

Tesis Doctoral

# Influencia de la histamina en la regulación del desarrollo y el mantenimiento de las funciones de los tejidos esteroideogénicos testicular y córticoadrenal

Pagotto, Romina María del Luján

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pagotto, Romina María del Luján. (2012). Influencia de la histamina en la regulación del desarrollo y el mantenimiento de las funciones de los tejidos esteroideogénicos testicular y córticoadrenal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pagotto, Romina María del Luján. "Influencia de la histamina en la regulación del desarrollo y el mantenimiento de las funciones de los tejidos esteroideogénicos testicular y córticoadrenal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



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

**Influencia de la histamina en la regulación del desarrollo y el mantenimiento de las funciones de los tejidos esteroideogénicos testicular y córticoadrenal**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Romina María del Luján Pagotto**

Director de Tesis y Consejero de Estudios: **Dr. Omar P. Pignataro**

Director Asistente: **Dra. Carolina Mondillo**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales.  
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). CONICET

Buenos Aires, Marzo de 2012

# **Influencia de la Histamina en la regulación del desarrollo y el mantenimiento de las funciones de los tejidos esteroideogénicos testicular y córticoadrenal**

## **Resumen**

La histamina (HA) es una amina biógena asociada a diversas funciones llevadas a cabo a través de cuatro subtipos de receptores pertenecientes a la familia de los GPCR.

En este trabajo de Tesis se evaluó el efecto de HA sobre la esteroideogénesis y proliferación de tumores córticoadrenales utilizando dos líneas celulares, las Y1 murinas y las H295R humanas y se profundizaron estudios previos del laboratorio en células de Leydig (CL), analizando la participación de esta amina en su desarrollo.

En las células córticoadrenales la esteroideogénesis no se vió modificada por HA, lo que supone que el efecto modulador reportado previamente en CL no sería extrapolable a todos los sistemas esteroideogénicos. En cambio, HA inhibió la proliferación de las células H295R a 24h, provocando un arresto de las células en la fase G2/M en un mecanismo mediado por el subtipo de receptor H1 e IP3 y DAG como segundos mensajeros.

Estos resultados permitieron identificar un nuevo rol de HA sobre la proliferación de células córticoadrenales humanas que podría contribuir a una mejor comprensión de la patología tumoral y al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En lo que respecta a las CL, HA fue capaz de inhibir la proliferación de CL inmaduras (CLI) en ensayos *in vitro* a través de la activación del subtipo de receptor H4, mientras que en estudios *in vivo* el tratamiento con esta amina produjo un incremento en el número de CL con morfología adulta. Estos datos sugieren que esta amina modularía la proliferación en un paso previo a la diferenciación y pone en evidencia la necesidad de continuar los estudios sobre su función en la transición de los distintos estadios de desarrollo de CL así como en la génesis de patologías tumorales.

Palabras claves: histamina, célula de Leydig, células córticoadrenales, proliferación, esteroideogénesis, desarrollo.

# **Influence of Histamine in the development and the functional maintenance of testicular and adrenocortical steroidogenic tissues**

## **Abstract**

Histamine (HA) is a biogenic amine associated with heterogeneous functions carried out through the activation of four receptor subtypes, all of them members of the GPCR family.

In this doctoral thesis the effects of HA on steroidogenesis and proliferation of adrenocortical tumors were evaluated using two experimental models, the murine Y1 and the human H295R cell lines. Also previous studies in Leydig cells (LC) were continued, evaluating the participation of the cited amine in their development.

Steroidogenesis was not modified by HA in adrenocortical cells, which suggests that the modulatory effect previously reported in LC can not be extrapolated to all steroidogenic systems. Nevertheless, HA inhibited the proliferation of H295R cells after a 24 h-treatment through activation of the H1 receptor subtype and an increase in the production of IP3 and DAG second messengers, causing a cell cycle arrest in the G2/M phase. These results indicate a new role of HA on human adrenocortical cells proliferation that could contribute to a better understanding of tumor pathology, and to the development of new therapeutic agents.

With respect to LC, HA was able to inhibit the proliferation of immature and progenitor LC in *in vitro* assays via the activation of the H4 receptor subtype, whereas in *in vivo* studies HA caused an increase in LC number. These data suggest that the amine would modulate the proliferation of LC before differentiation takes place and highlights the need for further studies on its role on the transition of different LC development stages as well as on its influence on tumor pathogenesis.

Keywords: histamine, Leydig cell, adrenocortical cells, proliferation, steroidogenesis, development.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el apoyo financiero para la realización de esta Tesis.**

**Al Dr. Omar P. Pignataro, por recibirme en su laboratorio, apoyar mis ideas, facilitarme contactos y permitirme trabajar con absoluta independencia.**

**A la Dra. Carolina Mondillo, por la lectura crítica de la Tesis y sus acertados comentarios.**

**A los Dres. Juan Bautista Rodríguez y Sergio H Szajnman, por su asistencia y colaboración en la síntesis del compuesto EDS.**

**Al Dr. Roberto Ponzio, por su calidez humana, su paciencia y su colaboración en la fijación de testículos y la evaluación histológica.**

**Al Dr. Eduardo T. Cánepa, por sus valiosos comentarios sobre los resultados de ciclo celular.**

**Al Dr. Juan Carlos Calvo, por estar siempre dispuesto a ofrecer su ayuda desinteresada y responder todas las consultas con una increíble amabilidad.**

