unido a membrana, el GPR30 (del inglés, *G Protein-Coupled Receptor 30*) (Rubinow, 2018). Tanto los receptores nucleares de esteroides como el GPR30 presentan expresión diferencial en células del sistema inmune, que a su vez también varía de acuerdo al estadio de maduración celular (Becerra-Diaz et al., 2020; Blesson, s. f.; Kovats, 2015; Lai et al., 2012).

El efecto de los esteroides sobre células inmunitarias no se limita sólo a la regulación de su funcionalidad inmunológica, sino que también se ha visto que afecta la actividad metabólica de órganos y tejidos circundantes cuando ejercen su acción sobre células inmunes tisulares. Ejemplo de ello es el hecho de que la pérdida de señalización a través del RE α sólo en células mieloides conlleva a un incremento del tejido adiposo y resistencia insulínica en ratones hembras, y que deficiencias del RA en células hematopoyéticas promueve el aumento de tejido adiposo visceral en ratones machos (Rubinow, 2018).

1.4. Esteroidogénesis en células del sistema inmune

La mayoría de los estudios realizados sobre la interacción sistema inmune - sistema endocrino se han enfocado en el efecto de las hormonas sobre el sistema inmune, o en los efectos de los mediadores de células inmunitarias (citoquinas) sobre órganos endocrinos. Sin embargo, desde hace unos 30 años se viene haciendo énfasis en la capacidad de las células del sistema inmune para sintetizar y metabolizar esteroides. En

macrófagos alveolares, la conversión de androstenediona a otros esteroides demostró la presencia de actividad de enzimas de la vía esteroidogénica, tales como 5α -R, 17β -HSD, 3β -HSD y 3α -HSD. Además, la conversión de testosterona a DHT en macrófagos sinoviales humanos corroboró la presencia de 5α -R en esta célula (Rubinow, 2018). La actividad esteroidogénica también se demostró en macrófagos humanos diferenciados *in vitro* a partir de monocitos, lo que sugiere que esta vía está presente en diversos subtipos de macrófagos. Sin embargo, los esteroides producidos difieren entre las subpoblaciones de macrófagos: los diferenciados *in vitro* generan preferentemente testosterona, androstenediona y androstenediol, mientras que los macrófagos sinoviales producen más estrógenos. Además, la actividad aromatasa ha sido demostrada en macrófagos, y no monocitos, lo que sugiere que la presencia de esa enzima también depende del estadio de diferenciación celular (Schmidt et al., 2000). Los macrófagos también expresan la esteroide sulfatasa, con lo cual pueden convertir las DHEA-sulfato, el andrógeno suprarrenal más abundante en circulación, a DHEA, y posteriormente a androstenediona. Además, esa sulfatasa permite que los macrófagos generen otros esteroides biológicamente activos a partir de sus derivados sulfatados, como E1 y el E2 (Rubinow, 2018).

Se ha reportado actividad esteroidogénica también en linfocitos, aunque con resultados discordantes. En linfocitos circulantes y de cultivo se observó la presencia de transcritos de las enzimas P450scc, P450c17, 17β -HSD 1 y 5α -R 1, actividad enzimática de 17β -HSD 1 y 5α -R 1 y los productos de las mismas por cromatografía gaseosa / espectrometría de masas (GC/MS) (Zhou et al., 1998). También hay evidencia de la presencia de transcritos de otras variantes de 17β -HSD en células mononucleares en sangre periférica (CMSP) de hombres sanos, aunque con resultados discordantes respecto a si existen o no diferencias de acuerdo a la edad (F. Hammer et al., 2005; Hoppe et al., 2006). Lo mismo ocurre para el caso de la P450aro. Si bien al principio no se encontró expresión de su transcritos en linfocitos circulantes y de cultivo (Zhou et al., 1998), estudios recientes demuestran su expresión en CMSP, aunque difieren en si hay o no diferencias relacionadas al sexo (Pignatti et al., 2012; Vottero et al., 2006), y en si la expresión de la enzima es constitutiva o requiere de activación previa (Berstein et al., 2002). Aún no hay evidencia clara de si existe o no síntesis de novo de esteroides a partir de colesterol en CMSP humanas, ya que no está demostrada la actividad de P450scc en estas células.

1.5. Regulación de enzimas esteroidogénicas en células del sistema inmune

Aún se desconocen por completo las señales que regulan la síntesis de esteroides en las células del sistema inmune. La actividad aromatasa en macrófagos humanos es inducida principalmente por glucocorticoides, factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleuquina (IL) 1 e IL 6, mientras que la vitamina D la suprime. La actividad esteroide sulfatasa de macrófagos es inhibida por lipopolisacárido (LPS), interferón gamma ($IFN\gamma$) y $TNF\alpha$ (Rubinow, 2018). En cultivos mixtos de células sinoviales, el tratamiento con testosterona favoreció la formación de DHT e inhibió la actividad aromatasa (Schmidt et al., 2005). Por otro lado, la DHEA inhibe y promueve la actividad aromatasa en diferentes tipos de macrófagos (Schmidt et al., 2000).

1.6. Esteroidogénesis en células del sistema inmune y su asociación con distintas patologías

La producción local de estrógenos por parte de las células del sistema inmune ha sido implicada en la patogénesis del cáncer de mama y en artritis reumatoidea.

La severidad del cáncer de mama se correlaciona con el nivel de expresión de aromatasa en macrófagos asociados al tumor, y el efecto proliferativo de macrófagos locales sobre células tumorales se suprime cuando se tratan esos macrófagos con un inhibidor de aromatasa (Mor et al., 1998). Como se mencionó previamente, se requiere la diferenciación a macrófagos maduros para que se active la producción de estrógenos, y éstos podrían ser una fuente intra tumoral de producción de estrógenos, generandose así un modelo intracrino / paracrino de esteroidogénesis en cáncer de mama (Fig. 4), además del endocrino ya conocido (Rubinow, 2018). A su vez, también se ha reportado la expresión de aromatasa en linfocitos que infiltran tumores de mama (Gu et al., 2022).

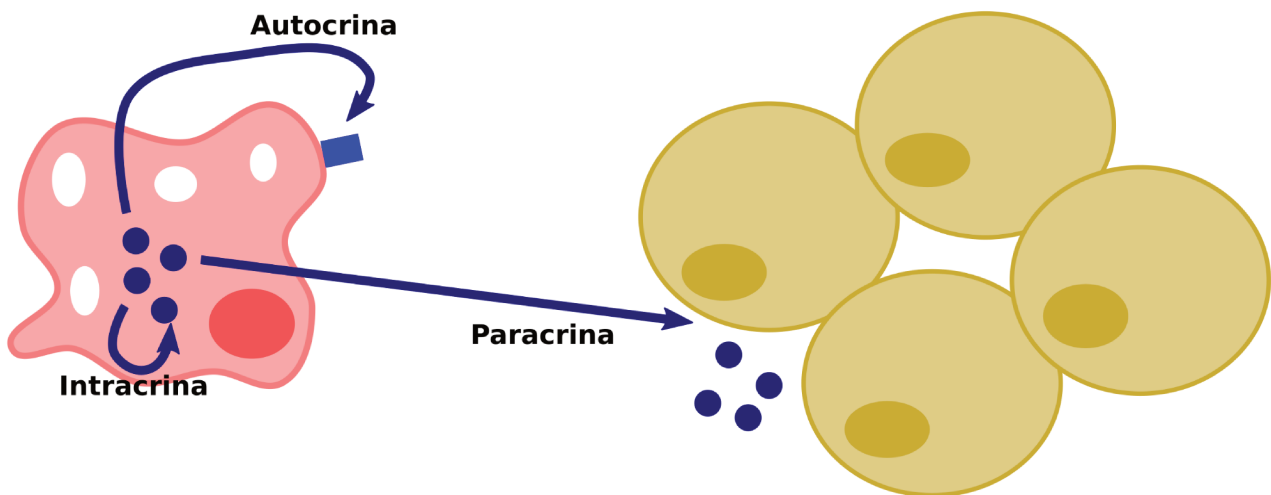


Figura 4. Modelo intracrino y paracrino de esteroidogénesis en células del sistema inmune. Los esteroides podrían permanecer en la célula de origen y actuar como ligandos de receptores nucleares (intracrino), o salir de la célula y generar las señales a través de la unión a receptores de membrana de la misma célula (autocrino). Por otro lado, los esteroides liberados podrían actuar sobre células vecinas en tejidos y órganos (paracrino). Figura modificada de Rubinow (2018).

Hace ya varios años que se cree que el rol inmunomodulador de los estrógenos contribuye al mayor riesgo que presentan las mujeres a desarrollar una patología autoinmune. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en las concentraciones de estrógenos circulantes entre mujeres sanas y con artritis reumatoidea, pero sí mayor concentración de estrógenos conjugados en la sinovia de estas pacientes, lo que sugiere que la producción local de estrógenos, y no la circulante, es un factor determinante de riesgo de patología. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la concentración de esteroides sinoviales entre hombres y mujeres con artritis reumatoidea, lo que sugiere que el riesgo elevado en mujeres de padecer esta patología no está dado por la síntesis de esteroides por parte de células inmunes sinoviales (Rubinow, 2018).

Se ha evidenciado que las células Th2, mastocitos y basófilos pueden sintetizar pregnenolona *de novo* durante infecciones parasitarias para regular la homeostasis inmune, y en ciertos tumores para contribuir en

su eliminación. También se ha observado un incremento en la expresión de P450scc en células T CD4+ o CD8+ en enfermedades alérgicas. Esto sugiere la importancia de la síntesis de esteroides por parte de células del sistema inmune en microambientes sanos o patológicos (Gu et al., 2022).

Aún queda mucho por investigar respecto a la asociación entre esteroidogénesis en células del sistema inmune y el desarrollo o progresión de otras patologías, como infecciones, tumores sólidos, leucemias o enfermedades metabólicas.

2. Leucemia Linfocítica Crónica

2.1. Epidemiología

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es la leucemia más común en nuestra sociedad, afectando principalmente a varones mayores (relación hombre:mujeres 1,9:1), con una edad media de diagnóstico de 70 años, aunque a veces puede iniciar en edades más tempranas (30 - 40 años). Se caracteriza por la proliferación y acumulación clonal de células B maduras CD5 positivas en sangre, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo (Hallek & Al-Sawaf, 2021). La incidencia de la patología es mayor cuando hay antecedentes familiares de LLC, o en individuos caucásicos (Rai & Jain, 2016).

2.2. Sintomatología

Los individuos con LLC presentan síntomas clínicos variados. La mayoría son asintomáticos y el diagnóstico de la enfermedad es fortuito, debido a la presencia de linfocitosis en un análisis de rutina, acompañado de anemia y/o trombocitopenia. En algunos casos los individuos presentan linfadenopatías palpables y/o hepatoesplenomegalia. Si bien los pacientes con LLC pueden presentar afectaciones en piel y sistema nervioso central, estas son infrecuentes. Un número bajo de pacientes presentan síntomas inespecíficos como fiebre persistente, sudoración nocturna y pérdida de peso, mientras que el cansancio es un síntoma común. En muchos casos, el hallazgo de LLC ocurre como consecuencia de signos y síntomas secundarios a las complicaciones (Strati et al., 2018).

2.3. Diagnóstico

El diagnóstico de LLC requiere la presencia de más de 5.000 linfocitos B/ μ L en sangre periférica por un período de al menos tres meses, junto con la evaluación, por citometría de flujo, de la co expresión de CD5 con CD19 y CD23, restricción kappa o lambda, y baja expresión de CD20 e inmunoglobulinas de superficie (Nabhan & Rosen, 2014). Sin embargo, si bien son raros, se ha encontrado un subgrupo de individuos con LLC que son CD5 negativos (Demir et al., 2017).

La clasificación de neoplasias hematopoyéticas por parte de la Organización Mundial de la Salud describe a la LLC como un linfoma linfocítico leucémico, que se puede distinguir del linfoma linfocítico pequeño (LLP) sólo por su apariencia leucémica. La LLC siempre es una neoplasia a células B, mientras que la patología que antes se conocía como LLC de células T (T-LLC) ahora se llama leucemia prolinfocítica T (T-LPL) (Hallek & Al-Sawaf, 2021).

2.4. Pronóstico

Las primeras herramientas utilizadas para clasificar a los pacientes con LLC y establecer su pronóstico son los sistemas de Rai y Binet de estratificación que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Estadificación de la LLC según los sistemas Rai y Binet. Modificada de Nabhan & Rosen (2014).

Estadío	Riesgo	Características clínicas
Rai		
0	Bajo	Linfocitosis sólo en sangre periférica y médula ósea
I / II	Intermedio	Linfadenopatía ± hepatoesplenomegalia
III / IV	Alto	Anemia ± trombocitopenia
Binet		
A	Bajo	< 3 áreas de linfadenopatía*
B	Intermedio	> 3 áreas de linfadenopatía
C	Alto	Anemia, trombocitopenia, o ambas

* Áreas: cervical, axilar, inguinal (un lado o ambos), bazo e hígado.

Sin embargo, debido a los progresos en el tratamiento de la enfermedad, actualmente los dos sistemas son insuficientes para establecer el pronóstico de la patología en un determinado individuo. A esto se le suma la amplia gama de nuevos marcadores que proveen información pronóstica independientemente del estadio clínico. Estos nuevos marcadores pueden ser proteínas de superficie o séricas y alteraciones cromosómicas o genéticas.

Las proteínas Zap-70 (del inglés, *Zeta-chain-associated Protein 70*) y CD38 están involucradas en la señalización del receptor de células B (BCR), mientras que la CD49d es una integrina de superficie. El aumento de expresión de esas moléculas está asociado a una menor sobrevida. Lo mismo ocurre cuando se encuentran niveles séricos aumentados de $\beta 2$ microglobulina y timidin quinasa (Strati et al., 2018). Las

mutaciones somáticas de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas afectan la afinidad del BCR hacia diversos antígenos. El estado mutacional se determina comparando la secuencia de las células de LLC con la secuencia de la línea germinal. Se considera que una célula LLC está mutada cuando tiene menos de un 98% de homología con la secuencia germinal. Teniendo en cuenta el estado mutacional, se diferencian los pacientes en mutados (mLLC) o no mutados (uLLC, del inglés, *Unmutated*). Los pacientes uLLC presentan una enfermedad más agresiva y de peor pronóstico (Rai & Jain, 2016).

Los defectos en las transmisiones de señales a partir de los receptores celulares en pacientes con LLC pueden acarrear alteraciones en moléculas de señalización, como las citoquinas. La expresión de ARNm de IL 6, IL 10, c-Jun y STAT3 están disminuidas en células B de pacientes con LLC (Antosz et al., 2015), al igual que la expresión intracelular de IL 4 (Işıktaşan et al., 2016). Si bien se han observado niveles séricos elevados de IL 10, 6 y 4 (Fayad et al., 2001; Işıktaşan et al., 2016; Lech-Maranda et al., 2012), asociados a un peor pronóstico de la enfermedad, esto podría deberse a la secreción de las mismas por parte de otras líneas celulares, y que podrían contribuir al microambiente tumoral. Un ejemplo de ello es el aumento en individuos con LLC de linfocitos T CD4 secretores de IL 4 e IL 10, y una disminución de T CD4 secretores de IFN γ (Işıktaşan et al., 2016; Monserrat et al., 2014).

Aproximadamente el 80% de los pacientes con LLC presenta por lo menos una de las siguientes cuatro alteraciones cromosomales: deleción (del) en el cromosoma 13 (del13q14.3), deleciones en el brazo largo del cromosoma 11 [del(11q)], deleciones en el brazo corto del cromosoma 17 [del(17q)], o trisomía 12. En individuos con del(17p) y/o del(11q), la patología es más agresiva que en aquellos que presentan la del(13q), trisomía 12, o ninguna alteración por FISH. Esto se debe a que las del(17p) casi siempre incluyen la banda donde se encuentra el gen supresor tumoral TP53, mientras que las del(11q) frecuentemente incluyen la banda que posee el gen ATM, que codifica para una quinasa reparadora de daños al ADN. Además de estas alteraciones cromosomales, se han encontrado mutaciones en otros genes, involucrados en la señalización del BCR, regulación del ciclo celular, apoptosis, remodelamiento de la cromatina, metabolismo del ARN, señalización a través de NF- κ B, NOTCH, señalización de daño del ADN y reparación del ADN (Fig. 5) (Delgado et al., 2016; Hallek & Al-Sawaf, 2021).

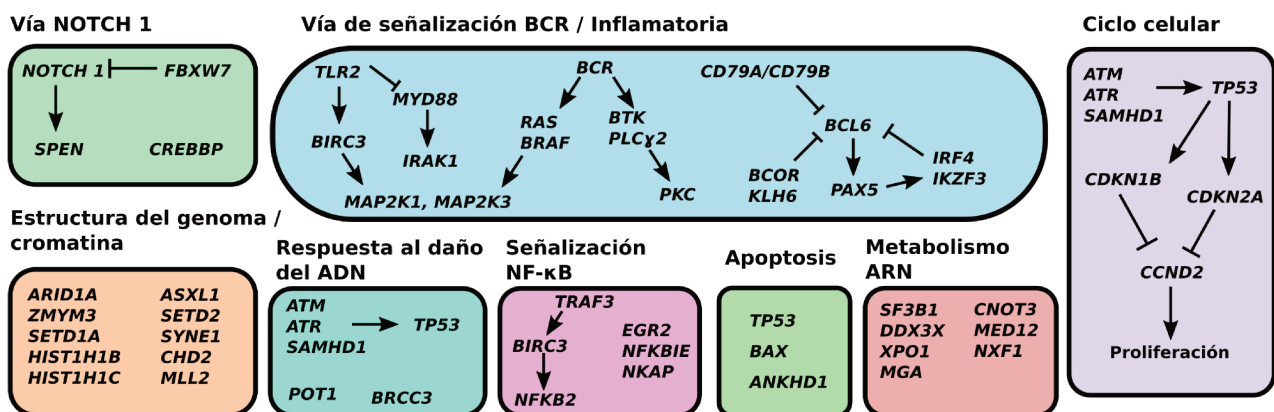


Figura 5. Vías de señalización comúnmente afectadas por mutaciones en pacientes con LLC. LLC: Leucemia linfocítica crónica. Figura modificada de Delgado et al (2016).

Para reducir la información disponible a aquella clínicamente más relevante, actualmente se emplea el Índice Internacional de Pronóstico de LLC (CLL-IPI), el cual utiliza una clasificación ponderada de cinco factores pronósticos independientes: delección y/o mutación de TP53, estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas, β 2 microglobulina sérica, estadio clínico y edad (Hallek & Al-Sawaf, 2021).

2.5. Tratamiento

El tratamiento de la patología se reserva para pacientes que presentan la enfermedad sintomática, o en quienes esté comprometida la función de la médula ósea. Esto es debido a que en ensayos clínicos no se encontró ningún beneficio para el tratamiento precoz en pacientes asintomáticos, y a que la patología presenta una relativamente larga y heterogénea historia natural (Wiestner, 2015). Los distintos tratamientos incluyen (Hallek & Al-Sawaf, 2021):

- agentes citostáticos;
- anticuerpos monoclonales (anti CD20, anti CD52, anti PD1);
- agentes cuya diana es la vía de señalización en células LLC y su microambiente [inhibidores de la fosfatidilinositol quinasa 3 (PIK3), inhibidores de la Bruton tirosin quinasa (BTK)];
- inhibidores de BCL-2 (del inglés, *B-Cell Lymphoma*);
- Terapia CART (del inglés, *Chimeric Antigen Receptor T-cell*);
- combinaciones de las anteriores.

2.6. Alteraciones epigenéticas en LLC

En las últimas tres décadas, ha emergido nueva evidencia sobre cómo las alteraciones epigenéticas cumplen un rol clave en la oncogénesis. En leucemias, el estudio de las modificaciones epigenéticas tiene como objetivo la búsqueda de biomarcadores para la detección temprana de la enfermedad, diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento (Florea et al., 2011). Debido a la característica reversible de dichas alteraciones, los cambios epigenéticos son de gran interés como potenciales dianas para tratamiento (Mansouri et al., 2018). En los últimos años, han avanzado los estudios sobre el metiloma de la LLC (Fig. 6). Se descubrió que el ADN de individuos con esta patología está generalmente hipometilado, fundamentalmente en regiones involucradas con procesos de señalización de la célula B, coestimulación de células T, interacciones citoquina - receptor, crecimiento y desarrollo celular, inhibición de apoptosis, y estimulación de la proliferación celular, todas características claves en la patogénesis de LLC (Kulis et al., 2012; Kushwaha et al., 2016). La hipometilación también ocasiona la desrepresión de protooncogenes. Un ejemplo de ello es la activación del oncogén TCL-1 (del inglés, *T-cell leukemia / lymphoma 1*), y la sobreexpresión de Bcl-2 que se observa en pacientes con LLC (Florea et al., 2011).

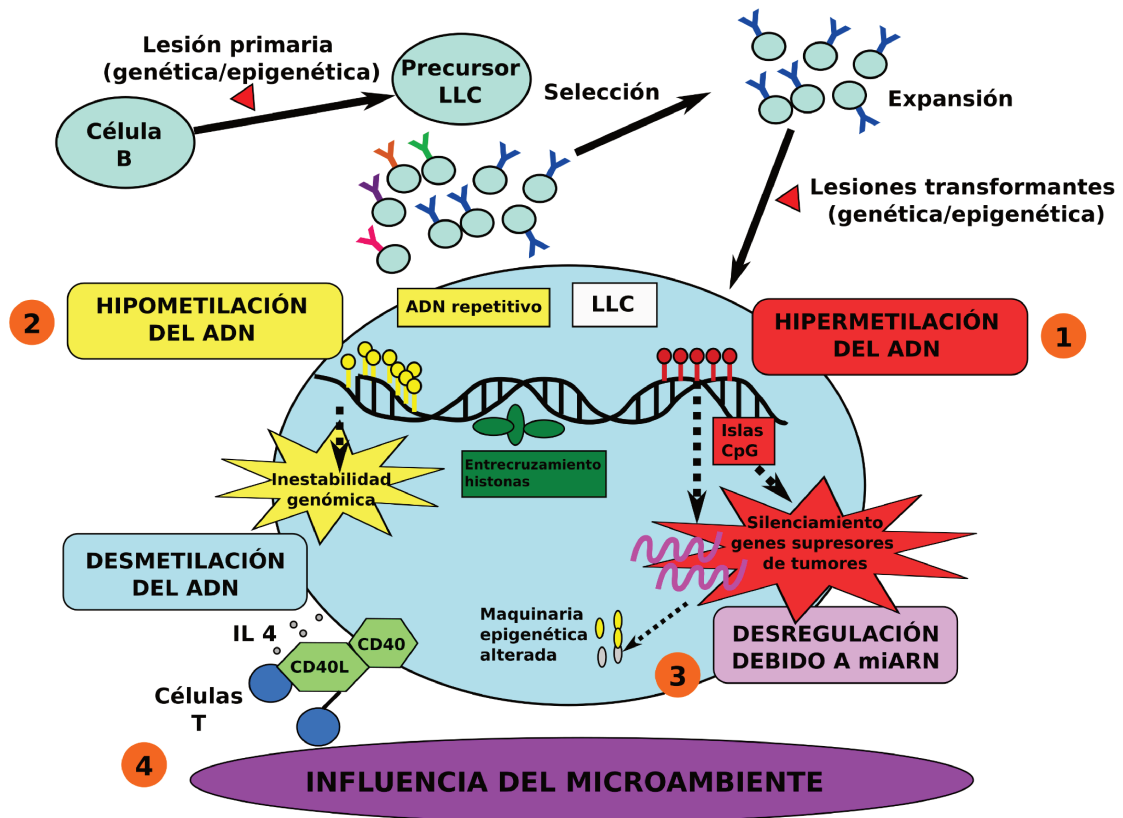


Figura 6. Factores epigenéticos que dan forma al metiloma en LLC. Este esquema detalla los momentos en que puede ocurrir la metilación del ADN en LLC, así como también el rol que juega en la patogénesis de la misma. 1) Silenciamiento de genes supresores de tumores a través de hipermetilación del ADN; 2) Hipometilación del ADN, lo que conduce a inestabilidad genómica; 3) Desregulación de reguladores epigenéticos debido a estados de metilación aberrante; 4) Interconexión entre la metilación del ADN y otros factores epigenéticos y microambientales. Figura modificada de Cahill & Rosenquist (2013).

También se evidenció que ciertos genes estaban hipermetilados. El factor de transcripción TWIST-2 (del inglés, *Twist-related protein 2*), conocido silenciador de p53, se encuentra hipermetilado en LLC, y esta hipermetilación es más frecuente en pacientes con mutaciones en los genes de inmunoglobulinas, de pronóstico más favorable (Cahill & Rosenquist, 2013). Como se mencionó previamente, un aumento de Zap-70 implica una menor supervivencia en LLC. La metilación de una isla CpG en el intrón 1 de Zap-70 está asociada a una pérdida de expresión génica y pronóstico clínico más favorable (Mansouri et al., 2018). Por otro lado, el silenciamiento del gen HOXA 4 debido a la hipermetilación de su promotor está asociado a un peor pronóstico en individuos con cadenas de inmunoglobulinas no mutadas (Florea et al., 2011). Estudios extensivos de múltiples genes hipo e hipermetilados en LLC demuestran que pacientes con un estado de metilación altamente heterogéneo son generalmente clasificados como uLLC, de peor pronóstico, y aquellos con un estado de metilación heterogéneo bajo permanecen clínicamente estables y se clasifican como mLLC (Delgado et al., 2016). Además, estudios basados en la metilación del ADN de pacientes con LLC distinguen un nuevo subgrupo en la clasificación, cuyas características estarían entre los dos grupos ya establecidos de acuerdo al estado mutacional de las cadenas de inmunoglobulinas (uLLC y mLLC) (Kulis et al., 2012).

2.7. Posible rol de los esteroides en LLC

En general, la LLC en mujeres presenta una clínica más benigna y una mejor respuesta a los tratamientos que en hombres, con lo cual se sugiere que el sexo es un predictor independiente de supervivencia (Catovsky et al., 2014). Es debido a esto que se ha estudiado el posible rol de los esteroides en LLC, ya sea en la aparición o en la progresión de la patología. Se ha demostrado que la supresión de la función linfocitaria en hombres con LLC temprana estaba asociada con un cociente E2/testosterona elevado cuando se lo compara con controles, mientras que esto no se observó en mujeres con LLC comparadas con sus respectivos controles (Everaus, 1992). Otra evidencia que refuerza el posible rol de los estrógenos en esta patología es el hecho de que el uso de inhibidores de aromataza disminuye el recuento de linfocitos en pacientes con LLC (Paydas, 2009). Recientemente, se ha observado que niveles elevados de testosterona, DHT y metabolitos activos de E2 en suero se asociaron con una mayor supervivencia de mujeres con LLC (Allain et al., 2018). Estos resultados contradictorios podrían deberse a que se evalúan diferentes estadios de la enfermedad, y a que se miden diferentes esteroides, con distintas metodologías.

Al igual que en individuos sanos, se ha evidenciado la presencia de RE en CMSP de pacientes con LLC, mientras que no hay información respecto a la presencia del RA. Si bien se desconoce el rol del RE en esta patología, se ha observado que el RE β , fundamentalmente la variante 2 de empalme alternativo, es la variante de mayor expresión en linfocitos de pacientes con LLC, mientras que el RE α no es detectable (Yakimchuk 2013). Estudios recientes demuestran que la baja o nula expresión de RE α en patologías asociadas a células B (linfomas, leucemias) se debe, en parte, a la hipermetilación del ADN (Ladikou & Kassi, 2017).

También se han observado diferencias en el estado de metilación del ADN en pacientes con LLC de acuerdo al sexo, lo que podrían contribuir a las distintas formas de presentación de la patología en hombres y mujeres (Lin et al., 2019).

Si bien por largo tiempo que se ha considerado que la única función de las células del sistema inmune era la defensa del organismo, en las últimas décadas se ha evidenciado que pueden producir y liberar compuestos no tradicionales, y que ello afectaría al microambiente que las rodea, especialmente cuando se encuentran en órganos o tejidos, más aún en situaciones patológicas. Actualmente, diversos trabajos en animales confirman la producción y secreción de catecolaminas por parte de células del sistema inmune, quienes ejercerían su acción sobre células vecinas en diversas situaciones patológicas (Nguyen et al., 2011; Yang et al., 2021). Además, existe creciente evidencia de la expresión en células inmunitarias humanas de múltiples enzimas involucradas en la vía de síntesis de esteroides, permitiendo así que estas células produzcan y liberen hormonas que afectan a las células vecinas de forma paracrina (Rubinow, 2018).

Como se describe a lo largo de estos antecedentes, si bien la LLC no es considerada una patología asociada al sexo, son evidentes las diferencias que presenta esta enfermedad entre hombres y mujeres. Actualmente,

no existe evidencia concreta de que esas discrepancias entre ambos sexos sea debida a los niveles hormonales séricos observados en los pacientes con la patología. Teniendo en cuenta esto, junto con el hecho de que la esteroidogénesis leucocitaria es un factor importante asociado a otras patologías, resulta interesante investigar si existen alteraciones en la vía de síntesis de esteroides dentro de las células mononucleares en pacientes con LLC, y si ellas pueden estar asociadas a las fallas inmunológicas observadas en esta enfermedad.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar la vía de la esteroidogénesis en células mononucleares de individuos normales y pacientes con LLC, relacionarla con la expresión de interleuquinas, y evaluar la regulación de la vía por mecanismos epigenéticos o mediante el uso de promotores alternativos.

2. Objetivos específicos

- 2.1.
 - a) Caracterizar la expresión de genes que codifican enzimas esteroidogénicas a nivel de ARN en células mononucleares periféricas de individuos normales. Se estudiarán individuos sanos distinguiendo por sexo (hombre-mujer), edad (división por rangos etarios) y etapas del ciclo ovárico (folicular-luteínica).
 - b) Analizar la expresión a nivel proteína de las enzimas aromatasa y 5α -reductasa, y diseñar un anticuerpo para la determinación de 17β -HSD 5.
- 2.2.
 - a) Determinar la expresión de interleuquinas circulantes proinflamatorias (IL-2 e IL-6) y antiinflamatoria (IL-10) en los mismos individuos descritos en el objetivo 2.1.
 - b) Correlacionar los valores obtenidos para las IL con el mapa enzimático esteroidogénico.
- 2.3. En pacientes con LLC:
 - a) Determinar la expresión de enzimas esteroidogénicas a nivel de ARN en células mononucleares circulantes y compararla con su contrapartida de personas sanas.
 - b) Analizar la expresión a nivel proteína de las enzimas aromatasa y 5α -reductasa en células mononucleares.
 - c) Determinar en estos pacientes la expresión de IL circulantes pro y anti inflamatorias (IL 2, IL 4, IL 6 e IL-10) y correlacionarlas con el mapa esteroidogénico.
- 2.4. Evaluar la expresión en cultivo del ARN mensajero de 5α -reductasa, mediante el agregado de estimulantes y/o inhibidores de la misma, tanto en individuos sanos como con LLC.
- 2.5. Evaluar expresión diferencial de isoformas de 5α -reductasa a nivel de ARN mensajero.
- 2.6. Estudiar posibles mecanismos de regulación epigenéticos asociados a modificación de la expresión de las enzimas esteroidogénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y muestras

Las muestras fueron obtenidas en la Clínica Hemocentro (Santa Fe), con ayuda del personal de laboratorio (Laboratorio Blut). El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), y previo al inicio del estudio se obtuvo el consentimiento informado de los participantes. Se excluyeron individuos que habían sido vacunados o presentado alguna infección o inflamación en la semana previa a la toma de muestra. Se extrajeron 10 mL de sangre venosa en tubos con EDTA para posterior separación de células, y 5 mL en tubos sin anticoagulantes para la obtención de suero. Los sujetos de estudio se subdividieron de la siguiente manera:

a) Individuos sanos

Se analizaron muestras de individuos sin ninguna patología hematológica, de 20 a 90 años de edad. Se estudiaron 54 mujeres (M) y 40 varones (V), divididos en Adultos Jóvenes (AJ, 20 – 39 años, M=29, V=13), Adultos (A, 40 – 59 años, M=13, V=13) y Adultos Mayores (AM, >60 años, M=12, V=14). Las mujeres a su vez fueron subdivididas de la siguiente manera: quienes tomaban Anticonceptivos orales (Aco, n=12), y aquellas que no lo hacían, que a su vez se clasificaron de acuerdo a la fase del ciclo ovárico en la que se encontraban: folicular (Fo, n=11), lútea (Lu, n=14) y menopausia (Mn, n=17).

b) Individuos con LLC

Para el análisis de pacientes con leucemia, se estudiaron muestras de 16 varones (V-LLC) y 8 mujeres (M-LLC), de entre 40 y 90 años. El requisito de inclusión fue que los mismos ya hubieran sido diagnosticados con la patología por parte del grupo médico de la Clínica Hemocentro. Ninguno de ellos se encontraba bajo tratamiento al momento de la toma de muestra, y se excluyó a los pacientes con diagnóstico dudoso de LLC. Se tuvo acceso a sus historias clínicas, y en base a los datos de las mismas, se agruparon los pacientes en mLLC y uLLC de acuerdo al estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas, y se evaluó si existían diferencias entre ambos. Luego, se realizó el análisis comparativo entre los pacientes con la patología y grupos controles. Estos últimos consistieron en 27 varones sanos (VS) y 12 mujeres sanas (MS), los cuales se reagruparon de los analizados en el inciso “a”, de manera tal que la edad de los mismos fueran acordes a los grupos de pacientes con LLC. Fueron incluidos como controles aquellos individuos que no presentaran diagnóstico de LLC al momento del estudio, y la mayoría se encontraba bajo tratamiento para patologías crónicas como hipertensión, diabetes e hipotiroidismo, al igual que los pacientes con LLC incluidos en este estudio.

2. Determinación de los niveles séricos de testosterona, estradiol y progesterona

Los niveles séricos de las hormonas mencionadas fueron determinados en los grupos VS, MS, V-LLC y M-LLC por quimioluminiscencia utilizando los kits Advia Centaur XPT TSTII, eE2 y PRGE (Siemens, Laboratorios Manlab, Buenos Aires, Argentina).

Los ensayos ADVIA Centaur TSTII y PGRE son inmunoensayos competitivos que utilizan tecnología de quimioluminiscencia directa. En TSTII, la testosterona presente en la muestra compete con el hapteno marcado con éster de acridinio del reactivo, para ligarse con el anticuerpo monoclonal anti testosterona de oveja en el Agente de liberación y las partículas de látex magnéticas con estreptavidina en el reactivo de fase sólida. Este ensayo emplea el Agente de liberación para liberar la testosterona ligada de las proteínas de fijación endógenas de la muestra. En PRGE, la P4 de la muestra del paciente se une a un anticuerpo murino monoclonal contra la P4, marcado con éster de acridinio. El anticuerpo sin unir se une a un derivado de P4, que está unido de forma covalente a partículas paramagnéticas de la fase sólida. En ambos ensayos, existe una relación inversa entre la cantidad de analito presente en la muestra del paciente y la cantidad de unidades relativas de luz detectadas por el sistema.

El ensayo ADVIA eE2 también utiliza un formato de ensayo competitivo. El E2 endógeno contenido en una muestra se libera de sus proteínas de unión por medio de un agente de liberación. A continuación, se añade un anticuerpo monoclonal anti E2, marcado con éster de acridinio, para unirse al E2 disponible. Por último, se añade una fase sólida de captura de derivado de E2 a la reacción, de concentración conocida y constante, para competir con el E2 por la unión del anticuerpo marcado con éster de acridinio. Después del lavado se dispensan ácido y base para iniciar la reacción quimioluminiscente.

El límite de detección y coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 7 ng/dL, 4,3% y 6,6% para testosterona, 11,8 pg/mL, 6,9% y 2,2% para E2, y 0,21 ng/mL, 12,4% y 2,6% para P4, respectivamente.

3. Obtención de CMSP y placenta humana

Se separaron las CMSP mediante centrifugación en gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Sweden). La sangre con EDTA se diluyó al medio con solución fisiológica (SF) estéril, se colocó sobre el medio de separación, y se centrifugó a bajas revoluciones (1800 rpm) por 30 minutos. Por cada individuo se separaron 4 alícuotas de CMSP en tubos de centrifuga estériles, una para extracción de ARN (fig. 7A), otra para extracción de ADN (Fig. 7B), una para inmunocitoquímica (ICQ) (Fig. 7C), y la última para cultivos (Fig. 7D).

Para extracción de ARN (Fig. 7A), las células se lavaron 3 veces con SF estéril, luego homogeneizadas en TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y conservadas a -80°C. Para ICQ (Fig. 7C) y extracción de ADN (Fig. 7B), las células se lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) estéril, y luego, para posterior extracción de ADN, las células se homogeneizaron en buffer TRIS – EDTA – NaCl (TEN, 0.01M Tris-HCl, pH 8.0, 0.01M EDTA, pH 8.0, 0.05M NaCl), y se conservaron a -20°C, por no más de 2 días. Para ICQ, se

preparó una suspensión de 1×10^6 células/mL con PBS estéril, y se colocaron 5 gotas de 10 uL en portaobjetos silanizados, dejando secar durante la noche. Posteriormente, las muestras se fijaron con formol – buffer al 4%, durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y luego se lavaron 3 veces con PBS. Los portaobjetos fijados se conservaron en heladera (2 - 8°C). Para cultivo celular (Fig. 7D), las células se lavaron 2 veces con SF estéril y luego 1 vez con medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Se llevó a una concentración de 5×10^7 células/ml, se centrifugó para eliminar el RPMI, y se agregó solución congelante fría [dimetilsulfóxido (DMSO) 5% más suero fetal bovino]. Se criopreservaron 2 tubos por muestra en nitrógeno líquido, a una concentración de entre 1 - 5×10^7 cél/mL, volumen final de 1 ml por tubo.

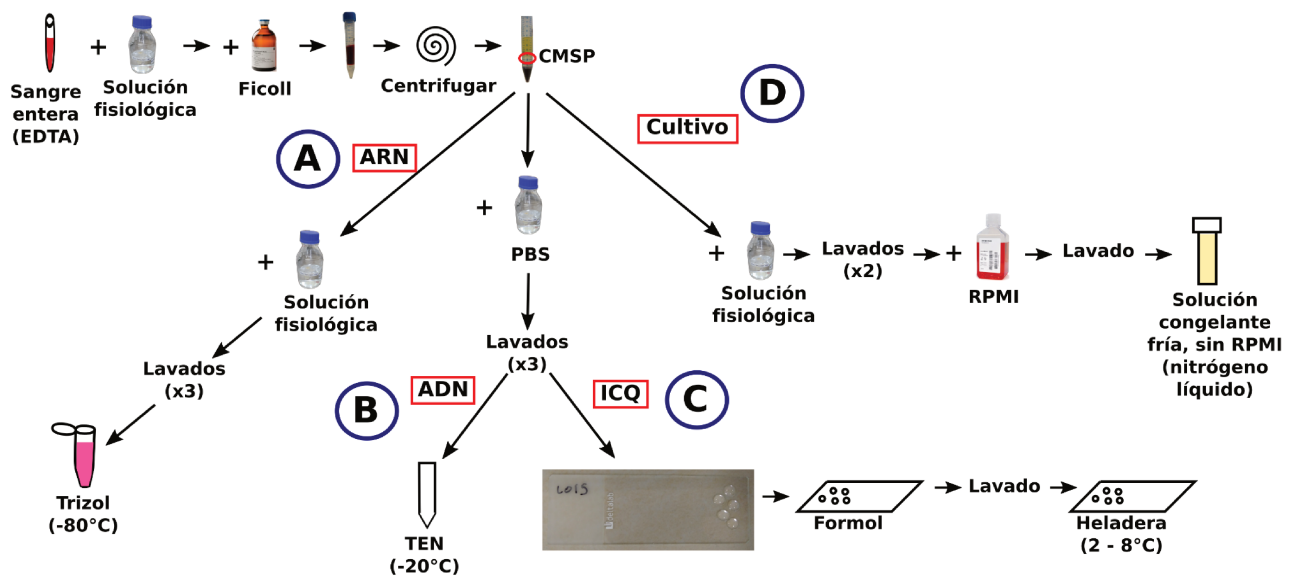


Figura 7. Esquema general del proceso de obtención de CMSP y su separación para estudios posteriores. Brevemente, a partir de una muestra de sangre entera, se separaron las CMSP y se dividieron en 4 alícuotas: **A)** una para posterior extracción de ARN, la cual se conservó en trizol a -80°C , **B)** una para extracción de ADN, la cual se colocó en buffer TEN a -20°C , **C)** una para preparar las improntas para ICQ, los cuales se conservaron en heladera, y **D)** la última para realizar estudios de cultivo, la cual se conservó en nitrógeno líquido. CMSP: células mononucleares de sangre periférica; PBS: buffer fosfato salino; TEN: buffer TRIS – EDTA – NaCl; ICQ: inmunocitoquímica; RPMI: medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*.

Para los controles positivos de expresión de ARNm de las enzimas, se utilizó placenta humana. La misma se encontraba fraccionada a -80°C . Al momento del uso, se descongeló, un vial y se homogeneizó con trizol utilizando un vástago tipo 8G. Posteriormente, se procedió con la extracción del ARN del mismo modo que para las muestras de CMSP.

4. Análisis de ARN mensajero

4.1. Extracción de ARN y transcripción reversa

Las células en Trizol se procesaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de ARN fue medida en espectrofotómetro (Nanodrop) utilizando el cociente A260 / A280, considerándose apta una muestra cuyo cociente fuera mayor a 1,9. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su utilización. Se retro transcribieron 3 μg de ARN a ADN copia (ADNc), utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (300 U; Promega Corporation, Madison, WI, USA) usando 200 pmoles de hexanucleótidos al azar (Promega). Por cada tubo de reacción se agregaron 20 unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNAout; Invitrogen) y 100 nmoles de una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), en un volumen final de 30 μl de buffer de transcriptasa reversa 1 X. La transcripción reversa se llevó a cabo de la siguiente manera: 90 min a 37°C , 15 min a 42°C , 5 min a 80°C , 1 min a 94°C . El ADNc obtenido se llevó a un volumen final de 60 μl con agua libre de ribonucleasas, y se conservó a -20°C para su posterior análisis (Fig. 8A).

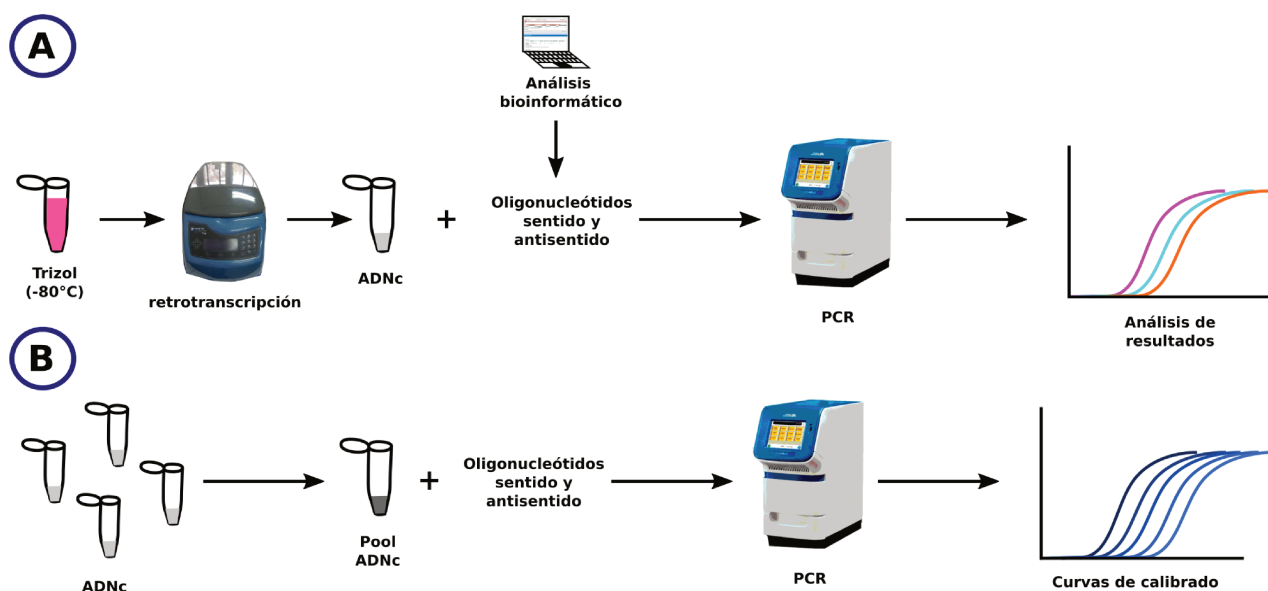


Figura 8. Esquema general del proceso de análisis del ARN mensajero. Brevemente, A) se extrajo ARN de la muestra en trizol mediante el uso de cloroformo y etanol, y luego se realizó la retrotranscripción. Una vez obtenido el ADNc, se realizan las PCR específicas para determinar el ARNm de cada analito, mediante el uso de oligonucleótidos diseñados específicamente. B) A su vez, mediante el uso de una mezcla de ADNc, se obtuvieron las curvas de calibración que nos permitieron obtener la concentración relativa de cada analito estudiado. ADNc: ADN copia; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

4.2. Estudio de la expresión de moléculas de interés mediante PCR en tiempo real

Para evaluar los niveles de expresión relativa de ARNm de las enzimas esteroideogénicas y citoquinas analizadas, se utilizó un protocolo optimizado de PCR en tiempo real (Fig. 8A). Como control interno se determinó la expresión de la proteína ribosomal L19. La amplificación de los genes blanco se realizó con oligonucleótidos específicos diseñados de acuerdo a las secuencias publicadas en GenBank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para el diseño, se utilizó el programa Primer-BLAST, provisto por NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Allí, se ingresó la secuencia de interés, y se establecieron

parámetros óptimos para el diseño del par de cebadores, de manera tal de obtener productos que sean altamente específicos para la región estudiada. Debido a que muchas de las enzimas estudiadas presentan varias isoformas en la base de datos de NCBI, para analizar la expresión total se alinearon las secuencias de las isoformas, utilizando el programa BLAST provisto por NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), y se seleccionaron las regiones en común para el diseño de oligonucleótidos. Un ejemplo de ello se muestra en la figura 9.



Figura 9. Ejemplo del alineamiento de secuencias de las distintas isoformas de la enzima 17 β -HSD 5 utilizada para el diseño de oligonucleótidos. Se han descrito y publicado tres variantes de esta enzima. En azul se indican la zona en común para todas las variantes. Los oligonucleótidos diseñados permitieron analizar la expresión de las tres variantes en conjunto, para así obtener la expresión total de la enzima de interés. 17 β -HSD: 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa.

En cambio, para analizar las variantes por separado, como se hizo para 5 α -R 1, en el diseño de los oligonucleótidos se seleccionaron las regiones no compartidas entre las distintas isoformas. Los oligonucleótidos obtenidos se analizaron en términos de parámetros termodinámicos, para determinar los más adecuados para su uso (como ser, ausencia de dímeros de generación espontánea entre oligonucleótidos, ausencia de la formación de loops, que la misma base nitrogenada no se repita más de tres veces de manera consecutiva, que la diferencia de temperatura de melting y contenido de G-C entre los oligonucleótidos sentido y antisentido sea entre 0 y 0,5). En la tabla 3 se detallan los cebadores utilizados para las enzimas P450scc, P45017 α , 3 β -HSD, P450aro, 5 α -R 1 (total y sus variantes), 5 α -R 2, 5 α -R 3, 3 α -HSD 1, 3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1, 17 β -HSD 3 y 17 β -HSD 5; citoquinas IL2, IL4, IL6 e IL10, y para el control interno (L19).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en las PCR en tiempo real para evaluar la expresión del ARNm de enzimas esteroideogénicas, citoquinas y del gen para control interno.

Enzima / citoquina	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	TH (°C)	TA (pb)	Nº acceso*
P450scc	5'-ACAAGAACATCACCTACTTCCG-3'	5'-TTTCAGGCATCAGAATGAGG-3'	56	183	1, 2
P45017 α	5'-CGTCCAACAACCGTAAGG-3'	5'-CGCCACGAAGACAGGAA-3'	56	209	3
3 β -HSD	5'-TCTCGGTCGTCATCCACAC-3'	5'-AGACTGGCACACTGGCTTG-3'	56	132	4 - 7
P450aro	5'-TTGGAAATGCTGAACCCGAT-3'	5'-CAGGAATCTGCCGTGGGAGAT-3'	58	167	8
5 α -R 1 total	5'-TCCATTCAGATCATATCC-3'	5'-GTATTCAAATAAGCCTCC-3'	52	83	9 - 11
5 α -R variante 1	5'-ATGTTCCCTCGTCCACTAC-3'	5'-TAGCCGTTACAGGTACAG-3'	53	119	9
5 α -R variante 2	5'-ATGTTCCCTCGTCCACTACGG-3'	5'-GCATAGCCACACCACTCCAT-3'	56	195	10
5 α -R variante 3	5'-GCACATGGTCAGAATGGA-3'	5'-GCAAATAGCCGTTACAGG-3'	53	156	11
5 α -R 2	5'-CTGCCTACATTACTTCCAC-3'	5'-ACCGTATGTCTGTGTACCA-3'	55	226	12
5 α -R 3	5'-AATCTCTGTTCCCTGGGAGCA-3'	5'-GACATTGGAGAAGACACTGACG-3'	55	182	13
3 α -HSD 1	5'-CCAAATATCAGCGTGTAG-3'	5'-AGCAGAATCAATATGGCG-3'	51	149	14
3 α -HSD 3	5'-ATACCAGTGTGTGAAGCTGAA-3'	5'-GAGGTCAACATAGTCCAAT-3'	53	328	15 - 18
17 β -HSD 1	5'-GAAGGCTTATGCGAGAGTCTG-3'	5'-TGTGGGCGAGGTATTGGTA-3'	59	178	19, 20
17 β -HSD 3	5'-CAGGGAGGAGTGTGAAGATTATAC-3'	5'-GGAGGTGATGTTACAATGGATG-3'	54	194	21
17 β -HSD 5	5'-AGAGGTTCCGAGAAGTA-3'	5'-GCTTTCTCAGTGAGTT-3'	51	237	22 - 24
IL 2	5'-ATTACAAGAATCCCAAACCTCACC-3'	5'-TGTCTCATCAGCATATTCACACA-3'	53	245	25
IL 4	5'-AGTTCTACAGCCACCAT-3'	5'-CATGATCGTCTTTAGCC-3'	54	200	26 - 28
IL 6	5'-TGGATTCAATGAGGAGACTTGC-3'	5'-CGCAGAATGAGATGAGTTGTC-3'	57	276	29, 30
IL 10	5'-AACCAAGACCCAGACAT-3'	5'-CATGGCTTTGTAGATGC-3'	53	177	31
L19 (control interno)	5'-ATCATCCGCAAGCCTGT-3'	5'-TCCATGTGACCTTCTCTGG-3'	55	139	32

ARNm: ARN mensajero; TH: temperatura de hibridación; TA: tamaño del amplicón; *1: NM_000781.2; 2: NM_001099773.1; 3: NM_000102.3; 4: NM_000862.2; 5: NM_001328615.1; 6: NM_000198.3; 7: NM_001166120.1; 8: NM_000103.3; 9: NM_001047.3; 10: NM_001324322.1; 11: NM_001324323.1; 12: NM_000348.3; 13: NM_024592.4; 14: NM_001818.3; 15: NM_001354.5; 16: NM_205845.2; 17: NM_001135241.2; 18: NM_001321027.1; 19: NM_000413.2; 20: NM_001330219.2; 21: NM_000197.1; 22: NM_003739.5; 23: NM_001253908.1; 24: NM_001253909.1; 25: NM_000586.3; 26: NM_000589.4; 27: NM_172348.2; 28: NM_001354990.1; 29: NM_000600.5; 30: NM_001318095.1; 31: NM_000572.3; 32: NM_000981.3.