**A Bárbara, por su compañerismo y ayuda en los primeros años de la Tesis.**

**A Gastón, por su buen humor, su entusiasmo y su amistad.**

**A Noelia, por el intercambio de reactivos y de conocimientos sobre la histamina y la proliferación celular.**

**A mi compañera de laboratorio y amiga Casandra, por las infinitas veces que me ayudó en la mesada, por las charlas de la vida y las discusiones científicas. Por las meriendas compartidas, los comentarios suspicaces, la salida marplatense post-congreso y sobre todo por su amistad. Gracias.**

**A Fátima, Fernanda, Mónica, Eugenia, Cecilia y al personal del IByME que de alguna u otra forma colaboraron con la realización de esta Tesis.**

**A Romina, por sus sabios consejos laborales y personales.**

**A Soledad, Patricia y Laura, por su amistad y por todos los momentos compartidos.**

**A mi amiga y colega Ayelén, por escucharme y entenderme, por ofrecerme su ayuda y su amistad sincera durante todos estos años.**

**A mis hermanas Betina y Vanina, por acompañarme en la vida haciendo más felices los buenos momentos y mucho más llevaderos los no tan gratos. Por todo su cariño, por estar siempre presentes, gracias.**

**A Mauricio, por su apoyo y su interés en mi trabajo, por recordar el mail y elegir compartir su vida conmigo. Por toda la felicidad y el amor que me das, gracias.**

**A mi abuela Carmen, por su amor inmenso, su sencillez y su humildad. Por enseñarme lo más importante de la vida.**

**A mis padres, Rita y Berto, porque todo lo que soy se los debo a ellos. Gracias por su amor incondicional, su apoyo permanente, su confianza plena y su presencia constante. No existen palabras para expresar cuánto los quiero. Gracias por todo.**

*A mi madrina,*  
**MARÍA TERESA RICARDINI**



## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	adenilato ciclasa
<b>ACC</b>	tumores córticoadrenales
<b>ACTH</b>	hormona adrenocorticotrofina
<b>AMTH</b>	Amtamina
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>B<sub>máx</sub></b>	Capacidad máxima de unión
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina
<b>CHO</b>	células de ovario de hámster chino
<b>CL</b>	células de Leydig
<b>CLA</b>	células de Leydig adultas
<b>CLF</b>	células de Leydig fetales
<b>CLM</b>	células madre de Leydig
<b>CLI</b>	células de Leydig inmaduras
<b>CLP</b>	células de Leydig progenitoras
<b>CRH</b>	hormona liberadora de córticotrofina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAO</b>	diamino oxidasa
<b>dbAMPc</b>	dibutiril adenosín 3', 5'-monofosfato cíclico
<b>DHEA</b>	Dehidroepiandrosterona
<b>DHEAS</b>	Dehidroepiandrosterona sulfato
<b>EDTA</b>	ácido etilen- diamino – tetracético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGTA</b>	ácido etilen-2-glicol-2-etilamino tetracético
<b>ERK ½</b>	proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares
<b>ES</b>	error estándar
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico

<b>FMPH</b>	2-[(3-trifluorometil)fenil] histamina
<b>FSH</b>	hormona folículo estimulante
<b>Fsk</b>	Forskolina
<b>Gas</b>	subunidad alfa de la proteína Gs (estimuladora)
<b>Gaq</b>	subunidad alfa de la proteína Gq
<b>Gai/o</b>	subunidad alfa de la proteína Gi/o (inhibitoria)
<b>GPCR</b>	receptores de membrana asociados a proteínas G
<b>HA</b>	Histamina
<b>hCG</b>	gonadotropina coriónica humana
<b>HDC</b>	L-histidina decarboxilasa
<b>HDC-/-</b>	Ratones noqueados para el gen de HDC
<b>HEPES</b>	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico
<b>HNMT</b>	histamina N-metil transferasa
<b>H1</b>	receptor histaminérgico subtipo 1
<b>H2</b>	receptor histaminérgico subtipo 2
<b>H3</b>	receptor histaminérgico subtipo 3
<b>H4</b>	receptor histaminérgico subtipo 4
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>IBMX</b>	3-isobutil-1-metil-xantina
<b>IL-1/2/6</b>	interleuquina 1/2/6
<b>IMET</b>	imetit
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5- trifosfato
<b>IPs</b>	inositoles fosfato totales
<b>P450<sub>scc</sub>/ CYP11A1</b>	complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol, dependiente de citocromo P450
<b>P450<sub>c21</sub>/CYP21A2</b>	Enzima 21-hidroxilasa, dependiente de citocromo P450
<b>P450<sub>c11AS</sub>/CYP11B2</b>	Aldosterona sintasa

<b>P450c11β/CYP11B1</b>	Enzima 11β-hidroxilasa, dependiente de citocromo P450
<b>P450c17/CYP17</b>	enzima 17α-hidroxilasa/17-20 liasa, dependiente de citocromo P450
<b>J77</b>	JNJ 7777120
<b>JNK</b>	Proteínas quinasas regulada por estrés
<b>Kd</b>	constante de disociación
<b>KO</b>	Ratones noqueados genéticamente
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MAO</b>	Monoaminoxidasa
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MC2R</b>	Receptor 2 para melanocortina
<b>β-NAD</b>	nicotinamida adenina dinucleotido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PCA</b>	ácido perclórico
<b>PDE</b>	Fosfodiesterasa
<b>PEST</b>	secuencia aminoacídica rica Prolina, Ácido Glutámico, Serina y Treonina
<b>PKA</b>	proteína quinasa A
<b>PKC</b>	proteína quinasa C
<b>PLC</b>	fosfolipasa C
<b>PLP</b>	piridoxal fosfato
<b>PN</b>	Post-natal
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoruro
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>StAR</b>	proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
<b>SULT2A1</b>	Enzima sulfoniltransferasa