Los productos retro-transcritos se amplificaron por duplicado utilizando el Real-Time DNA Step One Cycler (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Para la amplificación, se colocaron 2,5 uL de ADNc con 2 uL de HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica, Rosario, Argentina), y 10 pmol de cada oligonucleótido (Invitrogen), en un volumen final de 10 uL. Luego del paso inicial de desnaturalización a 95°C por 15 min, se llevaron a cabo 40-45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg, hibridación por 15 seg (tabla 3), y extensión a 72°C por 15 seg. La pureza y especificidad de cada producto fue confirmada por curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa. Se incluyeron controles negativos en cada ensayo, los cuales consistieron en tubos que no contenían ADNc. Como control positivo se utilizó ADNc de placenta humana. El ciclo umbral (Ct) de cada muestra fue calculado utilizando el programa de análisis Step One Software (Applied Biosystems). La eficiencia de las reacciones de PCR se evaluó para cada par de oligonucleótidos mediante la amplificación de 6 diluciones seriadas de una mezcla de ADNc, con posterior construcción de una recta de Ct versus el logaritmo de la dilución [eficiencia=10^(-1/pendiente) -1] (Fig. 8B). La eficiencia de las reacciones varió de 98% a 102%. No evidenciamos diferencias significativas en los valores de Ct del gen control (L19) entre los grupos estudiados.

Los niveles de expresión relativa para cada gen blanco referido al gen control, se obtuvieron utilizando el método de la curva estándar relativa (Čikoš et al., 2007). Para cada uno de los genes analizados se construyó una curva de calibrado, graficando los Ct versus el log de la concentración relativa. Luego, entrando en esas mismas curvas con el Ct de cada muestra, se obtuvieron las cantidades relativas de los genes analizados. Los niveles de expresión de cada gen estudiado fueron calculados normalizando contra la cantidad relativa del gen control.

5. Análisis proteico

5.1. Generación del anticuerpo anti 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa 5

Debido a la necesidad de evaluar la expresión proteica de la 17 β -HSD 5, se decidió generar un anticuerpo policlonal para tal fin. Primero se realizó el estudio bioinformático de la secuencia de la proteína de interés para analizar posibles sitios transmembrana, y para buscar las zonas de mayor antigenicidad y menor hidrofobicidad, utilizando el software TMPred (<https://github.com/rcanovas/TMPred>). Una vez encontrada la mejor secuencia, teniendo en cuenta las características del vector a utilizar (pGEX-4T-3, Sigma-Aldrich), se diseñaron los pares de oligonucleótidos específicos para clonado utilizando el programa Primer-BLAST: oligonucleótido sentido 5'-GGGGGAATCCGACAAAATTAGCAA-3', oligonucleótido antisentido 5'-TGGGCTCGAGAAAAGGTATTGAAGAAGC -3'. Se realizó una PCR utilizando CMSP y los oligonucleótidos diseñados para obtener el fragmento de ADN que se utilizó como inserto en el clonado al vector (Fig. 10A). Se confirmó la pureza y el peso molecular del fragmento mediante corrida electroforética en gel de agarosa (Fig. 11). Posteriormente se purificó utilizando el kit *PureLink Quick Gel extraction and PCR Purification Combo* (Invitrogen).

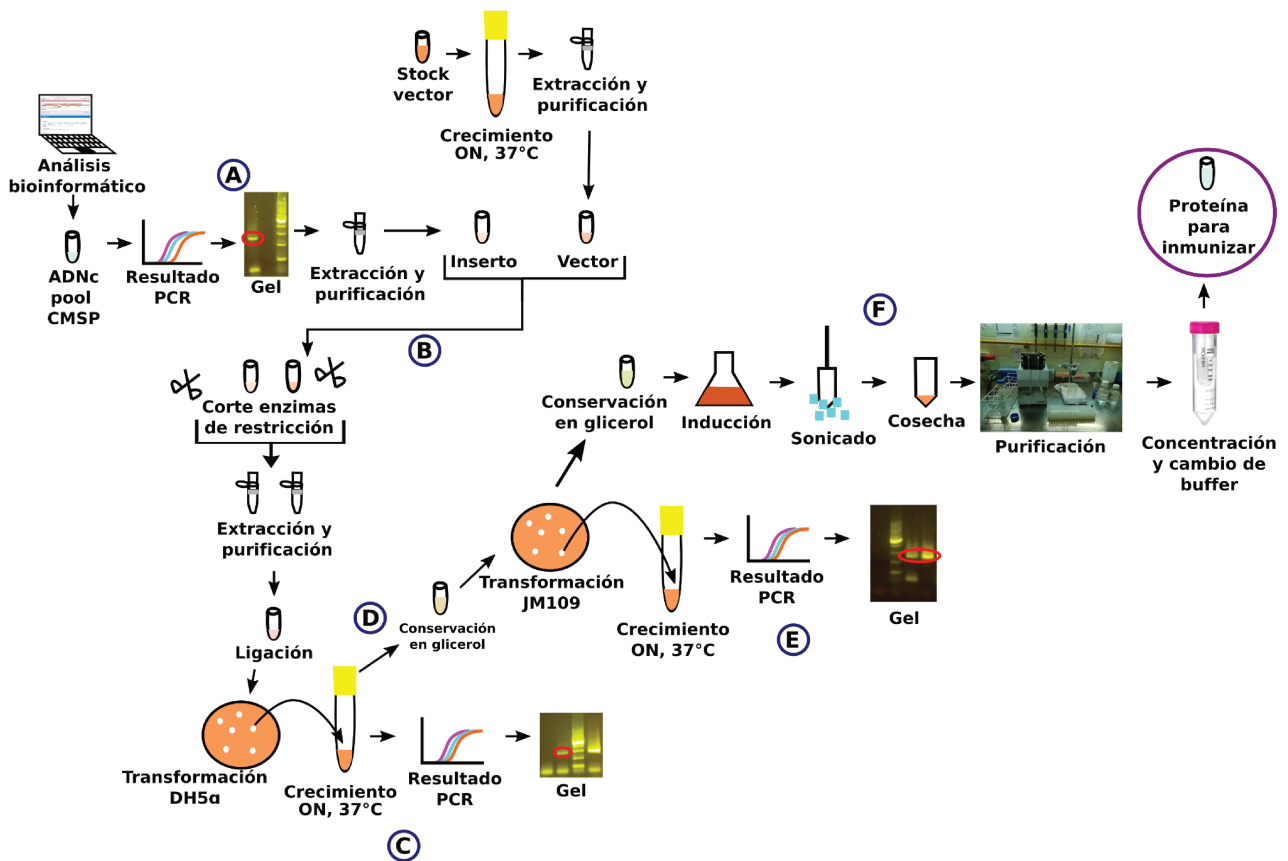


Figura 10. Esquema general del proceso de generación de la proteína de interés para luego inmunizar animales y obtener como producto final un anticuerpo. Brevemente, **A)** Se obtuvo por PCR y se purificó el fragmento a clonar, y en paralelo se purificó el vector de clonado. **B)** Se cortaron el fragmento y vector con enzimas de restricción específicas, luego se ligaron y transformaron bacterias para conservación del producto. **C)** Una vez verificado el producto específico de interés, **D)** se transformaron bacterias de expresión. **E)** Una vez verificada nuevamente la especificidad del producto, **F)** se indujo la expresión proteica, se sonicaron las células, y se cosechó y purificó la proteína de interés mediante el uso de columnas. Se concentró la proteína y se conservó para la posterior inmunización de los animales. ADNc: ADN copia; CMSP: células mononucleares de sangre periférica; ON: durante la noche (*overnight*); PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

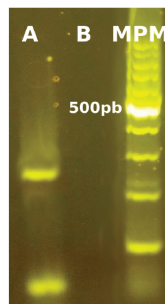


Figura 11. Confirmación de obtención del inserto de 17 β -HSD 5. A) Mezcla de ADNc de células mononucleares de sangre periférica. B) Control negativo (tubo de PCR sin muestra). MPM: Marcador de peso molecular. ADNc: ADN copia; 500pb: peso molecular de la banda de mayor intensidad del MPM. Producto esperado: 271pb.

Por otro lado, se purificó el vector pGEX-4T-3 a partir de un stock de bacterias. Para ello se realizó un repique de los clones en medio Luria Bertani (LB), se dejó crecer durante toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm), y al día siguiente se aisló utilizando el kit *Wizard Plus SV minipreps* de Promega. Luego, tanto el inserto como el vector se cortaron con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (Biodynamics, CABA, Arg) siguiendo el

siguiente protocolo (Fig. 10B): se armaron dos tubos de corte, uno para el vector y otro para el inserto, con 2 μ l de agua estéril, 2 μ l de buffer H, 0,5 μ l de cada enzima, y 15 μ l de ADN (vector o inserto). Se incubaron a 37°C por 2hs y media y se purificaron utilizando el kit *PureLink Quick Gel extraction and PCR Purification Combo* de Invitrogen. Con ambos productos purificados, se continuó con la ligación de los mismos utilizando 1 μ l de buffer de T4 DNA ligasa, 1 μ l de T4 DNA ligasa (ambos de Biodynamics), 5 μ l de ADN de inserto cortado y 4 μ l de ADN de vector cortado. Se mantuvieron toda la noche a 4°C, y al día siguiente se procedió a la transformación de *E. coli* DH5 α competentes. Para ello, a un vial de células competentes se le agregó el ADN plasmídico producto de la ligación, procesando a la par un control positivo (vial de bacteria al que se le agregó vector sin cortar) y un control negativo (sólo bacterias). Se sembraron cuatro placas: una con 50 μ l del producto de transformación del control negativo, otra con 50 μ l del producto del control positivo, y las últimas dos con 15 y 75 μ l del producto de transformación de la proteína de interés. Se incubaron a 37°C hasta el día siguiente. Se tomaron colonias aisladas y se repicaron en tubos con medio LB, agregando glucosa y ampicilina y dejando durante la noche a 37°C en agitación a 180 rpm (Fig. 10C). Se confirmó el producto por PCR y gel de agarosa (Fig. 12), y se conservaron los clones a -80°C en glicerol al 50% (Fig. 10D).

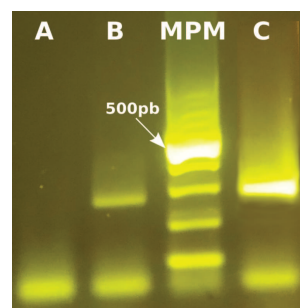


Figura 12. Confirmación transformación de *E. coli* DH5 α competentes con el inserto de 17 β -HSD 5 unido al vector. A) Control negativo (tubo de PCR sin muestra). B) Dilución 1/5000 del producto de PCR de la transformación de *E. coli* DH5 α competentes con el inserto de 17 β -HSD 5 unido al vector. C) Mezcla de ADNc a partir del cual se extrajo el inserto de 17 β -HSD 5 (control positivo). MPM: Marcador de peso molecular. ADNc: ADN copia. 500pb: peso molecular de la banda de mayor intensidad del MPM. Producto esperado: 271pb.

Se seleccionó uno de los clones conservados y se extrajo el ADN utilizando el kit *Wizard Plus SV minipreps* de Promega. Ese ADN se utilizó para la transformación de bacterias (*E. coli* JM109) competentes (Fig. 10E), procediendo de la misma manera que se realizó previamente para la transformación de DH5 α competentes (una placa para el control positivo, una para el control negativo y dos placas para la proteína de interés). Se incubaron a 37°C hasta el día siguiente. Se tomaron colonias aisladas y se repicaron en tubos con medio LB, agregando glucosa y ampicilina y dejando toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm). Se confirmó el producto por PCR y gel de agarosa (Fig. 13), y se conservaron clones a -80°C en glicerol al 50%.

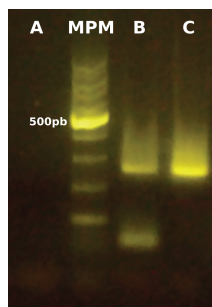


Figura 13. Confirmación transformación de bacterias (*E. coli* JM109) competentes con el inserto de 17 β -HSD 5 unido al vector. A) Control negativo (tubo de PCR sin muestra). B) Dilución 1/2500 del producto de PCR de la transformación de *E. coli* JM109 competentes con el inserto de 17 β -HSD 5 unido al vector. C) Dilución 1/500 del producto de PCR de la transformación de *E. coli* JM109 competentes con el inserto de 17 β -HSD 5 unido al vector. MPM: Marcador de peso molecular. 500pb: peso molecular de la banda de mayor intensidad del MPM. Producto esperado: 271pb.

Se seleccionó el clon con la proteína de interés, y se colocó una ansada en tubo LB, agregando al medio glucosa y ampicilina y dejando toda la noche a 37°C en agitación (180 rpm). Al día siguiente, se colocaron 2 mL del cultivo en un erlenmeyer con medio TB y ampicilina y se dejó crecer entre 2 - 3 hs a 37°C en agitación (180 rpm). Luego se separaron varias fracciones de medio, a las cuales se les colocó IPTG para inducir la expresión proteica (Fig. 10F), incubando algunas a 30°C y otras a 37°C, en ambos casos en agitación (180 rpm) durante 3 horas. Se cosecharon las células por centrifugación, se sonicaron con PBS helado filtrado, incubaron con Tritón al 20% en frío, y luego se obtuvo el precipitado por centrifugación, el cual se conservó a 4°C con inhibidores de proteasas (PMSF y aprotinina). Se purificó la proteína recombinante unida a glutatión S transferasa (GST) mediante cromatografía de afinidad a GSTrap (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). La columna se lavó con 10 - 15 volúmenes de PBS filtrado. Luego, se sembró la muestra, se volvió a lavar con PBS filtrado, y se eluyó la proteína recombinante con glutatión 10mM en TRIS HCL 50mM, pH 8. Se volvió a lavar la columna con PBS filtrado, y se conservó en etanol 20%. Todo el proceso se llevó a cabo a una velocidad igual o menor de 1 ml/minuto. Los eluatos se conservaron a -20°C en glutatión 10mM e inhibidores de proteasas (PMSF y aprotinina), y luego se concentraron en tubos de ultrafiltración de un poro de 10kD (Amicon ULTRA, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Además, con esos mismos tubos se realizó el cambio de buffer (glutatión por PBS filtrado), para acondicionar la muestra para inyectar a los animales. Se obtuvieron 6 viales de aproximadamente 1 ml, 3 de los cuales pertenecían a la proteína inducida a 30°C y los otros eran de la proteína inducida a 37°C.

5.2. Inmunocitoquímica

Las muestras fijadas se permeabilizaron con Tween al 0,2%, a 37°C, durante 30 minutos. Luego, se bloquearon sitios de unión no específicos y la actividad peroxidasa endógena. Se agregaron anticuerpos anti 5 α R-1 y P450aro, producidos previamente en nuestro laboratorio (Rossetti et al., 2019), y se incubaron toda

la noche a 4°C. Se revelaron las reacciones utilizando el método estreptavidina – biotina peroxidasa, con diaminobencidina (DAB – Sigma-Aldrich) como cromógeno. Las muestras luego fueron montadas con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma-Aldrich) (Fig. 14). Como control positivo se procesaron improntas de ovario humano de pacientes sanas. Como controles negativos se utilizaron improntas de ovario y CMSP, a las cuales se les agregó el sobrenadante del anticuerpo primario pre adsorbido. Para la obtención del mismo, a una alícuota de anticuerpo primario (anti 5 α R-1 o anti P450aro) se le realizó un tratamiento de pre adsorción con su antígeno específico (5 α R-1 o P450aro, respectivamente) y luego se centrifugó, para así obtener el sobrenadante (Rossetti et al., 2019).

Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara Spot Insight V3.5 unida a un microscopio Olympus BH2 (12V de iluminación, lámpara de halógeno de 100W, equipado con una fuente de luz estabilizada). El microscopio fue seteado para iluminación Koehler. Se utilizó una impronta de referencia para corregir la iluminación desigual y para calibrar el sistema de medida. El porcentaje de células positivas se calculó contando 1000 células por gota, en un total de tres gotas por impronta.

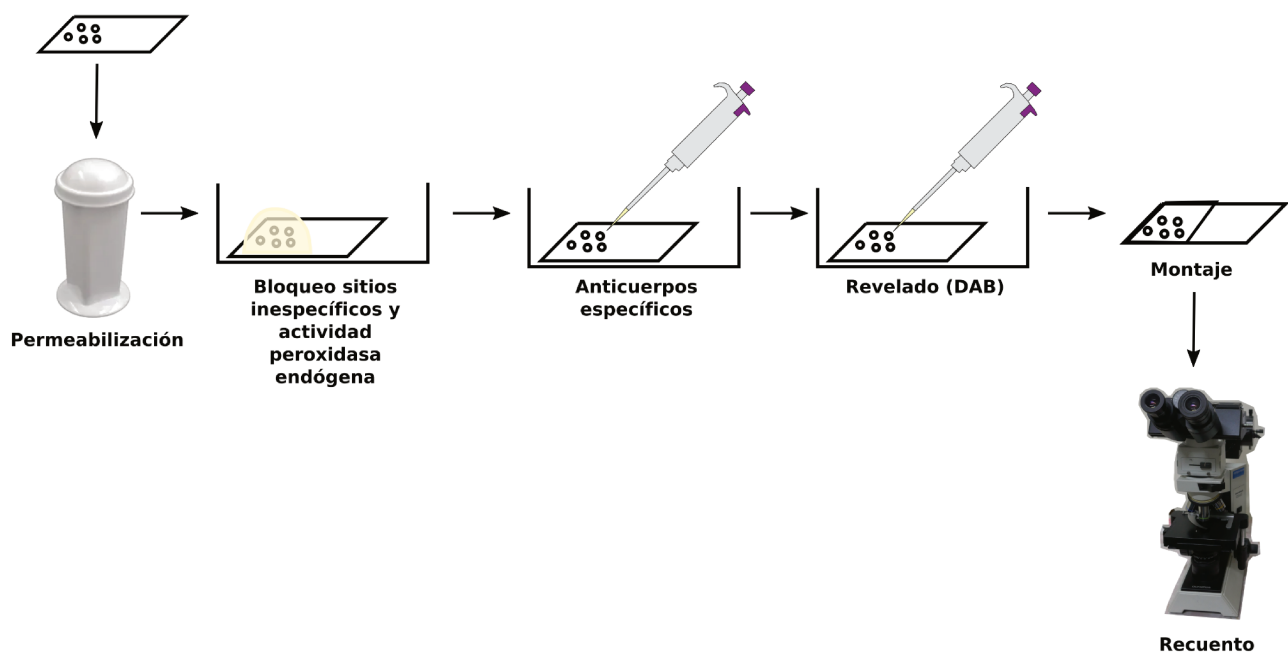


Figura 14. Esquema general del proceso de inmunocitoquímica (ICQ) para determinar la expresión proteica de enzimas de interés. Brevemente, las improntas con las células fijadas se permeabilizaron, y luego se procedió al bloqueo de sitios inespecíficos e inactivación de peroxidasa endógena. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos específicos y luego se procedió a la revelación con diaminobencidina (DAB). Una vez realizado el montaje de la impronta, se observó al microscopio para realizar el recuento.

6. Estudios de metilación

6.1. Análisis bioinformático

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las regiones promotoras de 5 α -R 1, 5 α -R 3, 3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1 y 17 β -HSD 5. Una vez obtenidos, se estudiaron los posibles sitios de unión a factores de transcripción, así

como también islas o sitios CpG potencialmente metilables (Fig. 15 A). Para ello, se analizaron los genes utilizando software bioinformático de uso libre (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>). Para determinar la presencia de sitios de unión a factores de transcripción, se utilizó el programa Algen Promo (Farre, 2003; Messeguer et al., 2002). A esas mismas regiones se les estudió la presencia de sitios de corte por enzimas de restricción (*Bst*UI, *Tai*I, *Sma*I), y se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido que flanquearan esas regiones, utilizando el programa NCBI Primer-BLAST (tabla 4). El fundamento del diseño de pares de oligonucleótidos que abarquen esos sitios de corte se debe a que cuando un sitio CpG es metilado, no es posible su digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación, lo que lleva a la amplificación del fragmento. En contraste, cuando la isla no está metilada, las enzimas rompen el ADN y no se produce amplificación.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en las PCR en tiempo real para evaluar el estado de metilación de enzimas esteroideogénicas.

Enzima con sitio de corte	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	TH (°C)	TA (pb)
5 α -R 1 <i>Sma</i> I / <i>Tai</i> I	5'-ACGCAGCACGCAGAAAC-3'	5'-GGCTTATCCTGGACGG-3'	59	138
5 α -R 3 <i>Sma</i> I	5'-GGAGGCAGAGGTCACGGT-3'	5'-GTTGAGGAGGCTGGAGGG-3'	56	130
3 α -HSD 3 <i>Tai</i> I	5'-CGGCAGGTTCTCAGTCAA-3'	5'-GGGCAAACACAGTCCACA-3'	53	94
17 β -HSD 1 <i>Tai</i> I (a) / <i>Bst</i> UI	5'-CCTCATCTCCACCCAA-3'	5'-CGCAGCAAATGTAAGCCG-3'	60	222
17 β -HSD 1 <i>Tai</i> I (b)	5'-GCAAGAAAGGCTCCGTCA-3'	5'-GGGATTATAGGCGACAGC-3'	58	170
17 β -HSD 1 <i>Tai</i> I (c)	5'-CCCAGCCTCAAAGCATAT-3'	5'-TGACAGAATGTGCCCAGA-3'	54	142
17 β -HSD 1 <i>Tai</i> I (d)	5'-CACCTCCCAACGCCTTTA-3'	5'-ACAGACATGAGCCCACTGC-3'	60	207
17 β -HSD 5 <i>Tai</i> I	5'-GGTTAGACGGACTATTGC-3'	5'-CCCTACTTGTCTCATGGA-3'	45	166
Control interno	5'-GACGGGTAAAGCCTTAGGTG-3'	5'-GGTGGGTGAGAAGTGAAGA-3'	55	182

TH: temperatura de hibridación; TA: tamaño del amplicón.

6.2. Extracción de ADN, digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y PCR en tiempo real

El ADN se extrajo utilizando un protocolo modificado de Miller (S. A. Miller et al., 1988) (Fig. 15 B). Al tubo con buffer TEN se le agregó SDS 20%, NaCl 5 M y 5 mg/mL de RNasa, y se incubó por 30 min a 37°C. Luego, se agregó cloroformo, se centrifugó, y se precipitó el ADN de la fase acuosa con etanol al 95%, frío. Posteriormente, se lavó con etanol al 70%, y se suspendió en buffer TE. La concentración total de ADN

fue medida en espectrofotómetro (Nanodrop) utilizando el cociente A260 / A280, y las muestras se conservaron a -20°C. Se procedió luego a la digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación. A 1 ug de ADN total se le agregaron 10 U de BstUI (New England BioLabs, Beverly, MA) y se incubó 1 h a 60°C, 5 U de TaiI (Thermo Fisher Scientifics Inc, Waltham, MA) incubados 4 hs a 65°C, o 5 U de SmaI (Promega) incubados a 25°C por 4 hs. Los productos de digestión se purificaron utilizando el Wizard SV gel and PCR Clean-Up System Kit, de acuerdo a lo sugerido por el fabricante (Promega).

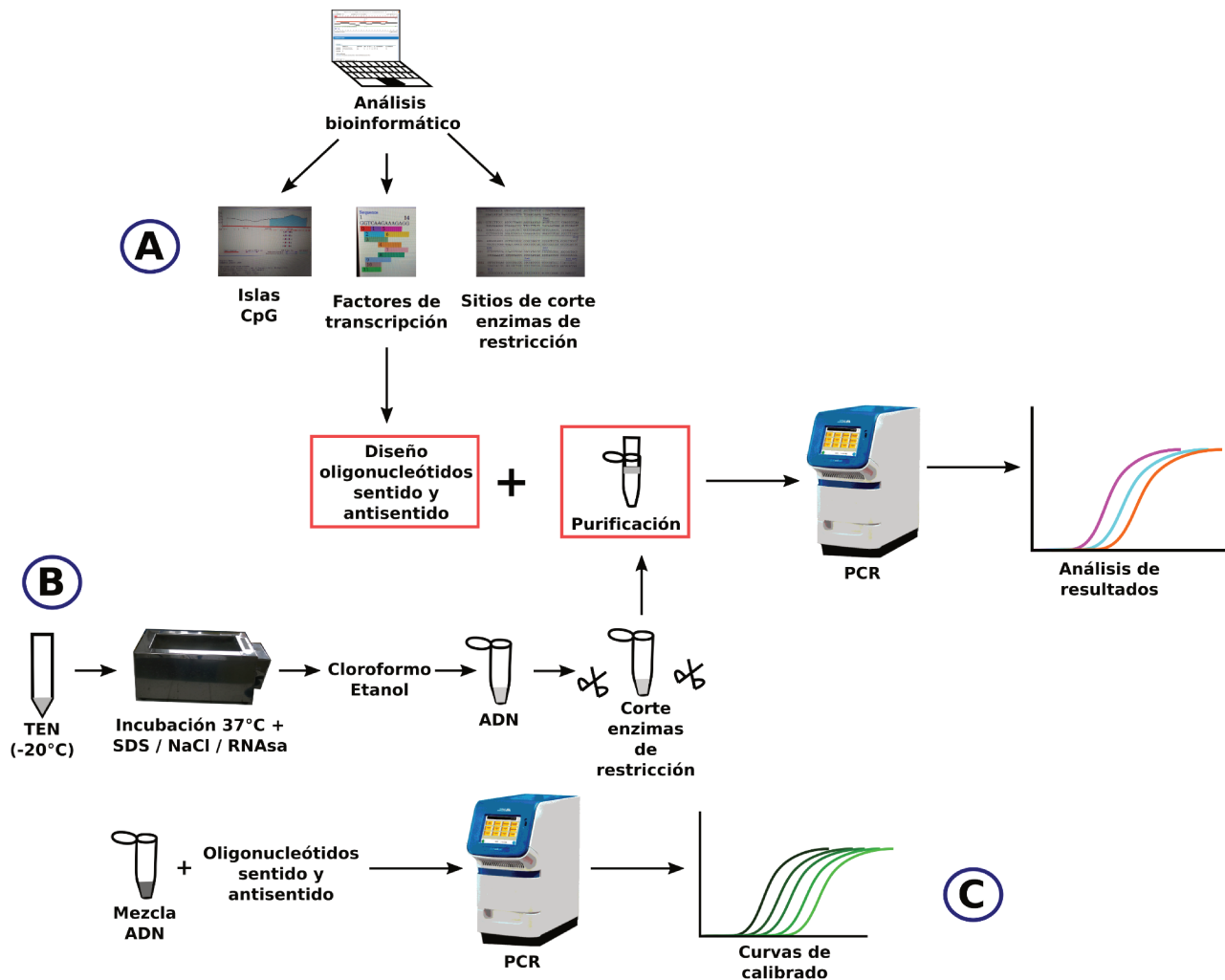


Figura 15. Esquema general del proceso de A) análisis bioinformático B) extracción de ADN, digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación, y PCR en tiempo real para los estudios de metilación. Brevemente, luego del análisis bioinformático, se procedió al diseño de oligonucleótidos específicos para luego realizar la PCR. En paralelo, se extrajo el ADN con cloroformo y etanol, se cortó con enzimas de restricción, se purificó, y luego se analizó por PCR. A su vez, utilizando una mezcla (pool) de ADN y los oligonucleótidos específicos, C) se obtuvieron las curvas de calibrado para cada sitio a analizar. PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TEN: buffer TRIS – EDTA – NaCl.

Para analizar la expresión relativa de las regiones promotoras de interés, se utilizó PCR en tiempo real. El ADN genómico se amplificó por duplicado utilizando el Real-Time DNA Step One Cyler (Applied Biosystems), siguiendo el mismo protocolo indicado en el inciso 5. La pureza y especificidad de cada producto, el Ct de cada muestra, la eficiencia de las reacciones (las cuales variaron entre un 90% - 104%) y los niveles de metilación relativa de cada promotor, utilizando el método de curva estándar, fueron realizados

como se describió en el apartado 5b (Fig. 15 C). Como control interno se amplificó una región desprovista de sitios de corte para las enzimas utilizadas (BstUI, Tail o SmaI).

7. Cultivos celulares

Las muestras criopreservadas fueron descongeladas a 37°C en baño de agua. Se lavaron 2 veces con medio de cultivo precalentado, y se prepararon suspensiones de 1×10^6 células/ml. Se determinó la vitalidad celular con colorante supravital, y se utilizaron las muestras cuyo porcentaje de células vivas post criopreservación fue mayor al 90%. El medio de cultivo consistió en RPMI más suero fetal bovino al 10%, 100U de antibióticos (penicilina/streptamicina, Sigma-Aldrich) y glutamax 2mM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se colocaron 250 μ l de la suspensión celular en cada pocillo de la placa de cultivo, y se incubaron en estufa a 37°C con 5% CO₂ por 16 – 20hs antes de comenzar con los experimentos (período de descanso, **día 0**). Al día siguiente, a los pocillos correspondientes se les agregó el mitógeno de la fitolaca (PWM, Sigma-Aldrich) o DMSO (control negativo), y se volvieron a incubar en estufa a 37°C con 5% CO₂ por 24hs (**día 1**). Al día siguiente (**día 2**), a los pocillos correspondientes se les agregó dutasteride y/o testosterona (ambos de Sigma-Aldrich). Al **día 4**, se cosecharon y lavaron las células con PBS estéril, y se conservaron en Trizol a -80°C para el posterior análisis de ARNm como se describió en el inciso 4 (Fig. 16).

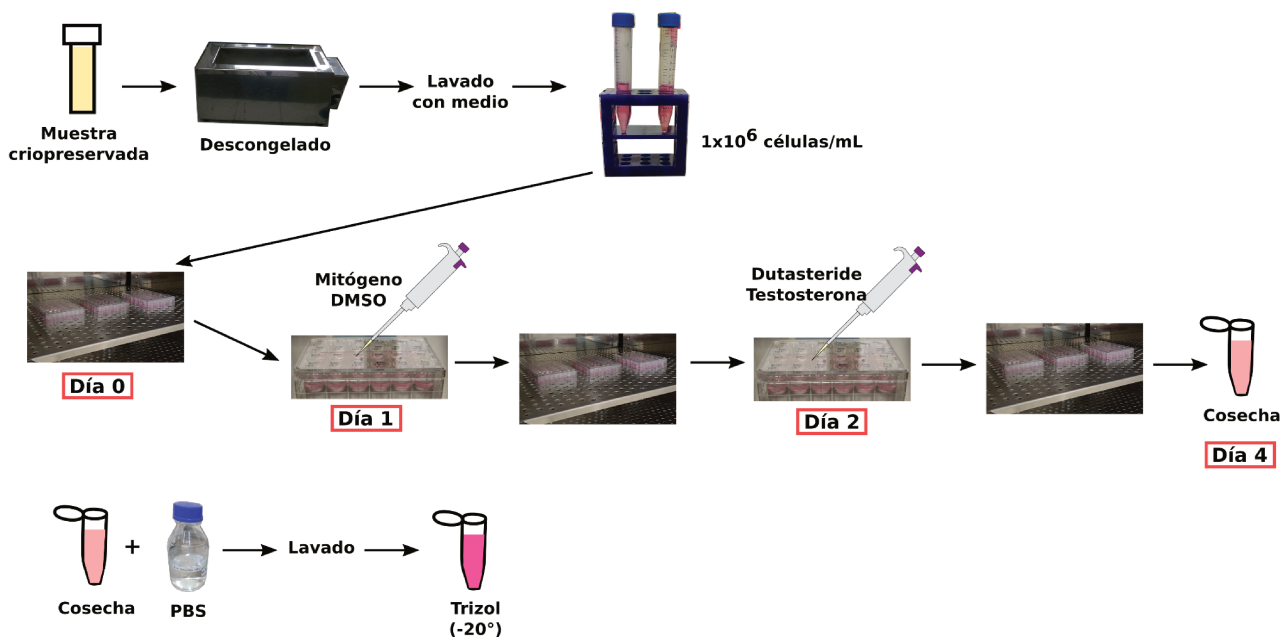


Figura 16. Esquema general del proceso de cultivos celulares. Brevemente, las muestras criopreservadas se descongelaron rápidamente y se lavaron con medio tibio. Se incubaron las células en estufa a 37°C con 5% CO₂ por 16 – 20hs (descanso, día 0). Al día siguiente (día 1) se colocó mitógeno o control negativo (DMSO) en los pocillos correspondientes, y se volvieron a incubar las células. Al otro día (Día 2), se colocó testosterona y dutasteride en los pocillos correspondientes, y se volvieron a incubar en estufa hasta su cosecha (día 4). Se conservaron las células en trizol para posterior extracción de ARN. DMSO: dimetilsulfóxido; PBS: buffer fosfato salino.

Las soluciones madres de dutasteride y testosterona se realizaron con DMSO, y se congelaron a -20°C protegidas de la luz, y para su posterior uso se diluyeron en medio de cultivo. El PWM se diluyó con PBS estéril, se filtró, y se realizaron alícuotas que se conservaron a -20°C . Para su posterior uso, se diluyó en medio de cultivo de manera de agregar por cada pocillo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PWM.

Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera: se procesaron negativos, positivos y tratados, por triplicado, en un volumen final de 500 μl por pocillo. Los negativos consistieron en pocillos con células a los que se les agregó 250 μl de medio de cultivo con 1 μl de DMSO. Los controles positivos consistieron en células con medio de cultivo y PWM. En cuanto a los tratamientos, se realizaron cultivos con PWM + 1 μl de testosterona 5×10^{-6} M (PWM+T), y PWM + 0,5 μl de dutasteride 1×10^{-4} M, incubado por 2 horas, al cual luego se agregó 0,5 μl de testosterona 1×10^{-5} M (PWM+D+T). Las concentraciones utilizadas de testosterona y dutasteride se seleccionaron luego de evaluar estudios realizados por otros autores (Corsini et al., 2016; Zhou & Speiser, 1999). Se seleccionó dutasteride para la prueba ya que se sabe que es inhibidor de la $5\alpha\text{-R 1}$ (Li et al., 2011; Xu et al., 2006).

8. Análisis estadísticos

Los estudios estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa RStudio (2022). Primero se analizaron los grupos de datos para evaluar normalidad y homocedasticidad, y de acuerdo a esos resultados, para evaluar diferencias entre grupos experimentales, se aplicaron estudios paramétricos o no paramétricos. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con un $p < 0,05$. En el caso de análisis de correlaciones, también primero se evaluó normalidad y homocedasticidad, y de acuerdo a esos resultados se utilizó el test de Spearman y/o Pearson. Se consideraron significativamente fuertes cuando presentaron un índice de correlatividad entre 0,7 y 1, o entre -0,7 y -1.

RESULTADOS

1. Niveles séricos de testosterona, estradiol y progesterona en pacientes con LLC

Dada la discrepancia en la bibliografía respecto a los niveles séricos de diversas hormonas en pacientes con LLC (Allain et al., 2018; Everaus, 1992; Everaus et al., 1992), evaluamos los niveles circulantes de testosterona, E2 y P4 en individuos con LLC versus sus respectivos controles (Fig. 17). No se encontraron diferencias entre los grupos (ScheirerRayHare $p > 0.05$). Dado que las mujeres de los grupos control (MS) y LLC (M-LLC) eran menopáusicas, observamos niveles reducidos de E2 y P4 al compararlos con sus contrapartes masculinas (VS y V-LLC). Estos resultados fueron los esperados de acuerdo al sexo y edad de los individuos estudiados, como ya fue establecido por otros autores (Greenblatt et al., 1976).

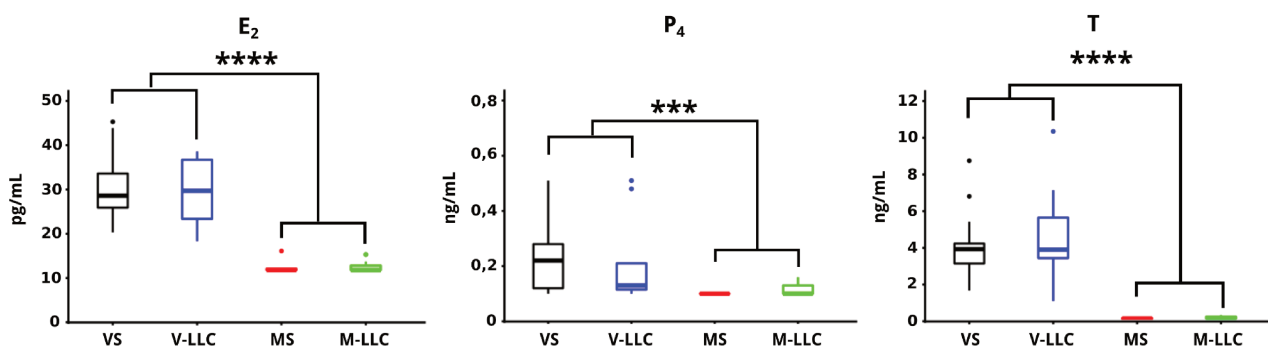


Figura 17. Niveles séricos de estradiol, progesterona y testosterona en individuos sanos (S) y en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). **** indican diferencias significativas con $p < 0,0001$, y *** diferencias significativas con $p < 0,001$, basados en la prueba Scheirer Ray Hare. VS: varones sanos; MS: mujeres sanas; V-LLC: varones con LLC; M-LLC: mujeres con LLC; E₂: estradiol; P₄: progesterona; T: testosterona. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*).

2. Estudio de CMSP circulantes

2.1. Caracterización de la expresión de ARNm de enzimas esteroidogénicas en individuos sanos y en pacientes con LLC

En CMSP de individuos sanos, no se detectaron los transcritos de P450aro y 3 α -HSD 1, mientras que sí se observó expresión de ARNm para P450scc, P450(17 α), 5 α -R 1, 2 y 3, 3 β -HSD, 3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1, 3 y 5, P450scc, P450(17 α), 5 α -R 2 y 17 β -HSD 3. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de transcritos de 5 α -R 1, 5 α -R 3, 3 β -HSD, 3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1 y 17 β -HSD 5 relacionados al sexo, edad o fase del ciclo menstrual (Fig. 18).

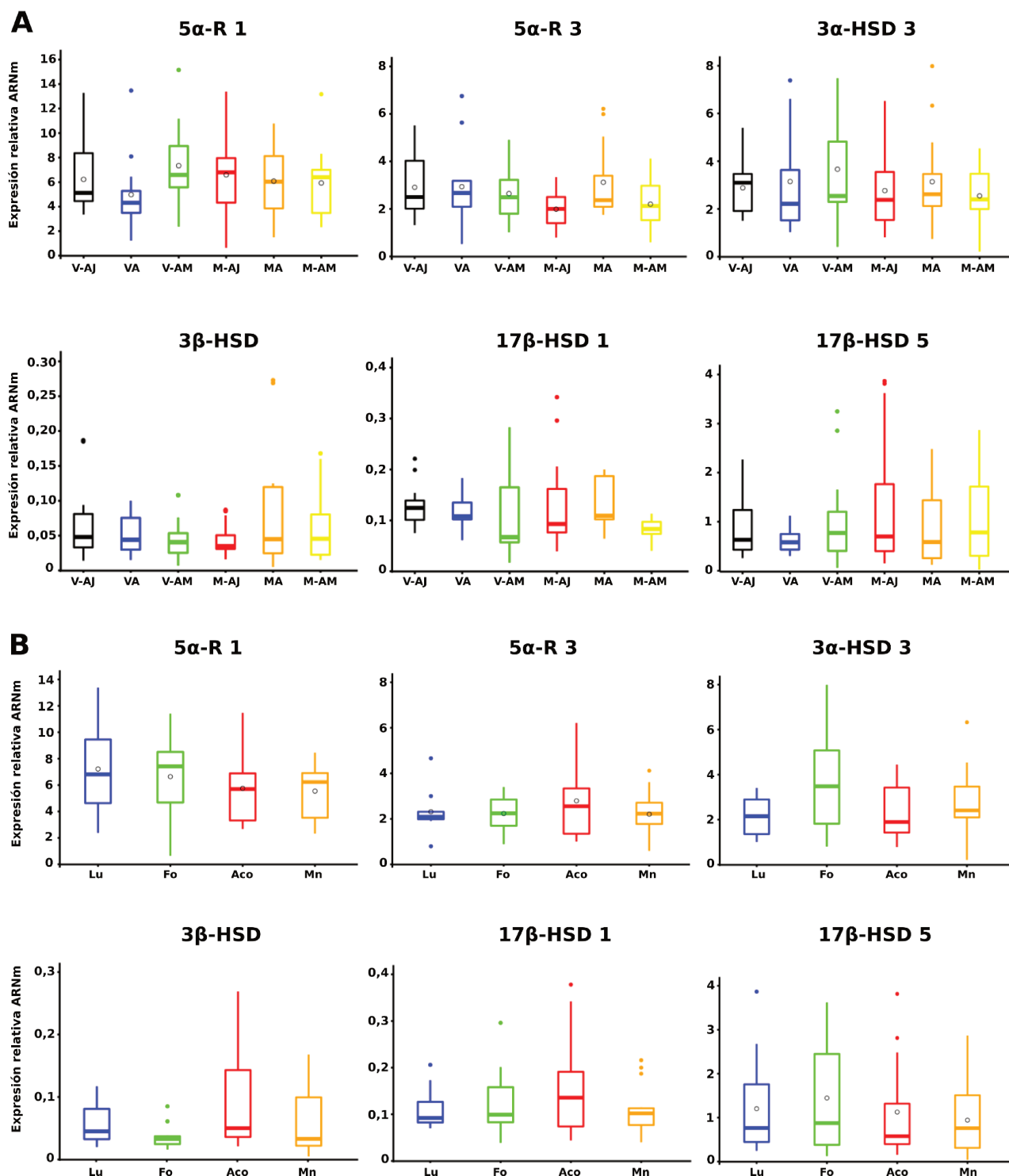


Figura 18. Expresión de ARNm de enzimas esteroidogénicas en **A)** individuos sanos en cuanto a sexo y edad, y **B)** en mujeres sanas en cuanto a día de ciclo menstrual y uso de anticonceptivos. En todos los casos, los p fueron mayores a 0,05, basados en las pruebas ANOVA o su variante no paramétrica de acuerdo al caso (Kruskal Wallis o Scheirer Ray Hare). M-AJ: mujeres adultas jóvenes (20 - 39 años); MA: mujeres adultas (40 - 59 años); M-AM: mujeres adultas mayores (> 60 años); V-AJ: varones adultos jóvenes (20 - 39 años); V-A: varones adultos (40 - 59 años); V-AM: varones adultos mayores (> 60 años); Lu: lútea; Fo: follicular; Aco: uso de anticonceptivos; Mn: menopausia; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4-isomerasa; 5 α -R: 5 α reductasa; 3 α -HSD: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*). \circ indica los valores de media en distribuciones normales.

Si bien se observó expresión de ARNm de P450scc, P450(17 α), 5 α -R 2 y 17 β -HSD 3, y se confirmó mediante geles de agarosa (Fig. 19), sus niveles fueron demasiado bajos para poder cuantificar.

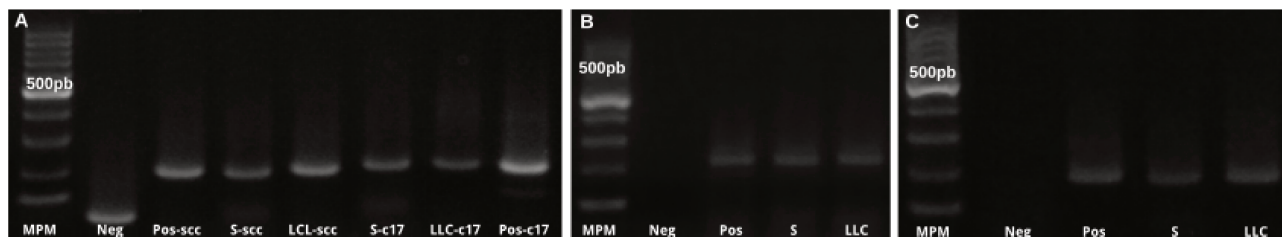


Figura 19. Expresión de A) P450scc (182pb), P450(17 α) (209pb), B) 5 α -R 2 (226pb) y C) 17 β -HSD 3 (194pb) en individuos sanos (S) y pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). MPM: marcador de peso molecular; Neg: control negativo (no se agregó muestra); Pos: control positivo (placenta humana); Pos-scc: control positivo para P450scc; Pos-c17: control positivo para P450(17 α); S-scc: P450scc en individuos sanos; LLC-scc: P450scc en pacientes con LLC; S-c17: P450(17 α) en S; LLC-c17: P450(17 α) en LLC. P450scc: citocromo P450 de escisión de la cadena lateral; P450(17 α): citocromo P450 17 α -hidroxilasa/c17,20-liasa; 5 α -R: 5 α reductasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 500pb: peso molecular de la banda de mayor intensidad del MPM. El marcador de peso molecular utilizado presenta fragmentos que van desde los 100 a los 1000pb, con incrementos de a 100pb.

En CMSP de pacientes con LLC se detectó expresión del ARNm de las mismas enzimas que en individuos sanos, y los niveles de expresión de ARNm de P450scc, P450(17 α), 5 α -R 2 y 17 β -HSD 3 también fueron demasiado bajos para poder cuantificarlos (Fig. 19). Por otro lado, la expresión de transcritos de 5 α -R 1, 5 α -R 3, 3 β -HSD, 3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1 y 17 β -HSD 5 fue cuantificable en pacientes con LLC, y no se encontraron diferencias entre pacientes con mLLC o uLLC (Fig. 20).

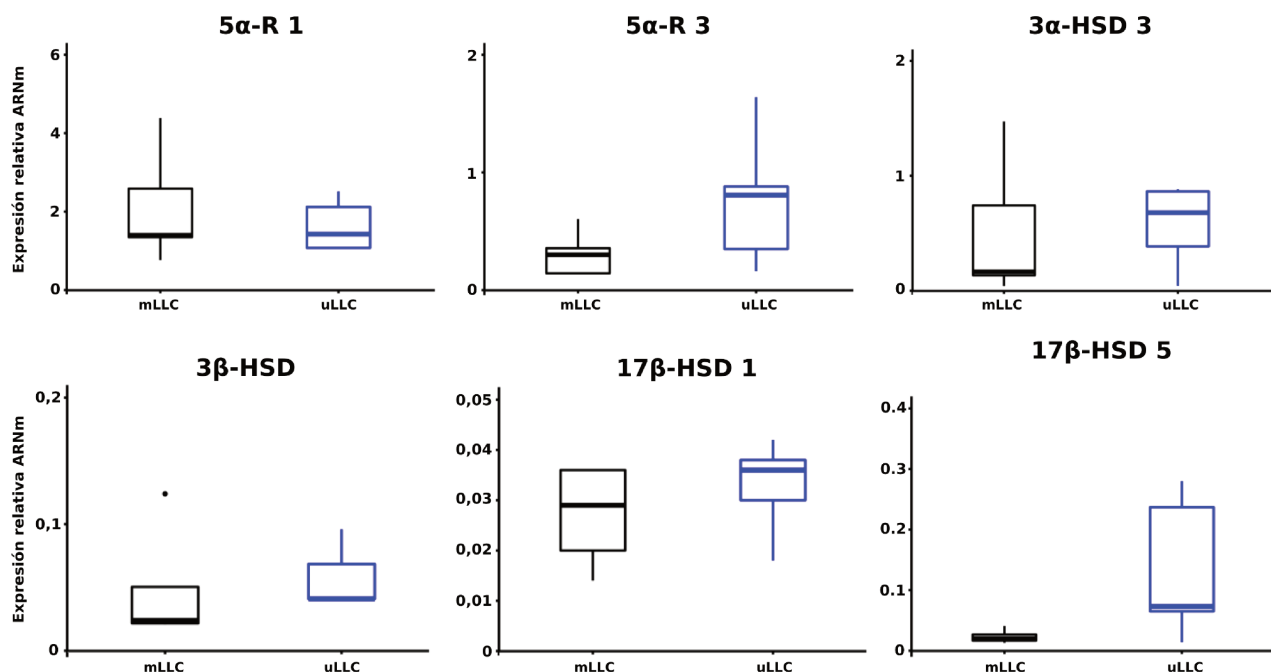


Figura 20. Expresión de ARNm de enzimas esteroidogénicas en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) teniendo en cuenta el estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas. mLLC: pacientes con LLC con las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas mutadas; uLLC: pacientes con LLC con las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas no mutadas; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4-isomerasa; 5 α -R: 5 α reductasa; 3 α -HSD: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada

caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*).

Sin embargo, al comparar la expresión de las enzimas cuantificables entre individuos sanos y pacientes con LLC del mismo sexo, salvo por el caso de 3β -HSD, todos los niveles de ARNm de las enzimas fueron significativamente menores en sujetos con la patología (Fig. 21).

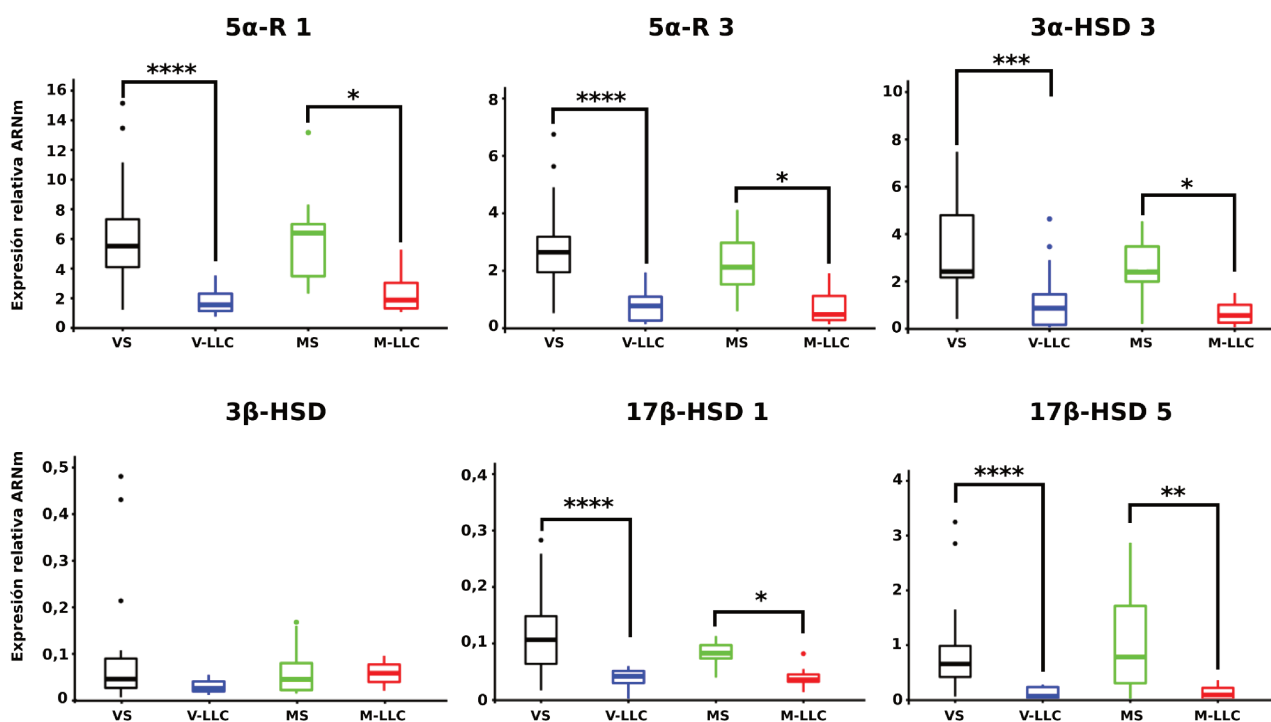


Figura 21. Expresión de ARNm de enzimas esteroidogénicas en individuos sanos (S) y en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) de la misma edad. **** indica diferencias significativas con $p < 0,0001$, *** indica diferencias significativas con $p < 0,001$, ** diferencias significativas con $p < 0,01$, y * diferencias significativas con $p < 0,05$, basados en las pruebas Scheirer Ray Hare. VS: varones sanos; MS: mujeres sanas; V-LLC: varones con LLC; M-LLC: mujeres con LLC; 3β -HSD: 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerasa; 5α -R: 5α reductasa; 3α -HSD: 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17β -HSD: 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*).

Posteriormente estudiamos la expresión de las diferentes variantes de 5α -R 1 (V1, V2 y V3). No se encontraron diferencias entre individuos sanos y pacientes con LLC (Fig. 22).