<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	tetra-metil-etilendiamina
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	factor de crecimiento transformante tipo $\alpha$
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	factor de crecimiento transformante tipo $\beta$ 1
<b>TH</b>	Hormona tiroidea
<b>TME-AMPC</b>	2'-O-monosucciniladenosina-tirosil metil ester 3', 5'- monofosfato cíclico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>U73122</b>	inhibidor específico de fosfolipasa C
<b>U73343</b>	Análogo inactivo del inhibidor específico de fosfolipasa C
<b>VUF</b>	Vuf 8430

**INDICE**

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. SISTEMA ENDÓCRINO</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Glándula adrenal</b>	<b>2</b>
1.1.1. Esteroidogénesis adrenal	4
1.1.2. Regulación de la esteroidogénesis adrenal	7
1.1.3. Proliferación de la corteza adrenal	8
1.1.4. Tumores córticoadrenales	9
<b>1.2. Testículo</b>	<b>10</b>
1.2.1. Células de Leydig	11
1.2.2. Desarrollo de células de Leydig adultas (CLA)	12
1.2.3. Regulación del desarrollo de CLA	14
<b>2. HISTAMINA (HA)</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Biosíntesis de HA</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Catabolismo de HA</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Receptores para HA y funciones biológicas generales</b>	<b>19</b>
2.3.1. Receptor subtipo H1	20
2.3.2. Receptor subtipo H2	21
2.3.3. Receptor subtipo H3	22
2.3.4. Receptor subtipo H4	22
<b>2.4. HA en proliferación y diferenciación celular</b>	<b>24</b>
<b>2.5. HA y glándula adrenal</b>	<b>26</b>
<b>2.6. Histamina y CLA</b>	<b>27</b>

<b>HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>32</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>1. MATERIALES</b>	<b>35</b>
<b>1.1. Reactivos generales</b>	<b>35</b>
<b>1.2. Medios y soluciones</b>	<b>36</b>
<b>1.3. Material plástico</b>	<b>36</b>
<b>1.4. Radiactivos</b>	<b>36</b>
<b>1.5. Anticuerpos</b>	<b>37</b>
<b>1.6. Reactivos de electroforesis</b>	<b>37</b>
<b>1.7. Solventes</b>	<b>38</b>
<b>1.8. Síntesis del compuesto 1,2-dimetano etano sulfonato (EDS)</b>	<b>38</b>
<b>2. MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>2.1. Modelos Experimentales</b>	<b>41</b>
2.1.1. Línea celular H295R	41
2.1.2. Línea celular Y1	42
2.1.3. Mantenimiento de las líneas celulares	42
2.1.3.1. Expansión celular	42
2.1.3.2. Tripsinización celular	43
2.1.3.3. Criopreservación	43
2.1.3.4. Descongelamiento	43
2.1.4. Células de Leydig de rata	44
2.1.4.1. Aislamiento y purificación de células de Leydig de rata	44

2.1.4.2. Tinción histoquímica para 3 $\beta$ -HSD	45
2.1.5. Ratas de la cepa Sprague-Dawley	46
<b>2.2. Ensayos de unión ligando-receptor</b>	<b>46</b>
<b>2.3. Determinación de esteroides</b>	<b>47</b>
2.3.1. Extracción de testosterona de suero de rata	47
2.3.2. Incubación de células para ensayos de respuesta esteroidogénica	48
2.3.3. Cuantificación de niveles de esteroides por radioinmunoensayo	48
<b>2.4. Determinación de AMPc intracelular</b>	<b>49</b>
2.4.1. Incubación de células para la determinación de AMPc intracelular	49
2.4.2. Cuantificación de AMPc intracelular	50
<b>2.5. Determinación de inositoles fosfato (IPs)</b>	<b>51</b>
2.5.1. Incubación de células para la determinación de IPs	51
2.5.2. Recuperación y cuantificación de IPs	52
<b>2.6. Ensayos de proliferación celular</b>	<b>53</b>
2.6.1. Ensayos de incorporación de 3H-Timidina en células Y1 y H295R	53
2.6.2. Ensayos de incorporación de 3H-Timidina en CL de rata	54
2.6.3. Ensayos de proliferación celular por MTT	54
<b>2.7. Western blot</b>	<b>55</b>
2.7.1. Preparación de extractos celulares de las líneas Y1 y H295R	55
2.7.2. Preparación de extractos celulares de testículo total de rata y de CL purificadas	55
2.7.3. Extracción de proteínas para Western blot	56
2.7.4. Electroforesis en matriz de poliacrilamida	56
2.7.5. Revelado de proteínas específicas	57
<b>2.8. Determinación de proteínas</b>	<b>58</b>
<b>2.9. Inmunocitoquímica</b>	<b>58</b>



<b>2.10. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo</b>	<b>59</b>
2.10.1. Incubación y fijación de células	59
2.10.2. Tinción con yoduro de propidio	60
<b>2.11. Determinación de apoptosis por Tunel y citometría de flujo</b>	<b>60</b>
2.11.1. Incubación y fijación de células	60
2.11.2. Ensayo de Tunel y análisis por citometría de flujo	61
<b>2.12. Estudio del contenido de HA y HDC durante el desarrollo de células de Leydig adultas</b>	<b>61</b>
<b>2.13. Estudios <i>in vivo</i></b>	<b>62</b>
2.13.1. Tratamiento <i>in vivo</i> de ratas expuestas al compuesto EDS	62
2.13.2. Fijación y procesamiento de los testículos	63
2.13.3. Inmunohistoquímica	63
2.13.4. Recuento de células de Leydig	64
<b>2.14. Análisis estadístico</b>	<b>65</b>

---

<b>CAPÍTULO 1: EFECTOS DE LA HISTAMINA (HA) SOBRE CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS DE LA GLÁNDULA ADRENAL</b>	<b>66</b>
<b>1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>67</b>
<b>2. RESULTADOS</b>	<b>68</b>
<b>2.1. Receptores para Histamina en las líneas celulares Y1 y H295R.</b>	<b>68</b>
<b>2.2. Efecto de la HA sobre la esteroidogénesis de las líneas córticoadrenales Y1 y H295R</b>	<b>69</b>
<b>2.3. Efecto de la HA sobre la proliferación de las líneas adrenocorticales Y1 y H295R</b>	<b>73</b>
<b>2.4. Efecto de agonistas específicos para los receptores de HA sobre la</b>	<b>74</b>

proliferación de la línea adrenocortical Y1 y H295R	
2.5. Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa (HDC) y contenido endógeno de HA en las líneas celulares Y1 y H295R	75
3. DISCUSIÓN	78
<hr/>	
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DEL MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN INVOLUCRADO EN EL EFECTO INHIBITORIO DE HA MEDIADO POR EL RECEPTOR H1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS H295R	83
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	84
2. RESULTADOS	85
2.1. Estudio del receptor histaminérgico H1 en la línea celular H295R	85
2.2. Participación del receptor H1 en el mecanismo de inhibición de la proliferación mediado por HA	87
2.3. Efecto de HA y FMPH sobre la progresión del ciclo celular y la inducción de apoptosis en las células H295R	90
3. DISCUSIÓN	95
<hr/>	
CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA HA SOBRE EL DESARROLLO DE CÉLULAS DE LEYDIG ADULTAS	100
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	101
2. RESULTADOS	102
2.1. Evaluación del contenido testicular de HA en ratas de distintas edades	102

<b>2.2. Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa (HDC) en testículos de ratas de distintas edades</b>	<b>103</b>
<b>2.3. Estudio del efecto de HA sobre el desarrollo de CLA utilizando un modelo de ratas adultas tratadas con etano-dimetano sulfonato (EDS)</b>	<b>105</b>
2.3.1. Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa (HDC) a distintos tiempos post-EDS	<b>106</b>
2.3.2. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de HA sobre el número de CLA	<b>107</b>
<b>2.4. Estudio del efecto directo de HA sobre la proliferación de células de Leydig</b>	<b>110</b>
2.4.1. Evaluación del efecto directo de HA sobre la proliferación de células de Leydig inmaduras	<b>112</b>
2.4.2. Efecto de los agonistas específicos para cada subtipo de receptor de HA sobre la proliferación de células de Leydig inmaduras	<b>113</b>
2.4.3. Efecto de HA y de agonistas específicos sobre la proliferación de células de Leydig progenitoras	<b>115</b>
<b>3. DISCUSIÓN</b>	<b>118</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>124</b>
<hr/>	
<b>REFERENCIAS</b>	<b>127</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. SISTEMA ENDÓCRINO**

El sistema endócrino es uno de los sistemas principales que tiene el cuerpo para comunicar, controlar y coordinar el funcionamiento del organismo. Estas acciones son llevadas a cabo a través de mediadores químicos conocidos como hormonas, que son sintetizados y secretados por las glándulas endócrinas. Entre los órganos encargados de la síntesis de hormonas esteroideas, la glándula adrenal y el testículo resultan de particular relevancia ya que contribuyen al mantenimiento de funciones indispensables para la vida como lo son la homeostasis electrolítica y el metabolismo energético y la función reproductiva masculina, respectivamente.

### **1.1. Glándula adrenal:**

Las glándulas adrenales (o suprarrenales) de los vertebrados superiores son dos glándulas endócrinas ubicadas a ambos lados de la columna vertebral, sobre el polo superior de cada uno de los riñones. En un corte perpendicular a su superficie, se puede reconocer en ella dos regiones bien definidas estructural y funcionalmente: una periférica, llamada corteza adrenal, de origen mesodérmico y otra central, la médula, de origen neuroectodérmico (**Figura 1**).

La médula adrenal es un órgano neuroendócrino formado por células secretoras de catecolaminas, denominadas células cromafines por su tinción positiva frente al ácido crómico. Estas células se organizan en cordones irregulares alrededor de los vasos sanguíneos y elementos nerviosos. El control de la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) se hace por vía neural y no depende de la hipófisis.

La corteza adrenal forma la mayor parte de la glándula y se halla recubierta por una cápsula de tejido conectivo denso que envía tabiques hacia el interior por donde penetran los vasos. Es responsable de la producción de hormonas esenciales para la

vida, a saber, los mineralocorticoides encargados de la regulación de la homeostasis del agua y las sales; los glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en ratas) que controlan el metabolismo energético y la respuesta al estrés; y los andrógenos adrenales que contribuyen a la producción de esteroides sexuales.