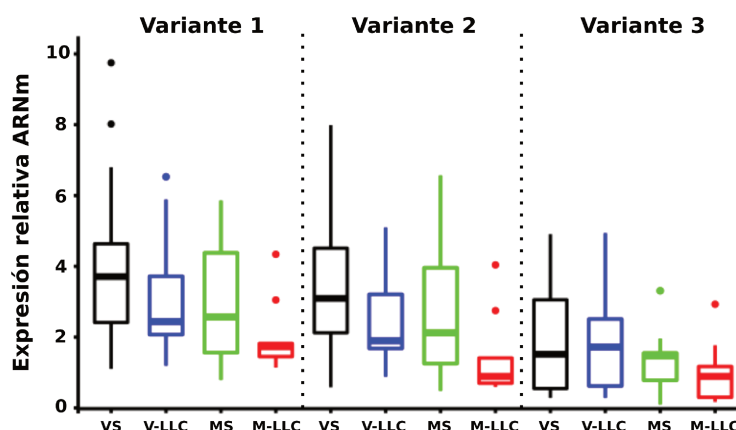


Figura 22. Expresión de ARNm de las variantes de la enzima 5α -R 1 en individuos sanos (S) y en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) de la misma edad. En todos los casos, los p fueron mayores a 0,05, basados en la prueba Scheirer Ray Hare. VS: varones sanos; MS: mujeres sanas; V-LLC: varones con LLC; M-LLC: mujeres con LLC; 5α -R: 5α reductasa. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*).

2.2. Obtención del antígeno para la generación del anticuerpo anti 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa 5

Se confirmó la presencia de la proteína de interés en una de las fracciones inducidas a 37°C , mediante SDS-PAGE (Fig. 23). Se agregó azida sódica al vial de interés (calle B en la Fig. 14), y se prepararon 2 viales de 1,5 mL de proteína, en una concentración de 1,2 mg/mL. Se enviará la proteína a la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV-UNL) para inmunizar a los conejos y obtener el antisuero correspondiente. Una vez generado el antisuero, éste se purificará mediante columnas de afinidad, primero para eliminar anticuerpos anti GST, y luego con columnas específicas conteniendo el antígeno (proteína recombinante de 17 β -HSD 5) para obtener el anticuerpo específico.

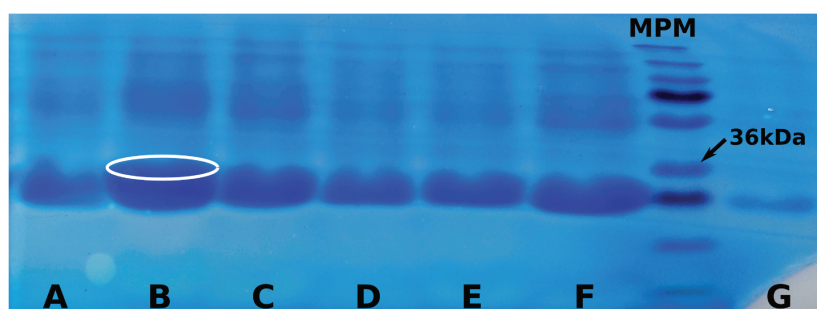


Figura 23. SDS-PAGE para confirmar la proteína de interés para inmunizar a los animales. A, D y E) Proteína recombinante 17 β -HSD 5-GST inducida a 30°C . B, C y F) Proteína recombinante 17 β -HSD 5-GST inducida a 37°C . G) GST pura (peso aproximado: 28kDa). MPM: Marcador de peso molecular. 36kDa: banda del MPM donde se espera encontrar la proteína recombinante (peso aproximado, 37kDa).

2.3. Localización de 5 alfa reductasa 1 y aromatasa

Para evaluar la expresión a nivel de proteína de 5α -R 1 y P450aro, se llevó a cabo un ensayo de inmunocitoquímica (ICQ). Tanto en individuos sanos como en pacientes con LLC, no se observó expresión proteica de P450aro pero si de 5α -R 1 (Fig. 24 A). Esta última se localizó en el citoplasma. En pacientes con LLC, los niveles proteicos de 5α -R 1 fueron menores versus sus respectivos controles (Fig. 24 B).

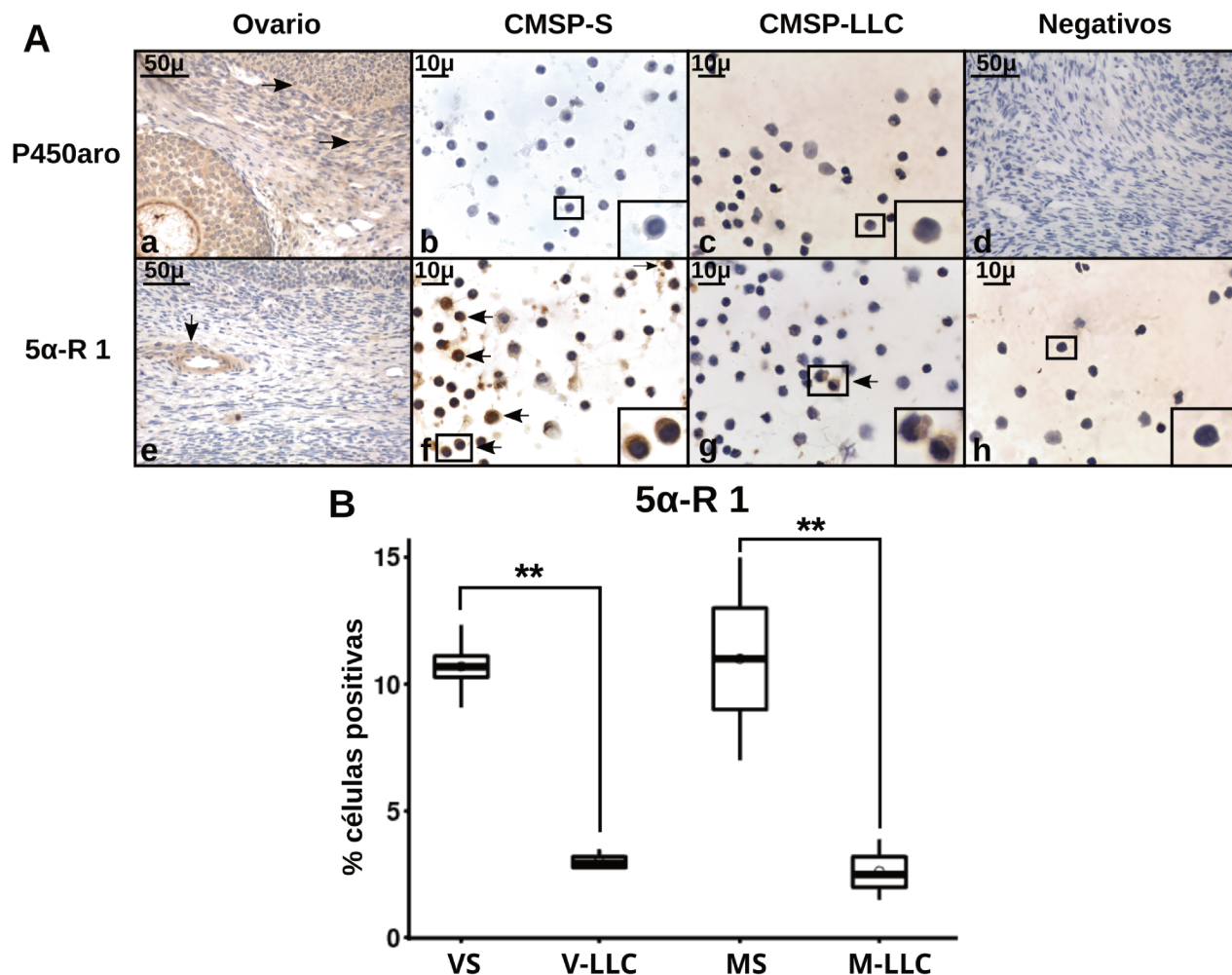


Figura 24. A) Inmunocitoquímica para la detección de P450aro y 5α -R 1 en ovario humano (a, e), células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos sanos (CMSP-S; b, f) y CMSP de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (CMSP-LLC; c, g). Las flechas indican tinción positiva. En el caso de CMSP, en la caja se muestra una imagen a mayor aumento. Se utilizó ovario humano como control positivo (a, e) y negativo (d), y también se utilizaron CMSP como control negativo (h). En éstas, el anticuerpo primario fue pre-absorbido con su antígeno. **B)** Expresión proteica de 5α -R 1 en individuos S y en pacientes con LLC, expresadas en porcentaje de células positivas. ** indica diferencias significativas con $p < 0,01$, basados en la prueba Scheirer Ray Hare. 5α -R 1: 5 α reductasa 1; P450aro: aromatasa; VS: varones sanos; MS: mujeres sanas; V-LLC: varones con LLC; M-LLC: mujeres con LLC. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*).

2.4. Estudio de metilación de promotores de enzimas esteroidogénicas en individuos sanos y en pacientes con LLC

Los resultados del análisis bioinformático de las regiones promotoras de las enzimas esteroidogénicas de interés, detallando los posibles sitios candidatos para que ocurra la metilación del ADN, sitios regulatorios asociados a los mismos y unión de factores de transcripción, se indican en la figura 25.

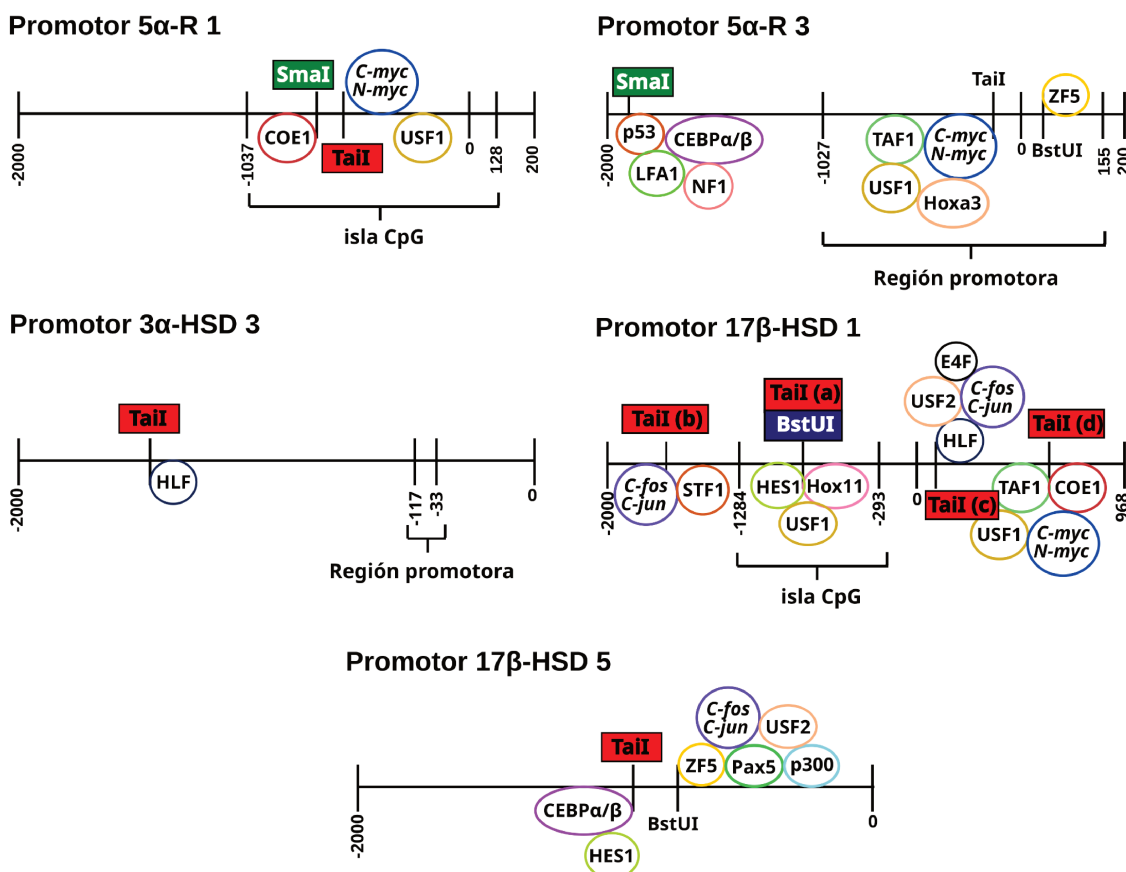


Figura 25. Esquema de regiones promotoras de enzimas esteroidogénicas que podrían sufrir metilación. Los posibles sitios de unión a factores de transcripción se muestran en círculos. Se indican las islas CpG y sitios diana CG estudiados para la digestión con las enzimas de restricción sensibles a metilación TaiI, BstUI y SmaI. Los sitios definitivos que fueron cortados se indican en rectángulos. COE1: factor 1 de células B tempranas; USF1/2: factor de estimulación vía arriba 1/2; CEBP α/β: proteína de unión alfa/beta, potenciadora de CCAAT; LFA1: antígeno 1 asociado a función linfocitaria; NF1: factor nuclear; TAF1: factor de iniciación de la transcripción TFIID subunidad 1; Hoxa3: homeobox A3; ZF5: zinc-finger 5; HLF: factor de leucemia hepático; STF1: factor de transcripción 1 de molécula pequeña; Hox11: homeobox 11; HES1: hairy y potenciador de split-1; Pax5: proteína de caja pareada 5; p300: histona acetiltransferasa p300; 5α-R: 5 α-reductasa; 3α-HSD: 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17β-HSD: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Se encontraron diferencias significativas en los niveles de metilación en 3 de los 5 sitios estudiados para 17β-HSD 1 [BstUI, TaiI(b) and TaiI(d)], y en los sitio TaiI analizados para 5α-R 1 y 17β-HSD 5 (Fig. 26). En las mujeres sanas se evidenciaron menores niveles de metilación que en hombres sanos en el sitio BstUI para 17β-HSD 1. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de metilación en este mismo sitio

entre individuos sanos y pacientes con LLC, sin importar el sexo. En los sitios Tail(b) y Tail(d) para 17 β -HSD 1, y en Tail para 17 β -HSD 5, observamos menores niveles de metilación en MS versus VS, en M-LLC en comparación con V-LLC, y también en M-LLC vs. sus respectivos controles (MS, VS). En el sitio Tail de 5 α -R 1, los valores de metilación fueron mayores en mujeres que en varones con LLC.

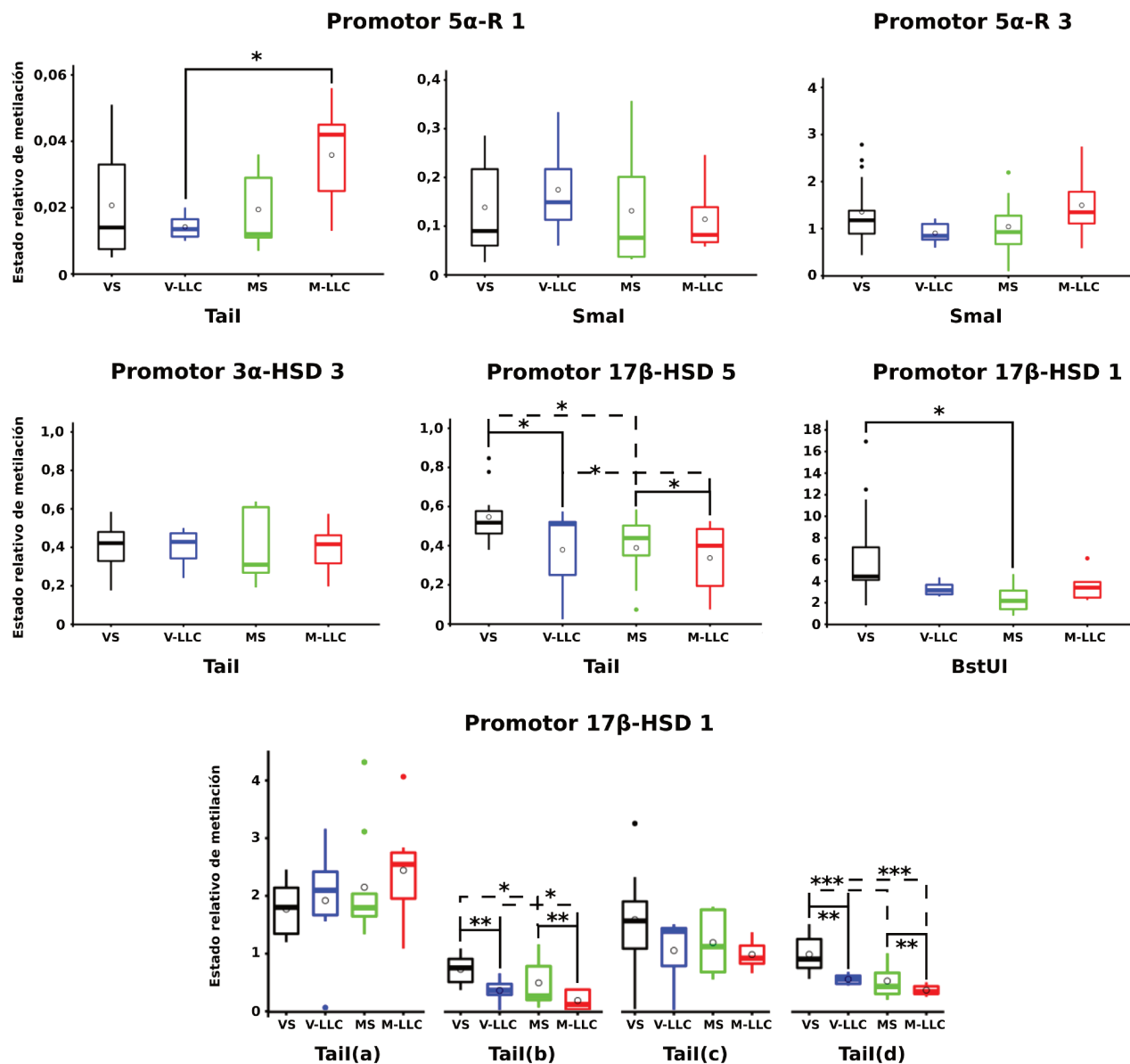


Figura 26. Análisis de metilación de los promotores de las enzimas 5 α -R 1, 5 α -R 3, 3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1 y 17 β -HSD 5 utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación y PCR real time en individuos sanos (S) y pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). El nombre de la enzima de restricción sensible a metilación (Tail, BstUI o SmaI) en cada promotor se refiere a las diferentes posiciones analizadas. *** indica diferencias significativas con $p < 0,001$, ** diferencias significativas con $p < 0,01$, y * diferencias significativas con $p < 0,05$, basados en las pruebas Scheirer Ray Hare (3 α -HSD 3, 17 β -HSD 1 BstUI) y ANOVA (5 α -R 1, 5 α -R 3, 17 β -HSD 1 Tail a,b,c y d, y 17 β -HSD 5). Las líneas punteadas en los sitios 17 β -HSD 1 Tail(b) y Tail(d), y en el sitio 17 β -HSD 5 Tail indican diferencias significativas entre sexos del mismo grupo (VS versus MS; V-LLC versus M-LLC), y las líneas continuas indican diferencias entre grupos (S versus LLC). VS: varones sanos, MS: mujeres sanas; V-LLC: varones con LLC; M-LLC: mujeres con LLC. 5 α -R: 5 α -reductasa; 3 α -HSD: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*). \circ indica los valores de media en distribuciones normales.

2.5. Caracterización de la expresión de ARNm de citoquinas en individuos sanos y en pacientes con LLC

En CMSP de individuos sanos, no se evidenciaron diferencias en la expresión de transcritos de IL 2, IL 4, IL 6 e IL 10 relacionados al sexo, edad o día del ciclo menstrual (Fig. 27). Tampoco se encontraron diferencias entre pacientes con mLLC o uLLC (Fig. 28).

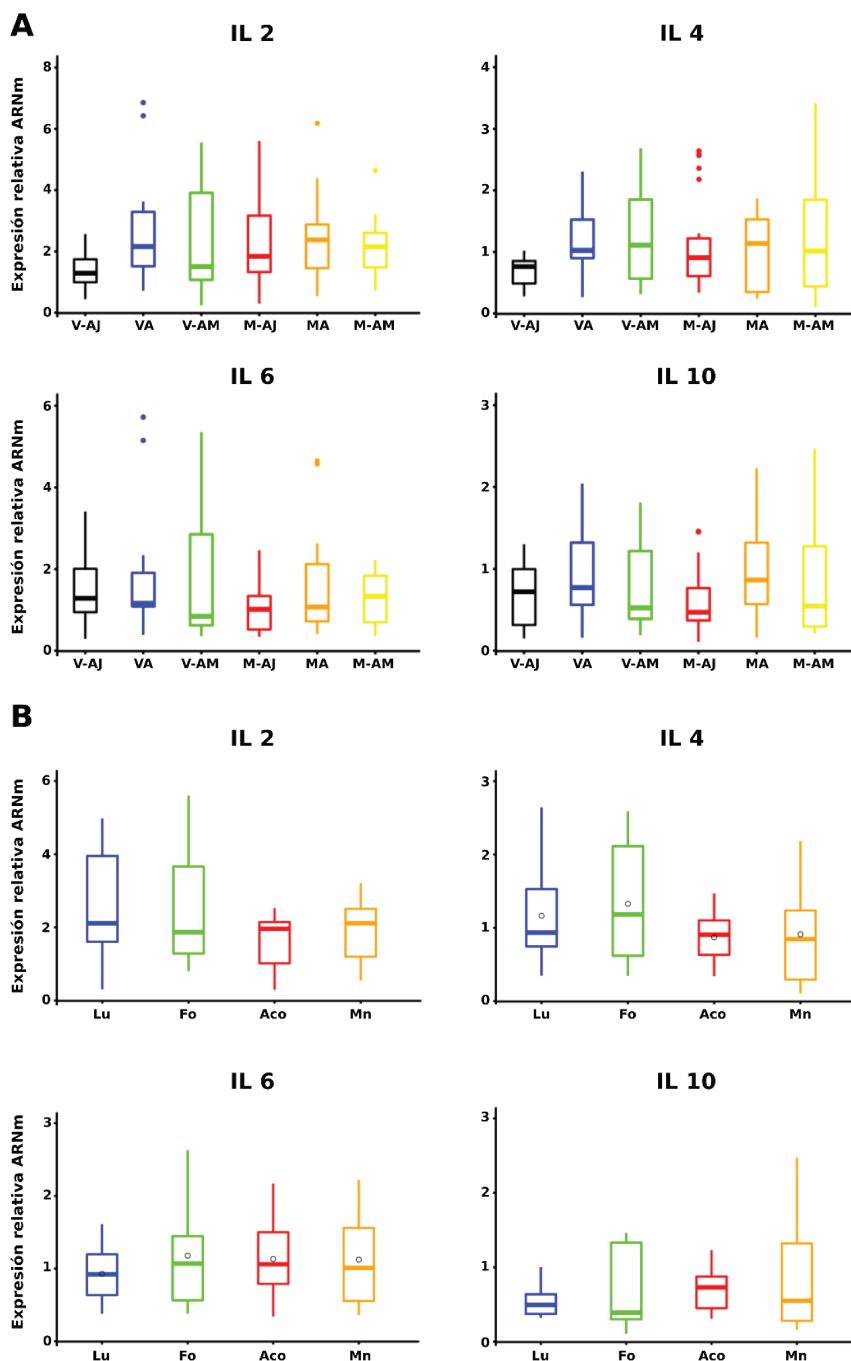


Figura 27. Expresión de ARNm de citoquinas en **A)** individuos sanos en cuanto a sexo y edad, y **B)** en mujeres sanas en cuanto a día de ciclo menstrual y uso de anticonceptivos. En todos los casos, los p fueron mayores a 0,05, basados en las pruebas ANOVA o su variante no paramétrica de acuerdo al caso (Kruskal Wallis o Scheirer Ray Hare). M-AJ: mujeres adultas jóvenes (20 - 39 años); MA: mujeres adultas (40 - 59 años); M-AM: mujeres adultas mayores (> 60 años); V-AJ: varones adultos jóvenes (20 - 39 años); V-A: varones adultos (40 - 59 años); V-AM: varones adultos

mayores (> 60 años); Lu: lútea; Fo: folicular; Aco: uso de anticonceptivos; Mn: menopausia; IL: interleuquina. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*). \circ indica los valores de media en distribuciones normales.

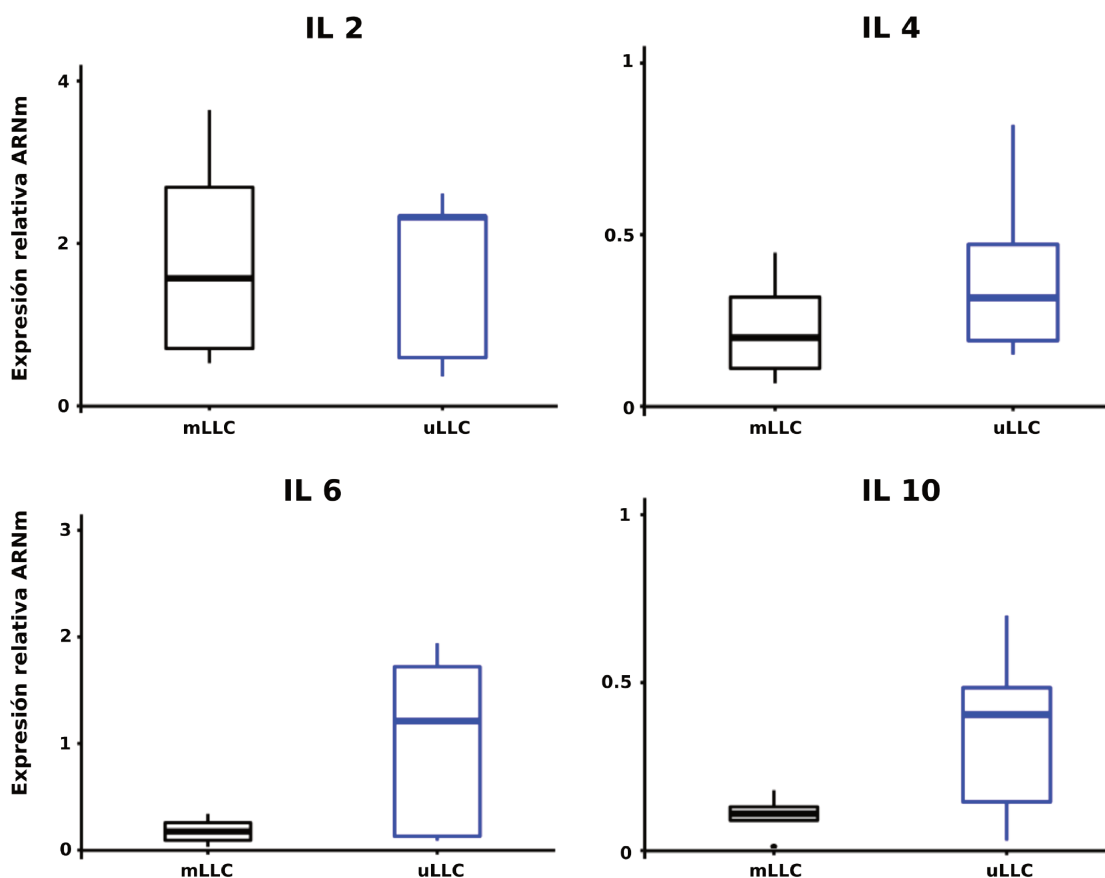


Figura 28. Expresión de ARNm de citoquinas en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) teniendo en cuenta el estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas. mLLC: pacientes con LLC con las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas mutadas; uLLC: pacientes con LLC con las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas no mutadas. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*).