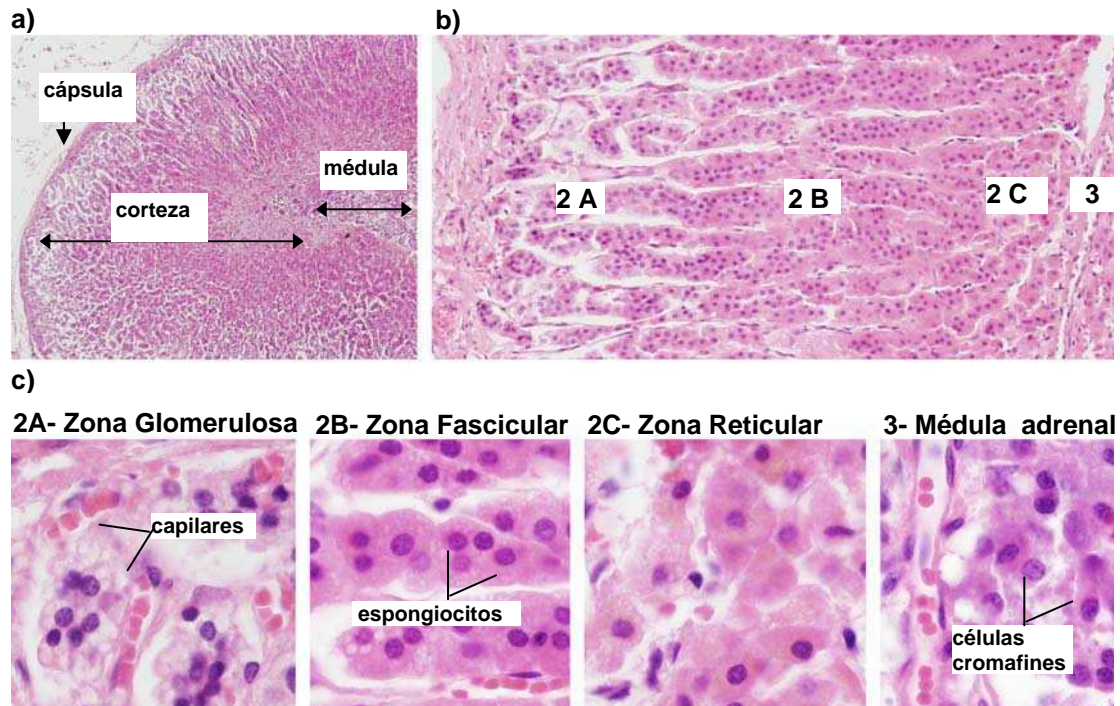
Dentro de la corteza las células se disponen en tres regiones bien definidas estructural y funcionalmente: la zona glomerulosa, cercana a la cápsula y constituida por células dispuestas en forma columnar responsables de la síntesis de mineralocorticoides; la zona fasciculada, formada por células poliédricas denominadas espongiocitos, dispuestas en cordones paralelos, donde se sintetizan los glucocorticoides y la zona reticular, formada por un entramado reticular de células productoras de andrógenos.

La sangre es distribuida desde una red de arteriolas presentes en el tejido conectivo capsular a través de finos sinusoides a la corteza y por medio de arteriolas a la médula (Pecci Saavedra y col, 1990).

En cuanto a la inervación de la glándula, si bien la mayoría de las terminaciones nerviosas llegan a la médula, y desde ella, los neuropéptidos alcanzan la corteza, actualmente es aceptado que la corteza adrenal recibe además una inervación directa derivada, al menos en parte, por el nervio esplácnico (Ehrhart-Bornstein y col, 2008).

Con respecto al suministro de HA en la glándula adrenal, las posibles fuentes serían aquellas provenientes de las células cromafines de la médula, de las terminaciones nerviosas de la inervación esplácnica y del aporte de los mastocitos que se disponen rodeando la arteria adrenal, en las cercanías de la cápsula (Borges, 1994).

## Glándula Adrenal



**Figura 1: Cortes histológicos de la glándula adrenal teñidos con hematoxilina-eosina. a)** Aumento 2 X. **b)** Aumento 10 X: 2A-Zona Glomerulosa; 2B-Zona fascicular; 2C-Zona reticular; 3-Médula adrenal. **c)** Aumento 40 X. Tomado de: Blue Histology. School of Anatomy and Human Biology -The University of Western Australia. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140>.