Por otro lado, salvo por el caso de IL 6, los niveles de ARNm de las citoquinas fueron significativamente menores en varones con LLC cuando se compararon con individuos sanos del mismo sexo (Fig. 29).

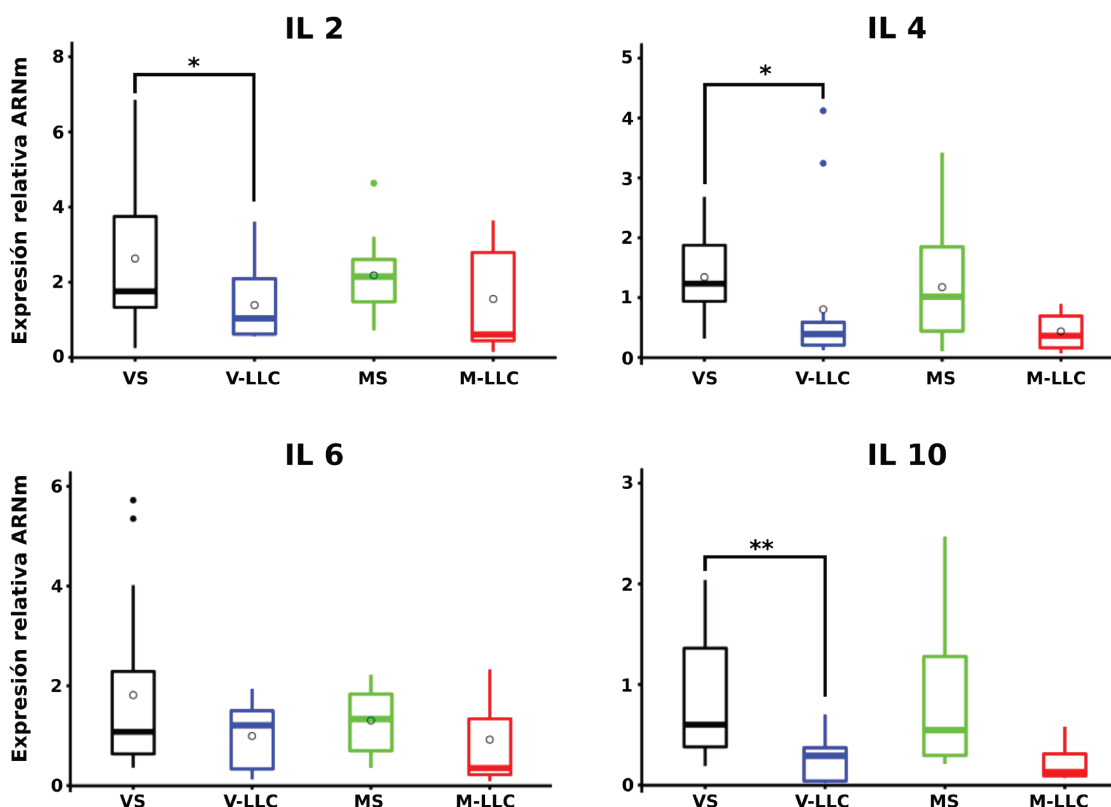


Figura 29. Expresión de ARNm de citoquinas en individuos sanos (S) y en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) de la misma edad. ** indica diferencias significativas con $p < 0,01$ y * diferencias significativas con $p < 0,05$ basados en las pruebas ANOVA o Scheirer Ray Hare, según correspondiera. VS: varones sanos; MS: mujeres sanas; V-LLC: varones con LLC; M-LLC: mujeres con LLC; IL: interleuquina. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*). \circ indica los valores de media en distribuciones normales.

2.6. Correlación entre la expresión del ARNm de enzimas esteroidogénicas y el ARNm de las diferentes citoquinas en individuos sanos y en pacientes con LLC

Para evaluar asociación entre valores de enzimas y citoquinas, sólo se tuvieron en cuenta aquellos metabolitos que dieron diferencias significativas entre sanos y LLC (5α -R1, 5α -R3, 3α -HSD, 17β -HSD 1, 17β -HSD 5, IL 2, IL 4 e IL 10).

Primero, analizamos las posibles asociaciones en los grupos de individuos sanos por rango etario, y en mujeres sanas en fases del ciclo (Fig. 30). Luego, estudiamos las correlaciones comparando los pacientes sanos respecto a los individuos con LLC (Fig. 31).

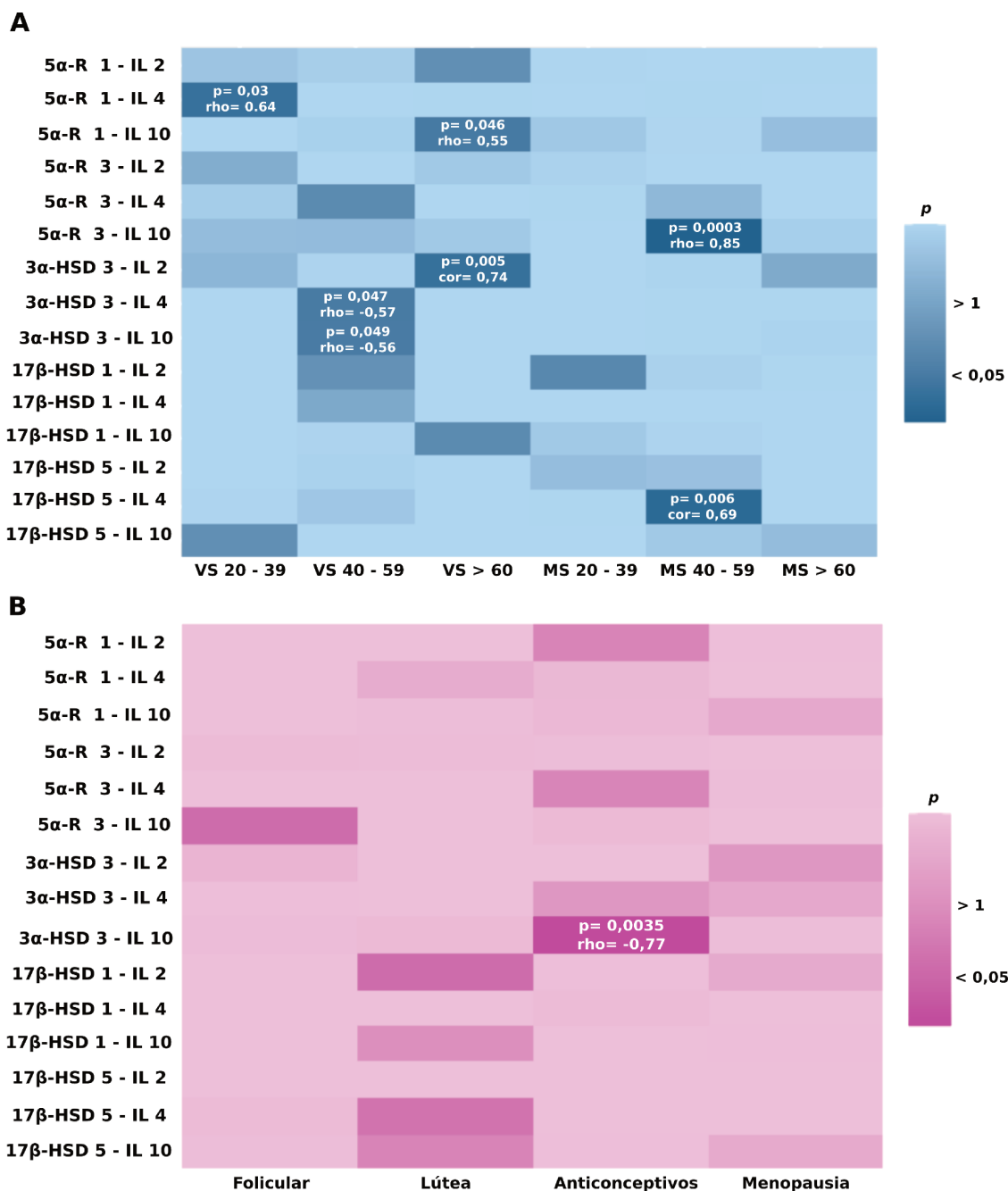


Figura 30. Asociación entre las diferentes enzimas y citoquinas analizadas, en **A**) mujeres y varones sanos (MS y VS, respectivamente), y en **B**) mujeres en distintas fases del ciclo. Se adjuntan los valores de p y correlación de Pearson o Spearman, según corresponda, en los casos en donde los p fueron menores a 0,05. * indica que los p e índices de Spearman y Pearson fueron iguales. IL: interleuquina. 5 α -R: 5 α reductasa; 3 α -HSD: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; IL: interleuquina; rho: índice de correlación de Spearman; cor: índice de correlación de Pearson.

En cuanto a los varones sanos, observamos que existen correlaciones entre la expresión de diferentes enzimas y citoquinas, y que van variando entre los grupos etarios. Sin embargo, la única que puede considerarse significativa es la relación lineal positiva entre 3 α -HSD 3 e IL 2, dado que el índice de correlación de Pearson en este caso es mayor a 0,7 (Fig. 30 A). En cuanto a las mujeres, sólo encontramos asociación entre enzimas y citoquinas en mujeres entre 40 y 59 años, siendo altamente significativa la que

observamos entre 5α -R 3 e IL 10 (Fig. 30 A). En todos los casos los índices de correlación son positivos, lo cual indica que ambos metabolitos se modifican en la misma dirección (ambos aumentan o ambos disminuyen).

Respecto a las fases del ciclo, sólo vimos asociación entre 3α -HSD 3 e IL 10 en mujeres que toman anticonceptivos, siendo ésta altamente significativa. Al ser negativo el índice de correlación, estaría indicando que si la expresión de una aumenta (citoquina o enzima), la otra disminuye (Fig. 30 B).

Continuando con el análisis entre individuos sanos y pacientes con LLC se puede observar en la figura 31 que la mayoría de las correlaciones significativas ($p < 0,05$) ocurrieron en varones con LLC, y en menor proporción, en mujeres con la patología. Sin embargo, las asociaciones significativas con un alto índice de correlación (mayor a 0,7) se evidenciaron en V-LLC entre 5α -R 3 e IL 10, 3α -HSD 3 e IL 10 y 17β -HSD 5 e IL 4, y en M-LLC entre 5α -R 3 e IL 10.

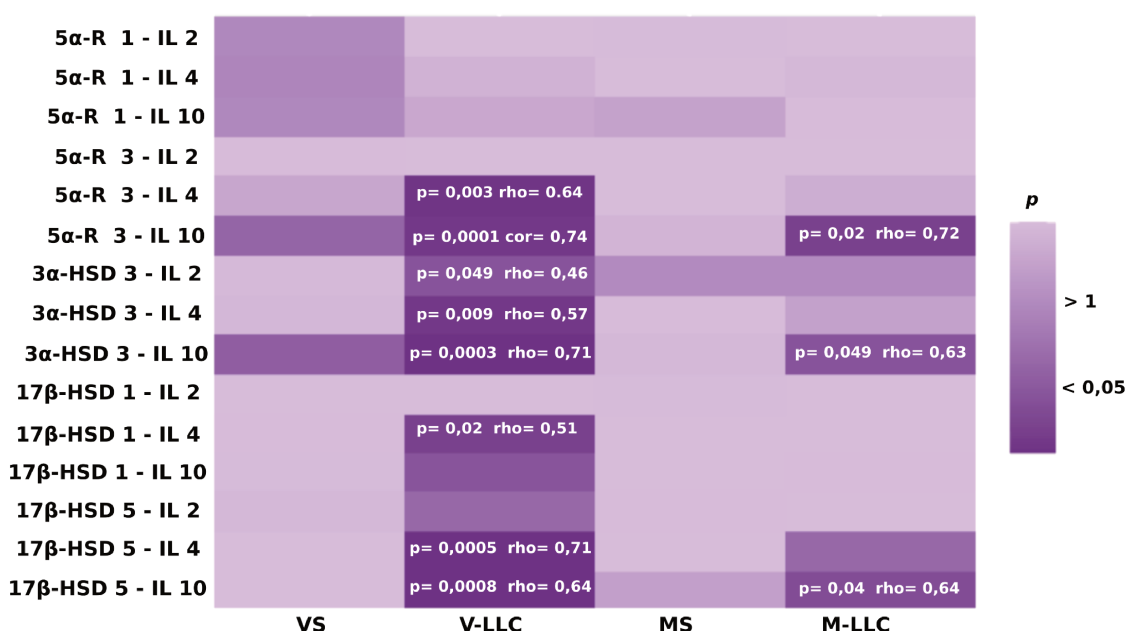


Figura 31. Asociación entre las diferentes enzimas y citoquinas analizadas, en individuos sanos (S) y en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). Se adjuntan los valores de p y correlación de Pearson o Spearman, según corresponda, en los casos en donde los p fueron menores a 0,05. VS: varones sanos; MS: mujeres sanas; V-LLC: varones con LLC; M-LLC: mujeres con LLC; IL: interleuquina. 5α -R: 5α reductasa; 3α -HSD: 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17β -HSD: 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; IL: interleuquina; ρ : índice de correlación de Spearman; ρ : índice de correlación de Pearson.

3. Estudio de CMSP en cultivo

Para este análisis, sólo se utilizaron CMSP de varones, tanto sanos como con LLC. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en CMSP circulantes, sólo se diseñaron experimentos para evaluar la expresión de 5α -R 1, 5α -R 3, IL 2, 4 y 10.

3.1. Caracterización de la expresión de ARNm de 5 α -R 1 y 3 en individuos sanos y en pacientes con LLC

Como observamos en la figura 32, para el caso de 5 α -R 1 en VS, el agregado de PWM solo, PWM + testosterona o PWM + dutasteride y luego testosterona, aumenta la expresión de ARNm de la enzima respecto al control, aunque las diferencias no son significativas entre los tratamientos. En cuanto a 5 α -R 3 en VS, si bien se evidenció una disminución en la expresión del mensajero de esta enzima al agregar sólo testosterona, no hay diferencias significativas entre tratamientos.

Analizando el caso de varones con LLC, observamos que la expresión del mensajero de ambas enzimas es significativamente menor que en VS, en todas las condiciones de cultivo (Fig. 32).

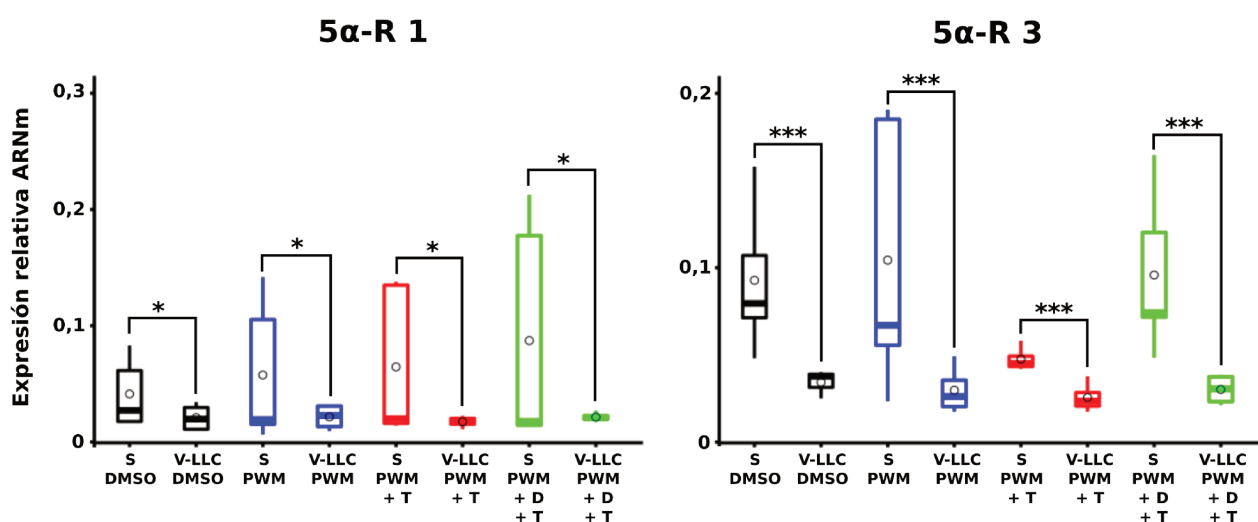


Figura 32. Expresión de ARNm de 5 α -R 1 y 3 en varones sanos (VS) y en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (V-LLC) de la misma edad, en distintas condiciones de cultivo. *** indica diferencias significativas con $p < 0,001$, ** diferencias significativas con $p < 0,01$ y * diferencias significativas con $p < 0,05$ basados en las pruebas ANOVA. 5 α -R: 5 α reductasa; DMSO: dimetilsulfóxido; PWM: mitógeno de la fitolaca; T: testosterona; D: dutasteride. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*oulliers*). \circ indica los valores de media en distribuciones normales.

3.2. Caracterización de la expresión de ARNm de IL 2, IL 4 e IL 10 en individuos sanos y en pacientes con LLC

La expresión del mensajero de IL 2 incrementó significativamente en ambos grupos (VS y V-LLC) en todas las condiciones de cultivo respecto al control, sin haber diferencias entre sanos y LLC. Si bien evidenciamos un incremento más notorio en la expresión de ARNm de IL 4 en VS en todas las condiciones de cultivo respecto al control, esas diferencias no son significativas al compararlas con V-LLC. Respecto al mensajero

de IL 10, no hay diferencias significativas entre grupos (VS - V-LLC) ni entre condiciones de cultivo (Fig. 33).

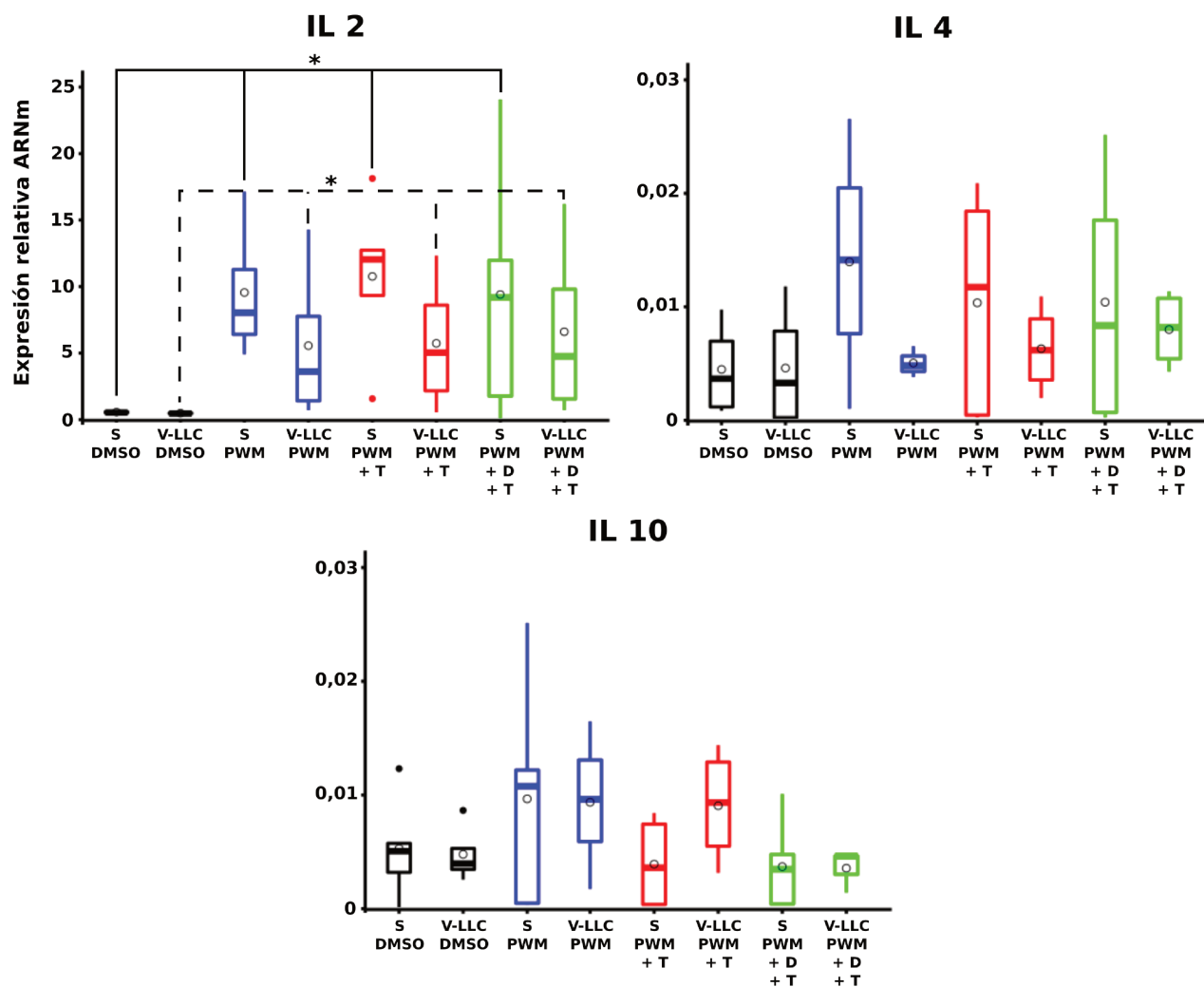


Figura 33. Expresión de ARNm de citoquinas en varones sanos (VS) y en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (V-LLC) de la misma edad, en distintas condiciones de cultivo. La línea punteada indica diferencias entre condiciones de cultivo en V-LLC, y la línea continua indica diferencias entre condiciones de cultivo en VS. * indica diferencias significativas con $p < 0,05$ basados en las pruebas ANOVA. IL: interleuquina; DMSO: dimetilsulfóxido; PWM: mitógeno de la fitolaca; T: testosterona; D: dutasteride. Cada caja representa los valores entre los percentilos 25 y 75. La línea media en el cuerpo de la caja representa la mediana de las mediciones. Los bigotes que se extienden hacia arriba y abajo de cada caja representan el valor máximo y mínimo, respectivamente. Los puntos aislados representan los valores atípicos (*outliers*). \circ indica los valores de media en distribuciones normales.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Determinación de los niveles séricos de testosterona, estradiol y progesterona

La LLC es una patología que presenta una mayor incidencia en varones que en mujeres, y hay autores que sugieren que esto podría deberse a cambios en los niveles hormonales (Allain et al., 2018). Debido a ello, decidimos primero evaluar los niveles circulantes de testosterona, estradiol y progesterona. Allain y col. (2018) encontraron que en varones, los niveles séricos de andrógenos eran menores en individuos con LLC que en pacientes sanos, lo que contradice lo mencionado previamente respecto de que los andrógenos promueven el desarrollo cancerígeno al ser inmunosupresores (Bhatia et al., 2014; Bupp & Jorgensen, 2018; Furman et al., 2014; Morales-Montor et al., 2011). Además, en el trabajo de Allain y col. (2018) también se observó que niveles elevados de testosterona, DHT y ciertos metabolitos de los estrógenos estaban asociados con una mejor supervivencia en mujeres con LLC. En nuestro trabajo, los niveles séricos de testosterona, P4 y E2 en mujeres y varones con LLC fueron los esperados para su edad (Greenblatt et al., 1976). Encontramos valores más bajos para todas las hormonas estudiadas en mujeres, ya sean sanas o con LLC, lo que difiere a lo evidenciado por Allain y col. (2018), respecto a los niveles de testosterona. Estas discrepancias podrían deberse a la medición de diferentes metabolitos, o al uso de distintas técnicas de cuantificación. Tal vez el análisis de metabolitos finales de las vías estrogénicas y androgénicas, o de algún precursor, como la DHEA, nos podría brindar más información respecto al posible desbalance hormonal sérico en pacientes con LLC. Dado que no existe un consenso respecto a los valores esperados de hormonas circulantes en pacientes con LLC, y teniendo en cuenta los resultados de nuestras determinaciones, no encontramos evidencia que respalde lo establecido por otros autores de que variaciones en los niveles de hormonas séricas serían las causantes del dimorfismo sexual observado en LLC.

2. Caracterización de la expresión de ARNm de enzimas esteroidogénicas y localización de 5 alfa reductasa 1 y aromatasas en CMSP de individuos sanos y de pacientes con LLC

En células mononucleares de individuos sanos, diversos autores han demostrado la expresión de ARNm de muchas enzimas de la vía esteroidogénica, como P450aro, 3 α -HSD 3, 3 β -HSD 1 y 2, 5 α -R 1, y distintas variantes de 17 β -HSD (isoenzimas 1, 3, 4, 5, 7 y 10), aunque con ciertas discrepancias respecto a la expresión de P450aro y 3 α -HSD 3 (F. Hammer et al., 2005; Hoppe et al., 2006; Pignatti et al., 2012; Schmidt et al., 2000; Vottero et al., 1998, 2006; Zhou et al., 1998). Sin embargo, no existe evidencia que relacione la presencia de las enzimas esteroidogénicas en células inmunitarias con la función celular, como supervivencia, proliferación, diferenciación, entre otras. En este trabajo demostramos la expresión de ARNm de P450scc, P45017 α , 3 β -HSD, 5 α -R 1, 2 y 3, 3 α -HSD 3, y 17 β -HSD 1, 3 y 5 en CMSP de individuos sanos, tanto mujeres como varones, sin diferencias respecto a sexo, edad o estadio del ciclo en mujeres. Es muy probable que en estas células se encuentren activas la vía de síntesis de P4, las vías clásica y alternativa de síntesis de andrógenos y la producción de E2 a partir de E1 extracelular (Fig. 34).