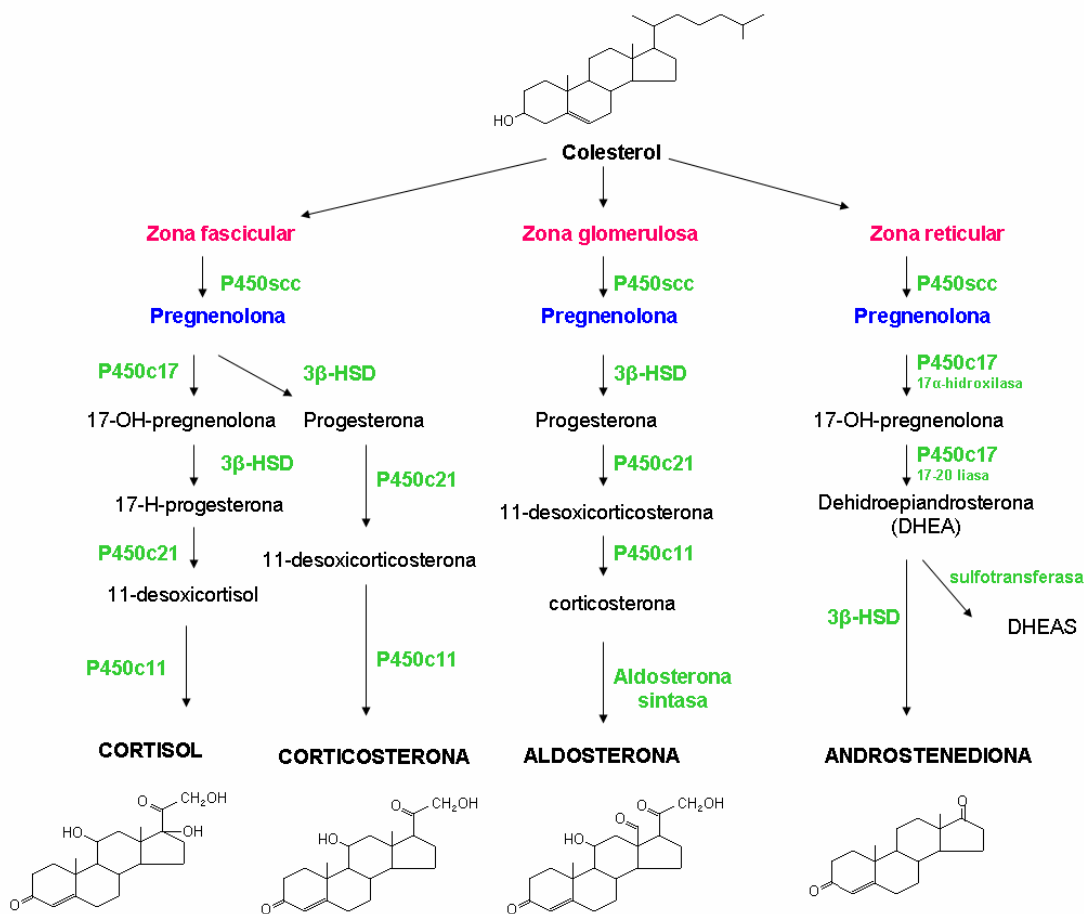
### 1.1.1. Esteroidogénesis adrenal

Al igual que otros tejidos esteroidogénicos, las distintas zonas de la glándula adrenal sintetizan sus esteroides a partir del mismo sustrato, el colesterol. Dicho sustrato puede provenir de lipoproteínas plasmáticas, de la síntesis de novo y de las reservas de colesterol intracelular, en forma de ésteres. En particular en las células adrenales, la mayor proporción de colesterol deriva de lipoproteínas plasmáticas así como de las formas esterificadas (Bisgaier y col, 1985; Vahouny y col, 1985).

En todos los casos, el paso limitante de la biosíntesis de esteroides es la transformación del colesterol a pregnenolona en una reacción catalizada por el complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol, dependiente de

citocromo P450 (P450<sub>scc</sub>; CYP11A). Para ello es necesaria la translocación previa del colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde se encuentra la enzima P450<sub>scc</sub>, por un mecanismo que involucra varias proteínas transportadoras, entre las cuales la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) es una de la más relevantes (Miller y Bose, 2011). En la corteza adrenal humana la síntesis de esteroides involucra la acción coordinada de cinco formas de citocromo P450 y la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), siendo la expresión diferencial de estas enzimas en cada una de las zonas córticoadrenales lo que determina el tipo particular de esteroide producido (**Figura 2**). En la zona glomerulosa, la síntesis de mineralocorticoides requiere la presencia de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), 21-hidroxilasa (P450<sub>c21</sub>; CYP21A2), 11 $\beta$ -hidroxilasa (P450<sub>c11 $\beta$</sub> ; CYP11B1) y aldosterona sintasa (P450<sub>c11AS</sub>; CYP11B2). La producción de glucocorticoides en la zona fasciculada requiere de la actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa del citocromo P450<sub>c17</sub> (CYP17). Finalmente tanto la actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa como la 17,20-liasa de P450<sub>c17</sub> así como la sulfoniltransferasa (SULT2A1) son necesarias para producir los precursores androgénicos dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEAS) en la zona reticular (Miller, 2008; Samandari y col, 2007).





**Figura 2: Síntesis de hormonas esteroideas en la corteza adrenal a partir de colesterol.**

En la corteza adrenal humana la síntesis de esteroides involucra la acción coordinada de cinco formas de citocromo P450 y la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD). Los principales esteroides producidos son cortisol (en primates) y corticosterona (en roedores), aldosterona y androstenediona.

La síntesis defectuosa de las hormonas esteroideas producidas por la corteza adrenal es causa de enfermedades que alteran gravemente la homeostasis corporal. Por ejemplo, la enfermedad de Addison, caracterizada por una insuficiencia adrenal crónica que conduce a lesiones progresivas de la glándula; el síndrome de Cushing, caracterizado por una hiperplasia adrenal que produce hipersecreción de hormonas corticoadrenales; la hiperplasia adrenal congénita que agrupa las enfermedades de

origen genético que afectan la expresión de genes involucrados en la esteroidogénesis adrenal (Bornstein y col, 2000; Ehrhart-Bornstein y col, 1998; Fluck y Miller, 2006).

### **1.1.2. Regulación de la esteroidogénesis adrenal**

La regulación de la función córticoadrenal es compleja y los mecanismos que regulan la producción de esteroides en cada zona son diferentes. La hormona adrenocorticotrofina (ACTH) secretada por el hipotálamo regula la producción de esteroides de la zona fasciculada y reticular mediante su interacción con un receptor asociado a una proteína G $\alpha$ s, denominado receptor 2 para melanocortina (MC2R). La activación de este receptor induce la síntesis de AMPc, lo que resulta en un aumento de la transcripción de genes de enzimas esteroidogénicas y en la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Stocco y col 2005). El efecto de ACTH sobre la producción de cortisol es fundamental en la regulación del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal, que a través de un sistema de retroalimentación negativa regula los niveles circulantes de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), ACTH y cortisol.

La secreción de mineralocorticoides en la zona glomerulosa es estimulada por un mecanismo diferente. Angiotensina II y III derivadas de la acción de la renina renal sobre el angiotensinógeno plasmático activan un receptor asociado a una fosfolipasa C, con la consecuente activación de una proteína quinasa C (PKC) y el incremento en los niveles de calcio intracelular. Estos eventos aumentan la actividad de P450<sub>scc</sub> e incrementan la producción de aldosterona, que regula la homeostasis electrolítica a nivel renal. Otro inductor importante de la secreción de aldosterona es el nivel de potasio. Éste actúa despolarizando la membrana plasmática de las células glomerulosas y abriendo canales de calcio dependientes de voltaje, lo que resulta en un incremento en los niveles citoplasmáticos de calcio y en la activación de las vías calcio dependientes (Rainey y col, 2004).

Además de los reguladores principales antes mencionados, existen otros factores intraadrenales que contribuyen a la modulación local de la esteroidogénesis adrenal. Entre ellos, los que provienen de las interacciones entre la médula y la corteza son de particular interés. Las catecolaminas secretadas por las células cromafines así como una variedad de neuropéptidos, entre los que figuran la sustancia P, el neuropéptido Y y la serotonina tienen un efecto inductor dominante, aunque su acción final depende de las interacciones con otros factores y de la situación fisiológica imperante. Por el contrario el péptido atrial natriurético inhibe la esteroidogénesis (Ehrhart-Bornstein y col, 1998).

Algunas citoquinas producidas a nivel local tanto por macrófagos de la médula como por las propias células adrenales también pueden influenciar directamente la esteroidogénesis adrenal ya sea estimulándola, como es el caso de la interleuquina 1, 2 y 6 (IL-1 IL-2 e IL-6) o inhibiéndola, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o interferón (IFN- ) (Bornstein y col, 2004).

Estos ejemplos demuestran que la capacidad de la glándula adrenal de responder flexiblemente a las demandas fisiológicas depende no sólo de la regulación hipofisaria sino también de la más sutil interacción que ejercen diversos factores intraadrenales.

### **1.1.3. Proliferación de la corteza adrenal**

La corteza adrenal se regenera con facilidad. Se admite que la zona glomerulosa junto con la región adyacente a la cápsula son las regiones progenitoras de la corteza (Vinson, 2003). Tanto angiotensina II como ACTH, además de regular la esteroidogénesis adrenal poseen efectos importantes sobre la proliferación y el desarrollo de la corteza adrenal a través de la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Foster, 2004). Parte de estas acciones serían mediadas por factores producidos localmente como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento símil-insulina (IGF) y el factor transformante

beta-1 (TGF- $\beta$ 1) que activarían vías mitogénicas, redundando en la inducción de factores de transcripción génicos como *c-fos* o *c-jun* (Bland y col, 2003; Ho y col, 1997).

#### **1.1.4. Tumores córticoadrenales**

Los tumores córticoadrenales tienen una prevalencia del 5 al 7% dentro de las patologías tumorales. Al igual que otros tipos de tumores pueden clasificarse en benignos (adenomas) o malignos (carcinomas) dependiendo de su capacidad invasiva. Los carcinomas córticoadrenales (ACC), con una incidencia anual de 1-2 casos nuevos por millón de personas representan sólo el 0,02% de todos los tipos de cáncer, por lo que constituyen una patología poco común aunque de mal pronóstico (van Ditzhuijsen y col, 2007). El mejor tratamiento para ACC es la resección total del tumor, con una tasa de supervivencia a 5 años del 49%, en contraste con el 9% que se alcanza con resecciones parciales. Entre los tratamientos no quirúrgicos, el mitotane, un agente adrenalítico, es comúnmente utilizado para tratar ACC no operables, metástasis y resecciones parciales, pero las tasas de supervivencia son aún menores (Maluf y col, 2011; Tacon y col, 2011).

La patogénesis de ACC no se conoce completamente. Sólo algunos factores mitogénicos adrenales han sido descritos y entre ellos la vía del IGF es el mejor caracterizado. Se ha reportado que IGF-2 actuaría de manera parácrina a través del receptor IGF-1 sustentando el desarrollo tumoral y la proliferación celular de la corteza adrenal (Fottner y col, 2004).

La relevancia funcional de otros sistemas en la patogénesis de ACC, como la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular (Stratakis y col, 2009), la deslocalización de  $\beta$ -catenina de la membrana celular con la consecuente activación anormal de la vía Wnt (Gaujox y col, 2011) y la disminución del ácido retinoico y sobreexpresión de p53 aún no ha sido bien determinada (Ragazzon y col, 2011).

## **1. 2. Testículo**

Los testículos de los mamíferos son órganos pares alojados fuera del abdomen, contenidos en una bolsa escrotal, situada por detrás del pene. Su función principal es la producción de espermatozoides y la síntesis de andrógenos que mantienen los caracteres sexuales secundarios y contribuyen a la generación de un medio adecuado para el desarrollo de la espermatogénesis.