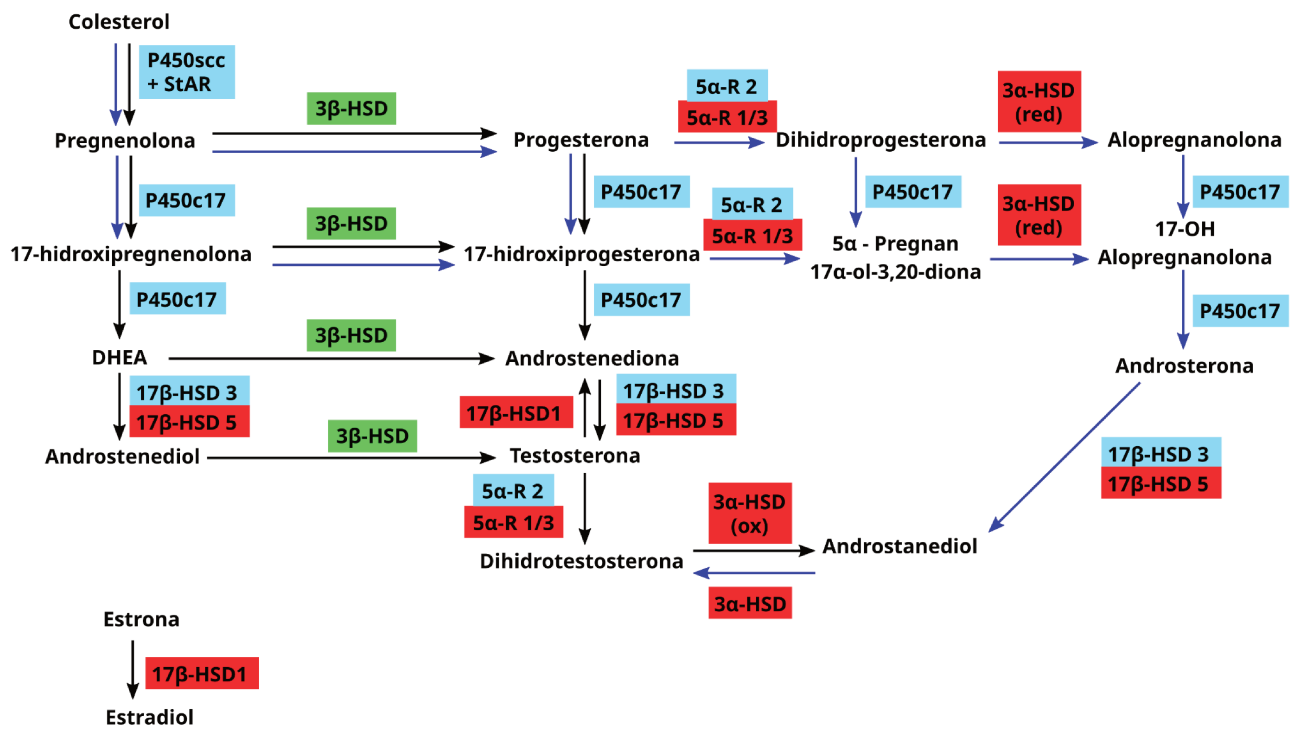


Figura 34. Posible mecanismo esteroidogénico en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos sanos (S) y pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC). Las flechas negras indican la vía tradicional de síntesis de andrógenos, y las azules la vía alternativa. En celeste se muestran las enzimas presentes tanto en S como en LLC, pero que no se pudieron cuantificar debido a su baja expresión. En verde se enseñan las enzimas cuantificables tanto en S como en LLC que no presentan diferencias significativas entre ambos grupos. En rojo se muestran las enzimas presentes en ambos grupos, y cuya expresión fue menor en LLC versus S. Dadas las enzimas presentes en S, en este grupo parecen estar activas la vía de síntesis de P4, las vías clásica y alternativa de síntesis de andrógenos y la producción de E2 a partir de E1 extracelular. En cambio, en LLC, la producción de E2 a partir de E1 extracelular y la producción e inactivación de andrógenos se encontrarían alteradas.

En concordancia con otros autores, no evidenciamos expresión proteica ni de ARNm de P450aro, ni ARNm de 3 α -HSD 1 (F. Hammer et al., 2005; Zhou et al., 1998), tanto en individuos sanos como en pacientes con LLC. La ausencia de P450aro implica que las vías de producción de E1 a partir de androstenediona y de E2 a partir de testosterona no están activas en CMSP. La ausencia de 3 α -HSD 1 indica que la inactivación de andrógenos a través de la reducción de 3 cetoesteroides a 3 α hidroxisteroides (Stayrook et al., 2008) no es una vía posible en este tipo celular.

En cuanto a la actividad enzimática en individuos sanos, diversos autores han demostrado que la presencia de ARNm de 5 α -R 1 y 17 β -HSD 5 en células mononucleares está directamente asociada con la funcionalidad de la enzima (F. Hammer et al., 2005; Zhou et al., 1998). Nosotros no hemos podido evaluar actividad enzimática debido a que no poseemos técnicas lo suficientemente sensibles y específicas. Sin embargo, pudimos demostrar la presencia de 5 α -R 1 a nivel proteico en células mononucleares.

Es sabido que en LLC están afectadas las funciones normales de linfocitos T y B (Vlachonikola et al., 2021). Se desconoce si estas células podrían tener la maquinaria necesaria para la síntesis de esteroides, o cómo ello podría influir sobre la patología. Esto, junto al hecho de no haber encontrado diferencias en las hormonas

séricas entre individuos sanos y pacientes con LLC, es lo que nos llevó a enfocarnos principalmente en los mecanismos de síntesis de esteroides en esta patología.

En este trabajo demostramos la presencia del ARNm de la mayoría de las enzimas estudiadas en CMSP de pacientes con LLC, sin diferencias entre pacientes con la variante mutada de la no mutada, lo cual podría indicar que las vías estudiadas no están asociadas a variaciones del estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas en individuos con la patología. Por otro lado, se observó que la expresión del ARNm de 5α -R 1, 5α -R 3, 3α -HSD 3, 17β -HSD 1 y 17β -HSD 5 era significativamente menor en pacientes con LLC que lo observado en individuos sanos (Fig. 34). Para el caso de 5α -R 1, este cambio no fue a expensas de alguna de las 3 variantes descritas, siendo la fracción total de la enzima responsable de las diferencias encontradas.

Las enzimas estudiadas son importantes en la síntesis de E2 y en el metabolismo de la testosterona (Fig. 1). La función principal de las enzimas de la familia de las 5α reductasas es la conversión de testosterona a DHT (Azzouni et al., 2012). La 3α -HSD 3 humana tiene un rol clave en la inactivación de DHT (Zhang et al., 2014). La función más importante de la 17β -HSD1 es la síntesis de E2 a partir de E1, y en menor medida, la reducción de androstenediona a testosterona (Marchais-Oberwinkler et al., 2011). Estudios recientes también demostraron que la 17β -HSD1 puede inactivar la DHT oxidándola a androstenediona (He et al., 2016). La 17β -HSD 5 participa en la síntesis de testosterona (Qin & Rosenfield, 2005). Todo ello indicaría la posibilidad de que CMSP de individuos con LLC posean una menor actividad asociada al metabolismo de esteroides. Además, encontramos disminuidos los niveles proteicos de 5α -R 1 en CMSP de individuos con LLC, lo que concuerda con lo observado a nivel de ARNm y provee mayor evidencia respecto a una posible alteración en la vía androgénica (Fig. 34). Meyers y col (2009) analizaron diferentes transcritos, incluido el de 5α -R 1, y cómo su expresión se modificó en células B y T normales y con LLC luego del tratamiento con inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE, del inglés, *phosphodiesterase*). Uno de esos inhibidores, el PDE4, induce apoptosis de células B en LLC. En el análisis del conjunto de datos de los transcritos, luego del tratamiento con PDE4, el ARNm de 5α -R 1 se vio *up*-regulado 1,3 veces en LLC respecto a individuos sanos. Estos resultados demuestran que el tratamiento modifica la expresión de ARNm de 5α -R 1 en la patología, proporcionando nueva evidencia respecto a la posible importancia de las vías metabólicas asociadas a 5α -R 1 en LLC.

En base a lo observado en células mononucleares circulantes, quisimos evaluar el comportamiento de las mismas en condiciones de cultivo. Se sabe que la criopreservación afecta de manera diferencial la viabilidad y funcionalidad de CMSP, y se ha visto que en los más afectados son los linfocitos B (Reimann et al., 2000). Sin embargo, esto no se traduce en alteraciones significativas en cuanto a las respuestas proliferativas a antígenos o mitógenos (Mallone et al., 2011). Por otro lado, si bien las células B malignas de LLC presentan una mayor sobrevida *in vivo*, éstas tienden a morir por apoptosis en cultivo (Ghamlouch et al., 2013), no así cuando se cultivan junto al resto de la CMSP (Gamberale et al., 2001). Nuestro objetivo era ver si la expresión de ARNm de 5α -R 1 y 5α -R 3 se modificaba, tanto en individuos sanos como en pacientes con LLC, con el agregado de estimulantes o inhibidores específicos de 5α R.

En individuos sanos el agregado de testosterona y mitógeno de la fitolaca incrementó la expresión de ARNm de 5 α -R 1 respecto al control negativo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto no ocurrió en LLC, donde se observó una expresión similar en todas las condiciones de cultivo, incluso en el control negativo, y siempre fue menor en LLC al comparar con pacientes sanos. En el caso de 5 α -R 3, tanto en individuos sanos como en LLC, las CMSP parecen comportarse de manera similar con todos los tratamientos, salvo con testosterona, que no aumenta de manera significativa la expresión de ARNm de la enzima en pacientes sanos. Sin embargo, al comparar los valores de ARNm entre individuos con y sin LLC, la expresión fue significativamente menor en los individuos con la patología, nuevamente comportándose como las células en circulación. Esto indicaría que ninguno de los estímulos utilizados activa la expresión de 5 α R, ya que en todas las condiciones de cultivo para LLC, los resultados de expresión de ARNm fueron similares al control negativo. Esto refuerza nuestras observaciones de que existen alteraciones en la vía esteroidogénica dentro de CMSP en la patología. Otra posible explicación podría estar asociada a la ausencia o a un incorrecto funcionamiento del RA en LLC.

Un resultado obtenido que llamó la atención es la mayor expresión de ARNm de 5 α -R 1 y 3 en CMSP de individuos sanos cultivadas en presencia del inhibidor enzimático. Mediante estudios de castración y agregado de inhibidores de la actividad enzimática, se ha demostrado que en próstata de rata, es la DHT, y no la testosterona, quien incrementa la expresión y actividad de la 5 α -R. Se estableció así un mecanismo inusual de regulación “*feed-forward*”, donde el producto de una enzima regula positivamente su expresión génica, y no el sustrato (Russell & Wilson, 1994). Por otro lado, estudios recientes sobre los efectos de la testosterona y DHT en distintas líneas celulares humanas demostraron que ambos andrógenos regulan los niveles de ARNm de las isoenzimas 5 α -R de manera particular para cada célula, y que esta regulación ocurre a través del RA (Audet-Walsh et al., 2017; Li et al., 2011). Nuestros resultados sugieren que en CMSP sanas, la testosterona actuaría como regulador positivo de la actividad enzimática.

3. Estudio de metilación de promotores de enzimas esteroidogénicas en CMSP de individuos sanos y de pacientes con LLC

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas entre individuos sanos y pacientes con LLC en la expresión de ARNm de algunas enzimas esteroidogénicas, continuamos investigando si esas diferencias eran debidas a mecanismos epigenéticos de regulación relacionados a metilación de regiones promotoras, o al uso de promotores alternativos de diferente potencia transcripcional.

A diferencia de otros tumores, la LLC evidencia una estabilidad epigenética global entre pacientes y a lo largo del transcurso de la enfermedad, aún estando el paciente bajo tratamiento (Cahill & Rosenquist, 2013). Cuando esa estabilidad se ve alterada, se observa un peor pronóstico de la patología, un menor tiempo para iniciar el tratamiento, y una alta diversificación genética subclonal (Oakes et al., 2014). Diversos estudios han demostrado que, en comparación con individuos sanos, el ADN de pacientes con LLC está hipometilado (Martín-Subero et al., 2013; M. K. Yu, 2006). Actualmente, la hipometilación de promotores que activan

proto oncogenes y la hipermetilación de promotores que inactivan genes supresores tumorales son efectos muy estudiados en LLC (Kulis et al., 2012; Kushwaha et al., 2016). En esta patología, en los casos más agresivos se observan bajos niveles de metilación en secuencias repetitivas, como LINE 1 (del inglés, *Long interspersed nuclear element 1*) y SAT α (del inglés, *Satellite alpha*) (Florea et al., 2011). Además, también se ha observado que el gen antiapoptótico BCL 2 se encuentra hipometilado en LLC, lo que conlleva a una mayor expresión de la proteína (Cahill & Rosenquist, 2013). A su vez, se ha establecido que los patrones de metilación difieren entre hombres y mujeres con LLC. Lin y col. (2019) observaron que, tanto en autosomas como en el cromosoma X, había regiones diferencialmente metiladas entre hombres y mujeres con LLC, principalmente en genes relacionados con el desarrollo de la enfermedad. Ellos postulan que esas diferencias en los estados de metilación podrían contribuir al pronóstico diferencial asociado al sexo que se observa en esta patología.

En este trabajo encontramos menores niveles de metilación en LLC respecto a individuos sanos en dos regiones diferentes del promotor de 17 β -HSD 1 [Tail(b) y Tail(d)], y en el sitio Tail del promotor de 17 β -HSD 5, y esta diferencia fue más notoria en mujeres con la enfermedad. Sin embargo, los valores de ARNm de esas enzimas eran menores en LLC que en pacientes sanos, afectando de igual manera a varones y mujeres con la patología. La ausencia de correlación entre ARNm y estado de metilación puede deberse a que la metilación de estos sitios podría no estar actuando como un mecanismo de regulación de expresión del ARNm, debido a que las zonas estudiadas podrían no ser promotores activos. Diversos autores han evidenciado una baja correlación entre metilación del ADN y niveles de expresión génica, sugiriendo que este mecanismo de reprogramación epigenética no contribuye al desarrollo del cáncer mediante la inhibición directa de la expresión génica (Kulis et al., 2012; Moarii et al., 2015). Por otro lado, podríamos estar evidenciando cambios en la regulación de promotores que aún no afectan la expresión de ARNm, pero podrían hacerlo más adelante. Además, la técnica utilizada para evaluar metilación presenta ciertas limitaciones que podrían estar enmascarando regiones que sí evidencien alteraciones significativas en los patrones de metilación. Estas limitaciones incluyen la selección de pares de oligonucleótidos termodinámicamente estables, debido a que no todas las regiones del promotor son apropiadas para el estudio, y la selección de una región dentro del área de interés donde la enzima de restricción a utilizar no realice muchos cortes en simultáneo, ya que si este es el caso, no sabríamos diferenciar el sitio verdaderamente afectado.

De igual modo, los niveles de metilación de algunos sitios de los promotores de 17 β -HSD 1 y 17 β -HSD 5 fueron significativamente menores en mujeres con LLC respecto a varones con la enfermedad, si bien entre ellos no encontramos diferencias en la expresión del ARNm de estas enzimas. Esto sugiere que, tal como se observó para estas enzimas al comparar individuos sanos y pacientes con LLC, los mecanismos de metilación no estarían influyendo en la expresión del ARNm.

Al analizar el sitio Tail del promotor de 5 α -R 1, encontramos que en mujeres con LLC observamos mayores niveles de metilación que en varones con la enfermedad, y que sus respectivos controles, pese a que con estos últimos no hubo diferencias estadísticamente significativas, lo cual coincide con la menor expresión de

ARNm y proteína observada en este grupo. En cambio en varones con la patología, no parece ser que el sitio TaiI del promotor de 5 α -R 1 esté relacionado con la expresión de ARNm de la enzima, ya que tanto los niveles de metilación como de expresión de mensajero son bajos. La hipermetilación en LLC está asociada con el desarrollo y pronóstico de la enfermedad. Elevados niveles de metilación en regiones del promotor de E cadherina, un conocido supresor de metástasis tumoral, y de hTERT (del inglés, *human telomerase reverse transcriptase*), importante en la prevención de la degradación del ADN luego de la replicación, están asociados a un peor pronóstico en LLC. Por otro lado, la hipermetilación en el promotor de TWIST 2, factor de transcripción silenciador de p53, y de una región del promotor de Zap 70, son marcadores de pronóstico favorable, presentes en la mayoría de los casos de mLLC (Cahill & Rosenquist, 2013). Aún queda por establecer el valor pronóstico que posee la hipermetilación de este sitio particular en el promotor de 5 α -R 1 en mujeres con LLC, pero dado que solo se evidenció en ese grupo particular, podríamos especular que formaría parte de los mecanismos regulatorios de control de expresión enzimática asociados al pronóstico diferencial, y más favorable, evidenciado en mujeres con LLC.

4. Caracterización de la expresión de ARNm de citoquinas, y correlación de la misma con la expresión de ARNm de enzimas esteroidogénicas en CMSP de individuos sanos y de pacientes con LLC

Como ya se mencionó, las funciones normales de las células T y B se ven alteradas en LLC, lo que incluye la producción de citoquinas. En cultivos, las células B-LLC mueren rápidamente por apoptosis. Se ha visto que ciertas citoquinas pueden prolongar la sobrevivencia de esas células in vitro, y que muchas poseen efecto antiapoptótico. Se ha demostrado que cuando se agregan por separado, las IL 2, 4, 6, 10, 12, 15 y 21 mejoran la sobrevivencia de B-LLC moderadamente, y en conjunto, incrementan significativamente su tiempo de vida (Allegra et al., 2020; Ghamlouch et al., 2013).

La IL 2 es producida principalmente por linfocitos T CD4+ luego de un estímulo antigénico, y actúa estimulando a los linfocitos B para que se diferencien a células productoras de anticuerpos (Tigges et al., 1989). Esto lo hace a través de la unión a su receptor específico, ubicado en la superficie celular (IL 2R). En LLC, se ha demostrado la presencia de este receptor en células leucémicas, así como también niveles elevados del receptor soluble (IL 2RS). Se cree que esto genera que las células leucémicas, debido a su abundancia y a la presencia de IL 2RS, secuestren la mayoría de la IL2 circulante, afectando la actividad de esta citoquina sobre el resto de las células diana en la patología (Orsini et al., 2000). Está demostrado que la IL 2 es una citoquina pro tumoral, ya que estimula el crecimiento y disminuye la apoptosis en LLC, pero también se ha observado que el número de células T productoras de IL 2 se encuentra reducido en LLC (Allegra et al., 2020). La IL 4 es producida por linfocitos T, y actúa como factor de crecimiento sobre células B (Orsini et al., 2000). En LLC, se ha demostrado una mayor expresión génica de IL 4 en células B, así como también mayores niveles circulantes de esta citoquina, y que participa en el mecanismo anti apoptótico de las células tumorales (Allegra et al., 2020). Sin embargo, otros estudios han demostrado bajos niveles

intracelulares de IL 4, y elevados niveles séricos (Işıksaçan et al., 2016). Estos resultados discordantes podrían deberse a las distintas metodologías utilizadas para evaluar citoquinas, ya sea niveles séricos o estudio de ARNm, o a que se analizan distintas poblaciones (CMSP, células B, células T). En nuestro trabajo, no evidenciamos diferencias en los niveles de IL 2 e IL 4 entre pacientes mLLC y uLLC. Por otro lado, encontramos disminuidas estas citoquinas sólo en CMSP de varones con LLC al compararlas con su respectivo control. Ello podría deberse a una menor actividad de las células T en estos individuos, la cual podría estar influyendo en la presentación diferencial de la patología en hombres y mujeres.

La IL 6 induce la proliferación y diferenciación de células B y T. Es producida principalmente por monocitos / macrófagos, pero también por linfocitos T y B (Rego et al., 2011). Hay resultados discordantes en cuanto a los niveles de IL 6 en LLC, ya que si bien algunos demuestran que esta citoquina se encuentra aumentada en la patología (Allegra et al., 2020), otros la encuentra disminuida (Antosz et al., 2015; Z. Yu et al., 2008). Nuevamente, esto podría deberse a las distintas metodologías utilizadas y poblaciones estudiadas. En nuestro trabajo, no encontramos diferencias en los niveles de ARNm de esta citoquina entre mLLC y uLLC, ni entre individuos sanos y pacientes con LLC.

La IL 10 es producida por macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y diversas subpoblaciones de linfocitos T. Regula la actividad de células T y NK de forma indirecta, inhibiendo monocitos y macrófagos y la síntesis de sus citoquinas (Couper et al., 2008). Existen estudios contradictorios respecto a la acción de la IL 10 en LLC, ya que algunos demuestran que esta citoquina induce la apoptosis, mientras que otros sugieren que la inhibe (Djurdjevic et al., 2009). También hay resultados discordantes respecto de los niveles de IL 10 observados en LLC, ya que muchos encuentran que esta citoquina está disminuida en la patología, mientras que otros establecen que los altos niveles de la misma están asociados a estadios avanzados de la enfermedad (Orsini et al., 2000). Nosotros no encontramos diferencias en la expresión del mensajero de IL 10 entre uLLC y mLLC, pero si evidenciamos una menor expresión de ARNm de esta citoquina en CMSP sólo en varones con LLC. Dado que esta citoquina es conocida por limitar la producción de interleuquinas proinflamatorias e inhibir la proliferación de células T (Couper et al., 2008), la disminución de la misma podría conducir a una alteración en la comunicación entre las células del microambiente tumoral en LLC, promoviendo un estado proinflamatorio y anti apoptótico. Estos resultados, junto con los observados para IL 2 e IL 4, refuerzan la idea de una alteración diferencial en varones con la patología.

Diversos estudios demuestran que la criopreservación modifica la expresión de citoquinas. En general, se observa un aumento de citoquinas pro inflamatorias en CMSP criopreservadas (Haider et al., 2022), y disminución de IL 4 (Kvarnström et al., 2004). En nuestro trabajo, en condiciones de cultivo, observamos que cualquier tratamiento incrementa los niveles de ARNm de IL 2, tanto en CMSP de pacientes sanos como con LLC, con diferencias significativas entre sus respectivos controles negativos. Si bien parece que ese aumento es menor en LLC, no hay diferencias estadísticamente significativas entre individuos sanos o con la patología. Este aumento de IL 2 lleva a pensar que las células, sanas o con LLC, responden a estímulos proliferativos, solo que estos no son suficientes para revertir la menor expresión de ARNm de enzimas de la vía esteroideogénica observados en la patología. En cuanto a los valores de IL 4 en cultivo, si bien

observamos mayor expresión de ARNm en los distintos tratamientos respecto al control negativo, especialmente en individuos sanos, no encontramos diferencias significativas entre éstos y pacientes con LLC, ni entre condiciones de cultivo.

Con estos resultados, quisimos evaluar si había alguna asociación entre la menor expresión del ARNm de las enzimas esteroidogénicas en LLC con la disminución de la expresión de transcritos de interleuquinas observada en la patología, y comparar con lo que ocurre en individuos sanos. En los varones sanos agrupados en rangos etarios, se evidenciaron correlaciones diferenciales entre enzimas y citoquinas. Sin embargo, la única que puede considerarse significativa es la relación lineal entre 3α -HSD 3 e IL 2. En cuanto a las mujeres sanas agrupadas en rangos etarios, sólo encontramos asociación directa entre enzimas y citoquinas en el grupo de entre 40 y 59 años, siendo altamente significativa la que observamos entre 5α -R 3 e IL 10. Respecto a las fases del ciclo, sólo vemos asociación entre 3α -HSD 3 e IL 10 en mujeres que toman anticonceptivos, siendo ésta altamente significativa, y con una relación inversa, de manera tal que si un metabolito aumenta, el otro disminuye.

Cuando a los controles los reagrupamos para comparar con los individuos con LLC, tanto en mujeres como varones sanos no encontramos ninguna relación entre ARNm citoquinas - ARNm interleuquinas. Sin embargo, en LLC, observamos correlaciones entre citoquinas y enzimas. Esto indicaría que las modificaciones que sufra un metabolito estarían asociadas a los cambios del otro, y que si uno se desregula, también lo haría el otro. La mayoría de estas asociaciones ocurren en varones con LLC, lo cual podría estar asociado a la prevalencia y forma de presentación de la patología en el sexo masculino.

Los resultados obtenidos permitieron descubrir alteraciones en las vías de síntesis de esteroides dentro de las CMSP de pacientes con LLC, que no distinguen entre el sexo del paciente o condición del estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Sin embargo, al ser la vía androgénica intracelular la más afectada en estos pacientes, y siendo ésta tan importante en los varones y casi ausente en mujeres con LLC, fundamentalmente debido a su edad, se podría proponer como una de las razones por las cuales esta patología es más prevalente, y de peor pronóstico, en el sexo masculino.

Si bien se desconoce la asociación de la patología con las alteraciones observadas, la medición de los metabolitos alterados de la vía esteroidogénica podría ser de utilidad como posibles marcadores diagnósticos de la enfermedad, especialmente en los casos raros de LLC CD5 negativas.

CONCLUSIÓN

En este estudio pudimos determinar que las células mononucleares de sangre periférica expresan muchas de las enzimas que se requieren para la síntesis de esteroides, reforzando la idea de que estas células podrían tener otros mecanismos de acción, más allá de los mecanismos conocidos asociados a la respuesta inmune. Establecimos que la expresión del ARNm de varias de las enzimas asociadas al metabolismo de la testosterona se encontraba disminuida en CMSP de pacientes con LLC, tales como 5α -R 1, 5α -R 3, 3α -HSD 3, 17β -HSD 1 y 17β -HSD 5, sin importar el estado mutacional de las regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulinas de los pacientes con LLC. A su vez, los resultados obtenidos de los experimentos en cultivo parecen indicar que en las CMSP la testosterona actuaría como regulador positivo de la expresión génica de la 5α -R 1, así como también una posible disfunción o ausencia de receptores de andrógenos en pacientes con LLC. Además, en células mononucleares de pacientes con LLC, ya sea mLLC o uLLC, observamos una menor expresión de ARNm para la mayoría de las citoquinas analizadas, y que en la patología aparecen asociaciones entre citoquinas y enzimas cuya función aún no es del todo clara, la cual sería interesante investigar. Por último, se evidenciaron alteraciones en los estados de metilación de las regiones promotoras de 17β -HSD 1, 17β -HSD 5 y 5α -R 1 en la patología, que en el caso de mujeres con LLC, podría estar asociado con una menor expresión de la proteína. Estos resultados muestran que la vía de síntesis de esteroides, principalmente la androgénica, podría ser de elevada importancia para mantener el normal funcionamiento de CMSP. Estudios a futuro en cuanto a la actividad enzimática y su relación con la función de las CMSP en salud y enfermedad podrían ser de relevancia en el entendimiento del rol de las hormonas esteroideas y sus vías de síntesis dentro de estas células.

BIBLIOGRAFÍA

- Allain, E. P., Venzl, K., Caron, P., Turcotte, V., Simonyan, D., Gruber, M., Le, T., Lévesque, E., Guillemette, C., & Vanura, K. (2018). Sex-dependent association of circulating sex steroids and pituitary hormones with treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *Annals of Hematology*, *97*(9), 1649-1661. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3356-z>
- Allegra, A., Musolino, C., Tonacci, A., Pioggia, G., Casciaro, M., & Gangemi, S. (2020). Clinico-biological implications of modified levels of cytokines in chronic lymphocytic leukemia: A possible therapeutic role. *Cancers*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/cancers12020524>
- Antoniou-Tsigkos A, Zapanti E, G. L. and M. G. (s. f.). Adrenal Androgens. En Editors. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al. (Ed.), *Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc: Vol. [Updated 2. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278929/?report=classic>*
- Antosz, H., Wojciechowska, K., Sajewicz, J., Choroszyńska, D., Marzec-Kotarska, B., Osiak, M., Pajak, N., Tomczak, W., Jargiełło-Baszak, M., & Baszak, J. (2015). IL-6, IL-10, c-Jun and STAT3 expression in B-CLL. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *54*(3), 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.11.006>
- Anuka, E., Gal, M., Stocco, D. M., & Orly, J. (2013). Expression and roles of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in 'non-classical', extra-adrenal and extra-gonadal cells and tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *371*(1-2), 47-61. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.02.003>
- Audet-Walsh, É., Yee, T., Tam, I. S., & Giguère, V. (2017). Inverse regulation of DHT synthesis enzymes 5 α -reductase types 1 and 2 by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocrinology*, *158*(4), 1015-1021. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1926>
- Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y., & Mohler, J. (2012). The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases. *Advances in Urology*, *2012*, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2012/530121>
- Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J., & Ko, C. J. (2016). Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB reports*, *49*(9), 488-496.
- Becerra-Diaz, M., Song, M., & Heller, N. (2020). Androgen and Androgen Receptors as Regulators of Monocyte and Macrophage Biology in the Healthy and Diseased Lung. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01698>
- Berstein, L., Larionov, A., Poroshina, T., Zimarina, T., & Leenman, E. (2002). Aromatase (CYP19) expression in tumor-infiltrating lymphocytes and blood mononuclears. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *128*(3), 173-176. <https://doi.org/10.1007/s00432-002-0322-9>
- Bhatia, A., Sekhon, H. K., & Kaur, G. (2014). Sex hormones and immune dimorphism. *Scientific World*

Journal, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/159150>

- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209-213. <https://doi.org/10.1038/321209a0>
- Blesson, C. S. (s. f.). *Estrogen Receptors in Leukocytes-Possible Impact on Inflammatory Processes in the Female Reproductive System*. www.intechopen.com
- Bouguen, G., Dubuquoy, L., Desreumaux, P., Brunner, T., & Bertin, B. (2015). Intestinal steroidogenesis. *Steroids*, 103, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.022>
- Bremer, A. A., & Miller, W. L. (2014). Regulation of Steroidogenesis. En *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 207-227). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00013-5>
- Bupp, M. R. G., & Jorgensen, T. N. (2018). Androgen-induced immunosuppression. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00794>
- Cahill, N., & Rosenquist, R. (2013). Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*, 8(2), 138-148. <https://doi.org/10.4161/epi.23439>
- Catovsky, D., Wade, R., & Else, M. (2014). The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 99(6), 1088-1094. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.101378>
- Chakraborty, S., Pramanik, J., & Mahata, B. (2021). Revisiting steroidogenesis and its role in immune regulation with the advanced tools and technologies. *Genes and Immunity*, 22(3), 125-140. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00139-3>
- Čikoš, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
- Clark, B. J., Ranganathan, V., & Combs, R. (2000). Post-Translational Regulation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein by cAMP-Dependent Protein Kinase A. *Endocrine Research*, 26(4), 681-689. <https://doi.org/10.3109/07435800009048587>
- Corsini, E., Galbiati, V., Papale, A., Kummer, E., Pinto, A., Serafini, M. M., Guaita, A., Spezzano, R., Caruso, D., Marinovich, M., & Racchi, M. (2016). Role of androgens in dhea-induced rack1 expression and cytokine modulation in monocytes. *Immunity and Ageing*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12979-016-0075-y>
- Couper, K. N., Blount, D. G., & Riley, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180(9), 5771-5777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>
- Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., & Landsberger, N. (2002). Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 3157-3173. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.3157-3173.2002>
- Cutolo, M., Capellino, S., Montagna, P., Ghiorzo, P., Sulli, A., & Villaggio, B. (2005). *Open Access Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line*. <https://doi.org/10.1186/ar1791>
- Delgado, J., Villamor, N., López-Guillermo, A., & Campo, E. (2016). Genetic evolution in chronic

- lymphocytic leukaemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 29(1), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2016.08.003>
- Demir, C., Kara, E., Ekinçi, Ö., & Ebiñç, S. (2017). Clinical and Laboratory Features of CD5-Negative Chronic Lymphocytic Leukemia. *Medical Science Monitor*, 23, 2137-2142. <https://doi.org/10.12659/MSM.901781>
- Djurđjević, P., Zelen, I., Ristić, P., Baskić, D., Popović, S., & Arsenijević, N. (2009). Role of Decreased Production of Interleukin-10 and Interferon-Gamma in Spontaneous Apoptosis of B-Chronic Lymphocytic Leukemia Lymphocytes In Vitro. *Archives of Medical Research*, 40(5), 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2009.05.007>
- Everaus, H. (1992). Hormones and immune responsiveness chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 8(6), 483-489. <https://doi.org/10.3109/10428199209051031>
- Everaus, H., Lehtmaa, J., Luik, E., & Kodar, H. (1992). Immune and hormonal changes in early-stage chronic lymphocytic leukemia patients. *Annals of Hematology*, 65(5), 219-223. <https://doi.org/10.1007/BF01703948>
- Farre, D. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3651-3653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg605>
- Fayad, L., Keating, M. J., Reuben, J. M., O'Brien, S., Lee, B.-N., Lerner, S., & Kurzrock, R. (2001). *Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: Correlation with phenotypic characteristics and outcome*. www.bloodjournal.org
- Florea, C., Schneckenger, M., Grandjean, C., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Epigenomics of leukemia: From mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics*, 3(5), 581-609. <https://doi.org/10.2217/epi.11.73>
- Furman, D., Hejblum, B. P., Simon, N., Jojić, V., Dekker, C. L., Thiebaut, R., Tibshirani, R. J., & Davis, M. M. (2014). Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(2), 869-874. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321060111>
- Gamberale, R., Geffner, J., Arrosagaray, G., Scolnik, M., Salamone, G., Trevani, A., Vermeulen, M., & Giordano, M. (2001). Non-malignant leukocytes delay spontaneous B-CLL cell apoptosis. In *Leukemia* (Vol. 15, pp. 1860-1867). www.nature.com/leu
- Ghmlouch, H., Ouled-Haddou, H., Damaj, G., Royer, B., Gubler, B., & Marolleau, J. P. (2013). A Combination of Cytokines Rescues Highly Purified Leukemic CLL B-Cells from Spontaneous Apoptosis In Vitro. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060370>
- Greenblatt, R. B., Oettinger, M., & Bohler, C. S.-S. (1976). Estrogen-Androgen Levels in Aging Men and Women: Therapeutic Considerations. *Journal of the American Geriatrics Society*, 24(4), 173-178. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1976.tb04294.x>
- Gu, X., Li, S.-Y., Matsuyama, S., & DeFalco, T. (2022). Immune Cells as Critical Regulators of Steroidogenesis in the Testis and Beyond. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 894437.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.894437>

- Haider, P., Hoberstorfer, T., Salzmann, M., Fischer, M. B., Speidl, W. S., Wojta, J., & Hohensinner, P. J. (2022). Quantitative and Functional Assessment of the Influence of Routinely Used Cryopreservation Media on Mononuclear Leukocytes for Medical Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031881>
- Hallek, M., & Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, 96(12), 1679-1705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>
- Hammer, F., Drescher, D. G., Schneider, S. B., Quinkler, M., Stewart, P. M., Allolio, B., & Arlt, W. (2005). Sex steroid metabolism in human peripheral blood mononuclear cells changes with aging. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(11), 6283-6289. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0915>
- Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L., & Ingraham, H. A. (1999). Phosphorylation of the Nuclear Receptor SF-1 Modulates Cofactor Recruitment. *Molecular Cell*, 3(4), 521-526. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80480-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80480-3)
- He, W., Gauri, M., Li, T., Wang, R., & Lin, S.-X. (2016). Current knowledge of the multifunctional 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD17B1). *Gene*, 588(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.031>
- Héberlé, É., & Bardet, A. F. (2019). Sensitivity of transcription factors to DNA methylation. *Essays in Biochemistry*, 63(6), 727-741. <https://doi.org/10.1042/EBC20190033>
- Hoppe, U., Holterhus, P. M., Wünsch, L., Jocham, D., Drechsler, T., Thiele, S., Marschke, C., & Hiort, O. (2006). Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor. *Journal of Molecular Medicine*, 84(8), 651-659. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0049-1>
- Işıksaçan, N., Çınar, S., Çetin, E. A., Aktan, M., & Deniz, G. (2016). Cytokine Contents in Chronic Lymphocytic Leukemia: Association with ZAP70 Expression. *Turkish Journal of Hematology*, 33(3), 202-208. <https://doi.org/10.4274/tjh.2014.0469>
- Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, 294(2), 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>
- Kulis, M., Heath, S., Bibikova, M., Queirós, A. C., Navarro, A., Clot, G., Martínez-Trillos, A., Castellano, G., Brun-Heath, I., Pinyol, M., Barberán-Soler, S., Papasaikas, P., Jares, P., Beà, S., Rico, D., Ecker, S., Rubio, M., Royo, R., Ho, V., ... Martín-Subero, J. I. (2012). Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, 44(11), 1236-1242. <https://doi.org/10.1038/ng.2443>
- Kushwaha, G., Dozmorov, M., Wren, J. D., Qiu, J., Shi, H., & Xu, D. (2016). Hypomethylation coordinates antagonistically with hypermethylation in cancer development: A case study of leukemia. *Human Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/s40246-016-0071-5>
- Kvarnström, M., Jenmalm, M. C., & Ekerfelt, C. (2004). Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed

- with three common assays: An overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology*, 49(2), 157-168. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.06.003>
- Ladikou, E., & Kassi, E. (2017). The emerging role of estrogen in B cell malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 58(3), 528-539. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1213828>
- Lai, J. J., Lai, K. P., Zeng, W., Chuang, K. H., Altuwaijri, S., & Chang, C. (2012). Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: Lessons from conditional AR knockout mice. *American Journal of Pathology*, 181(5), 1504-1512. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.008>
- Lech-Maranda, E., Grzybowska-Izydorczyk, O., Wyka, K., Mlynarski, W., Borowiec, M., Antosik, K., Cebula-Obrzut, B., Makuch-Lasica, H., Nowak, G., Klimkiewicz-Wojciechowska, G., Wawrzyniak, E., Bilinski, P., Robak, T., & Warzocha, K. (2012). Serum tumor necrosis factor- α and interleukin-10 levels as markers to predict outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in different risk groups defined by the IGHV mutation status. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 60(6), 477-486. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0197-7>
- Li, J., Ding, Z., Wang, Z., Lu, J. F., Maity, S. N., Navone, N. M., Logothetis, C. J., Mills, G. B., & Kim, J. (2011). Androgen regulation of 5 α -Reductase isoenzymes in prostate cancer: Implications for prostate cancer prevention. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028840>
- Li, J., Papadopoulos, V., & Vihma, V. (2015). Steroid biosynthesis in adipose tissue. *Steroids*, 103, 89-104. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.016>
- Lin, S., Liu, Y., Goldin, L. R., Lyu, C., Kong, X., Zhang, Y., Caporaso, N. E., Xiang, S., & Gao, Y. (2019). Sex-related DNA methylation differences in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Biology of Sex Differences*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0213-7>
- Lukacik, P., Kavanagh, K. L., & Oppermann, U. (2006). Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1-2), 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.007>
- Mallone, R., Mannering, S. I., Brooks-Worrell, B. M., Durinovic-Belló, I., Cilio, C. M., Wong, F. S., & Schloot, N. C. (2011). Isolation And Preservation Of Peripheral Blood Mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: Position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clinical and Experimental Immunology*, 163(1), 33-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x>
- Manenda, M. S., Hamel, C. J., Masselot-Joubert, L., Picard, M. È., & Shi, R. (2016). Androgen-metabolizing enzymes: A structural perspective. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 161, 54-72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.021>
- Mansouri, L., Wierzbinska, J. A., Plass, C., & Rosenquist, R. (2018). Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact. *Seminars in Cancer Biology*, 51(December 2017), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.02.001>
- Marchais-Oberwinkler, S., Henn, C., Möller, G., Klein, T., Negri, M., Oster, A., Spadaro, A., Werth, R.,

- Wetzel, M., Xu, K., Frotscher, M., Hartmann, R. W., & Adamski, J. (2011). 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: Protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *125*(1-2), 66-82. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.12.013>
- Martinez-Arguelles, D. B., & Papadopoulos, V. (2010). Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids*, *75*(7), 467-476. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.02.004>
- Martín-Subero, J. I., López-Otín, C., & Campo, E. (2013). Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Hematology*, *20*(4), 362-368. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32836235dc>
- Menon, B., Sinden, J., Franzo-Romain, M., Botta, R. B., & Menon, K. M. J. (2013). Regulation of LH Receptor mRNA Binding Protein by miR-122 in Rat Ovaries. *Endocrinology*, *154*(12), 4826-4834. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1619>
- Messeguer, X., Escudero, R., Farre, D., Nunez, O., Martinez, J., & Alba, M. M. (2002). PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, *18*(2), 333-334. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.2.333>
- Meyers, J. A., Su, D. W., & Lerner, A. (2009). Chronic Lymphocytic Leukemia and B and T Cells Differ in Their Response to Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitors. *The Journal of Immunology*, *182*(9), 5400-5411. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804255>
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, *16*(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Miller, W. L. (2005). Minireview: Regulation of Steroidogenesis by Electron Transfer. *Endocrinology*, *146*(6), 2544-2550. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0096>
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, *32*(1), 81-151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2019). The “backdoor pathway” of androgen synthesis in human male sexual development. *PLoS Biology*, *17*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000198>
- Missaghian, E., Kempná, P., Dick, B., Hirsch, A., Alikhani-Koupaei, R., Jégou, B., Mullis, P. E., Frey, B. M., & Flück, C. E. (2009). Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *Journal of Endocrinology*, *202*(1), 99-109. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0353>
- Moarii, M., Boeva, V., Vert, J.-P., & Reyat, F. (2015). Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. *BMC Genomics*, *16*(1), 873. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1994-2>
- Moeller, G., & Adamski, J. (2009). Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *301*(1-2), 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.040>

- Monserrat, J., Sánchez, M. Á., Paz, R. D., Díaz, D., Mur, S., Reyes, E., Prieto, A., Hera, A. D. L., Martínez-A, C., & Álvarez-Mon, M. (2014). Distinctive patterns of naïve/memory subset distribution and cytokine expression in CD4 T lymphocytes in ZAP-70 B-chronic lymphocytic patients. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, *86*(1), 32-43. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21120>
- Mor, G., Yue, W., Santen, R. J., Gutierrez, L., Eliza, M., Berstein, L. M., Harada, N., Wang, J., Lysiak, J., Diano, S., & Naftolin, F. (1998). Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *67*(5-6), 403-411. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00143-5)
- Morales-Montor, J., Togno-Pierce, C., & Munoz-Cruz, S. (2011). Non-Reproductive Effects of Sex Steroids: Their Immunoregulatory Role. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *11*(13), 1714-1727. <https://doi.org/10.2174/156802611796117630>
- Nabhan, C., & Rosen, S. T. (2014). Chronic Lymphocytic Leukemia: A Clinical Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *312*(21), 2265-2276. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14553>
- Nguyen, K. D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y. P. S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R. M., & Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, *480*(7375), 104-108. <https://doi.org/10.1038/nature10653>
- Nikolakis, G., Stratakis, C. A., Kanaki, T., Slominski, A., & Zouboulis, C. C. (2016). Skin steroidogenesis in health and disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *17*(3), 247-258. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9390-z>
- Oakes, C. C., Claus, R., Gu, L., Assenov, Y., Hüllein, J., Zucknick, M., Bieg, M., Brocks, D., Bogatyrova, O., Schmidt, C. R., Rassenti, L., Kipps, T. J., Mertens, D., Lichter, P., Döhner, H., Stilgen, S., Byrd, J. C., Zenz, T., & Plass, C. (2014). Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Discovery*, *4*(3), 348-361. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0349>
- Orsini, E., Guarini, A., & Foa, R. (2000). Accessory Cells, Cytokine Loops and Cell-to-Cell Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, *4*(1), 73-98. <https://doi.org/10.1046/j.1468-0734.2000.00004.x>
- Pagotto, M. A., Roldán, M. L., Pagotto, R. M., Lugano, M. C., Pisani, G. B., Rogic, G., Molinas, S. M., Trumper, L., Pignataro, O. P., & Monasterolo, L. A. (2011). Localization and functional activity of cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (CYP11A1) in the adult rat kidney. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *332*(1-2), 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.10.020>
- Paydas, S. (2009). Regression of chronic lymphocytic leukemia with aromatase inhibitor-letrozole? *Leukemia Research*, *33*(4), 566-567. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.05.008>
- Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, *25*(6), 947-970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
- Pelletier, G. (2010). Steroidogenic enzymes in the brain: Morphological aspects. *Progress in Brain Research*, *181*(C), 193-207. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81011-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81011-4)

- Penning, T. M., Jin, Y., Steckelbroeck, S., Rižner, T. L., & Lewis, M. (2004). Structure-function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: Genes and proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215(1-2), 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.006>
- Pignatti, E., Casarini, L., Scaltriti, S., Wistuba, J., Schlatt, S., Rossi, A., Lachhab, A., Taliani, E., Carani, C., & Simoni, M. (2012). Aromatase expression in human peripheral blood leucocytes (PBLs) and in various tissues in primates: Studies in elderly humans and cynomolgus monkeys. *Journal of Medical Primatology*, 41(6), 372-383. <https://doi.org/10.1111/jmp.12000>
- Qin, K., & Rosenfield, R. L. (2005). Characterization of the basal promoter element of the human type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1728(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.01.015>
- Rai, K. R., & Jain, P. (2016). Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *American Journal of Hematology*, 91(3), 330-340. <https://doi.org/10.1002/ajh.24282>
- Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids. *Progress in Brain Research*, 186, 113-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7>
- Rego, D., Kumar, A., Nilchi, L., Wright, K., Huang, S., & Kozlowski, M. (2011). IL-6 Production Is Positively Regulated by Two Distinct *Src* Homology Domain 2-Containing Tyrosine Phosphatase-1 (SHP-1)-Dependent CCAAT/Enhancer-Binding Protein β and NF- κ B Pathways and an SHP-1-Independent NF- κ B Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated Bone Marrow-Derived Macrophages. *The Journal of Immunology*, 186(9), 5443-5456. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003551>
- Reimann, K. A., Chernoff, M., Wilkening, C. L., Nickerson, C. E., & Landay, A. L. (2000). Preservation of Lymphocyte Immunophenotype and Proliferative Responses in Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Donors: Implications for Multicenter Clinical Trials. En *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY* (Vol. 7, Número 3, pp. 352-359). <http://cvi.asm.org/>
- Rossetti, M. F., Schumacher, R., Lazzarino, G. P., Gomez, A. L., Varayoud, J., & Ramos, J. G. (2019). The impact of sensory and motor enrichment on the epigenetic control of steroidogenic-related genes in rat hippocampus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 485(October 2018), 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.025>
- RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio. (2022). *RStudio*. <http://www.rstudio.com>
- Rubinow, K. B. (2018). An intracrine view of sex steroids, immunity, and metabolic regulation. *Molecular Metabolism*, 15, 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.03.001>
- Russell, D. W., & Wilson, J. D. (1994). *STEROID 5 α -REDUCTASE: TWO GENES/TWO ENZYMES*. www.annualreviews.org
- Schmidt, M., Kreutz, M., Löffler, G., Schölmerich, J., & Sträub, R. H. (2000). Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *Journal of Endocrinology*, 164(2), 161-169. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1640161>

- Schmidt, M., Weidler, C., Naumann, H., Anders, S., Schölmerich, J., & Straub, R. H. (2005). Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes – androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5 α -reduced androgens. *Arthritis Research & Therapy*, 7(5), R938. <https://doi.org/10.1186/ar1769>
- Selvaraj, V., Stocco, D. M., & Clark, B. J. (2018). Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, 99(1), 13-26. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy0102>
- Shen, W. J., Hu, Z., Hu, J., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2015). Post-transcriptional and post-translational regulation of steroidogenesis. En *Post-Transcriptional Mechanisms in Endocrine Regulation* (pp. 253-275). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25124-0_12
- Simard, J., Ricketts, M.-L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F. A., & Melner, M. H. (2005). Molecular Biology of the 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 Isomerase Gene Family. *Endocrine Reviews*, 26(4), 525-582. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0050>
- Simpson, E. (2004). Aromatase: Biologic Relevance of Tissue-Specific Expression. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(1), 11-23. <https://doi.org/10.1055/s-2004-823023>
- Slominski, A. T., Manna, P. R., & Tuckey, R. C. (2015). On the role of skin in the regulation of local and systemic steroidogenic activities. *Steroids*, 103, 72-88. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.04.006>
- Stayrook, K. R., Rogers, P. M., Savkur, R. S., Wang, Y., Su, C., Varga, G., Bu, X., Wei, T., Nagpal, S., Liu, X. S., & Burris, T. P. (2008). Regulation of Human 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (*AKR1C4*) Expression by the Liver X Receptor. *Journal of Lipid Research*, 49(2), 607-612. <https://doi.org/10.1124/mol.107.039099>
- Strati, P., Jain, N., & O'Brien, S. (2018). Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 93(5), 651-664. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.03.002>
- Tigges, M. A., Casey, L. S., & Koshland, M. E. (1989). Mechanism of Interleukin-2 Signaling: Mediation of Different Outcomes by a Single Receptor and Transduction Pathway. *Science*, 243(4892), 781-786. <https://doi.org/10.1126/science.2492678>
- Trigunaite, A., Dimo, J., & Jørgensen, T. N. (2015). Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cellular Immunology*, 294(2), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.02.004>
- Van, L. T. (2013). Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.05.017>
- Vlachonikola, E., Stamatopoulos, K., & Chatzidimitriou, A. (2021). T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Two-Edged Sword. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.612244>
- Vottero, A., Kirschner, L. S., Yue, W., Brodie, A., & Stratakis, C. A. (1998). P450arom gene expression in peripheral blood lymphocytes: Identification of a cryptic splice site for exon-1 after Epstein-Barr virus transformation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 64(5-6), 245-250. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(97\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(97)00193-3)
- Vottero, A., Rochira, V., Capelletti, M., Viani, I., Zirilli, L., Neri, T. M., Carani, C., Bernasconi, S., & Ghizzoni, L. (2006). Aromatase is differentially expressed in peripheral blood leukocytes from

- children, and adult female and male subjects. *European Journal of Endocrinology*, 154(3), 425-431. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02102>
- Wiestner, A. (2015). The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 100(12), 1495-1507. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.119123>
- Xu, Y., Dalrymple, S. L., Becker, R. E., Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (2006). Pharmacologic basis for the enhanced efficacy of dutasteride against prostatic cancers. *Clinical Cancer Research*, 12(13), 4072-4079. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0184>
- Yang, P., Tian, H., Zou, Y.-R., Chambon, P., Ichinose, H., Honig, G., Diamond, B., & Kim, S. J. (2021). Epinephrine Production in Th17 Cells and Experimental Autoimmune Encephalitis. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.616583>
- Yoshimoto, F. K., & Auchus, R. J. (2015). The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 151, 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.026>
- Yu, M. K. (2006). Epigenetics and chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology*, 81(11), 864-869. <https://doi.org/10.1002/ajh.20718>
- Yu, Z., Sun, B., Kantarjian, H. M., Keating, M. J., Amin, H. M., & Sun, X. (2008). Protein expression profiling of cytokines and cytokine receptors on purified chronic lymphocytic leukemia cells from patients with favourable prognostic indicators. *Leukemia and Lymphoma*, 49(4), 751-756. <https://doi.org/10.1080/10428190801888696>
- Zhang, B., Zhu, D., Hu, X., Zhou, M., Shang, P., & Lin, S. (2014). Human 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (3 α -HSD3): The V54L mutation restricting the steroid alternative binding and enhancing the 20 α -HSD activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 141, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.01.003>
- Zhou, Z., Shackleton, C. H. L., Pahwa, S., White, P. C., & Speiser, P. W. (1998). Prominent sex steroid metabolism in human lymphocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 138(1-2), 61-69. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00052-5)
- Zhou, Z., & Speiser, P. W. (1999). Regulation of HSD17B1 and SRD5A1 in Lymphocytes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(3), 410-417. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.289>