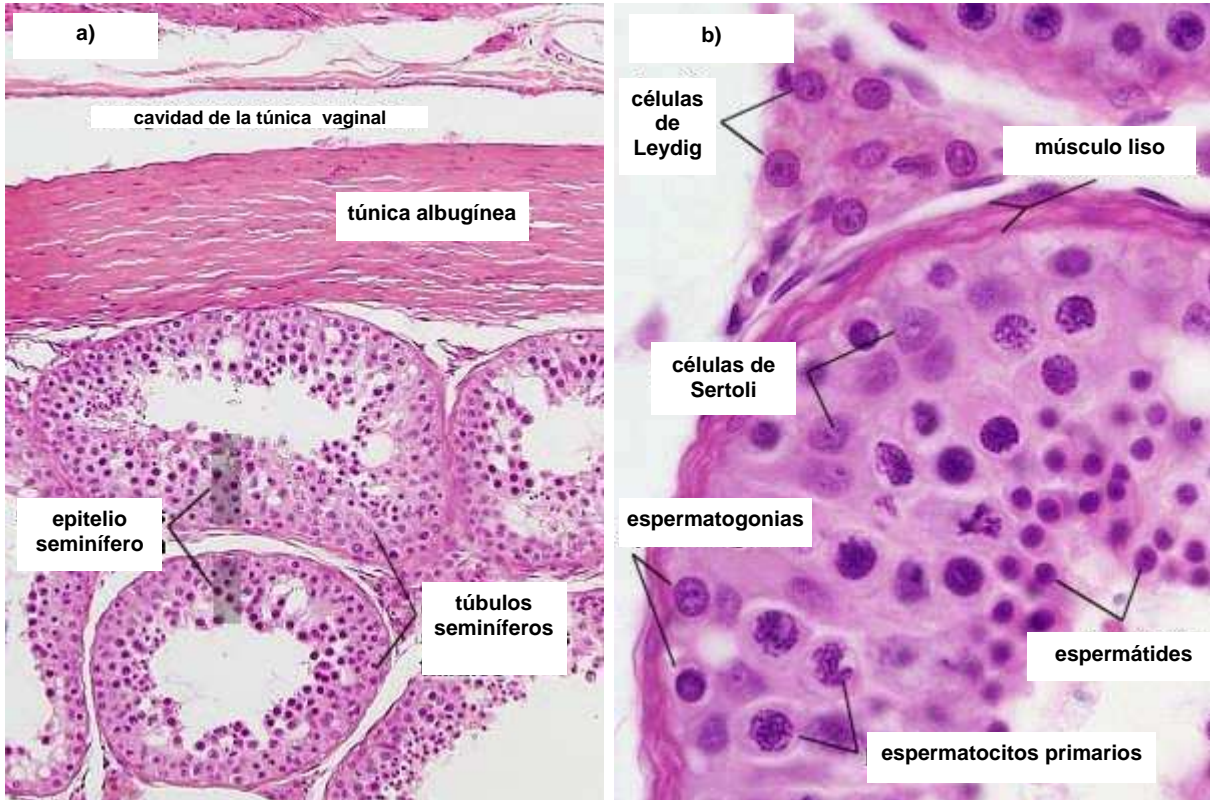
Cada testículo está cubierto por una capa de tejido conectivo denominada túnica albugínea por la que circulan los vasos sanguíneos. Esta capa está a su vez dividida en numerosos lóbulos por tabiques fibrosos denominados septos testiculares. Dentro de cada lóbulo se encuentran distribuidos entre 3 a 10 túbulos denominados túbulos seminíferos que desembocan a través de túbulos rectos en las cavidades denominadas rete testis en el mediastino testicular. Dentro de los túbulos seminíferos se encuentran dos estirpes celulares: las células germinales, que darán origen a los espermatozoides en un proceso denominado espermatogénesis, y las células de Sértoli que, apoyándose sobre la membrana basal del túbulo y rodeando con sus proyecciones citoplásmicas a las células germinales actúan como su sostén (Pecci Saavedra y col, 1990).

Los espacios comprendidos entre los túbulos seminíferos están ocupados por un tejido conectivo laxo donde se encuentran los vasos sanguíneos y linfáticos así como las células de Leydig, responsables de la función endócrina del testículo. Estas células aparecen aisladas o formando grupos de tamaños variables. Son células relativamente grandes (20  $\mu\text{m}$ ), poliédricas, con abundante retículo endoplasmático liso, núcleo redondeado y nucleolos prominentes (**Figura 3**).

Además de las células de Leydig, en el compartimiento intersticial existen otras poblaciones celulares: macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos y mastocitos, como así también terminales nerviosas tanto adrenérgicas y colinérgicas como peptidérgicas (Mayerhofer y col, 1996). Poco se sabe aún de su función. Sin

embargo, en los últimos años se ha centrado la atención en estos tipos celulares como potenciales elementos regulatorios parácrinos del desarrollo y mantenimiento de las funciones testiculares.

**Testículo**



**Figura 3: Cortes histológicos de testículo teñidos con hematoxilina-eosina. a)** Aumento 20 X; **b)** Aumento 40 X. Tomado de: Blue Histology - Male Reproductive System. School of Anatomy and Human Biology -The University of Western Australia. [http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb14\\_0/CorePages/MaleRepro/malerepro.html](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb14_0/CorePages/MaleRepro/malerepro.html)

**1.2.1. Células de Leydig**

Como se mencionó anteriormente, las células de Leydig (CL) se encuentran presentes en el intersticio testicular y son las responsables de la síntesis de testosterona en la gónada masculina.

En los mamíferos, dos generaciones de CL pueblan el testículo. La primera se desarrolla durante el período embrionario y sus células reciben el nombre de células de Leydig fetales (CLF) (Yao y Barsoum, 2007). Estas células son responsables de la síntesis de testosterona necesaria para la diferenciación del sistema urogenital masculino durante la gestación. La segunda generación de CL, llamadas células de Leydig adultas (CLA), se forman en el testículo postnatal, durante la pubertad, y son responsables de la síntesis de testosterona necesaria para la espermatogénesis y el mantenimiento de la función reproductiva masculina (Svechnikov y col, 2010).

Si bien ambas generaciones de CL se superponen y las CLF persisten en la vida adulta (alrededor de un 1% del número total de CLA), su contribución a la producción hormonal en el testículo adulto no es significativa (Benton y col, 1995).

### **1.2.2. Células de Leydig adultas**

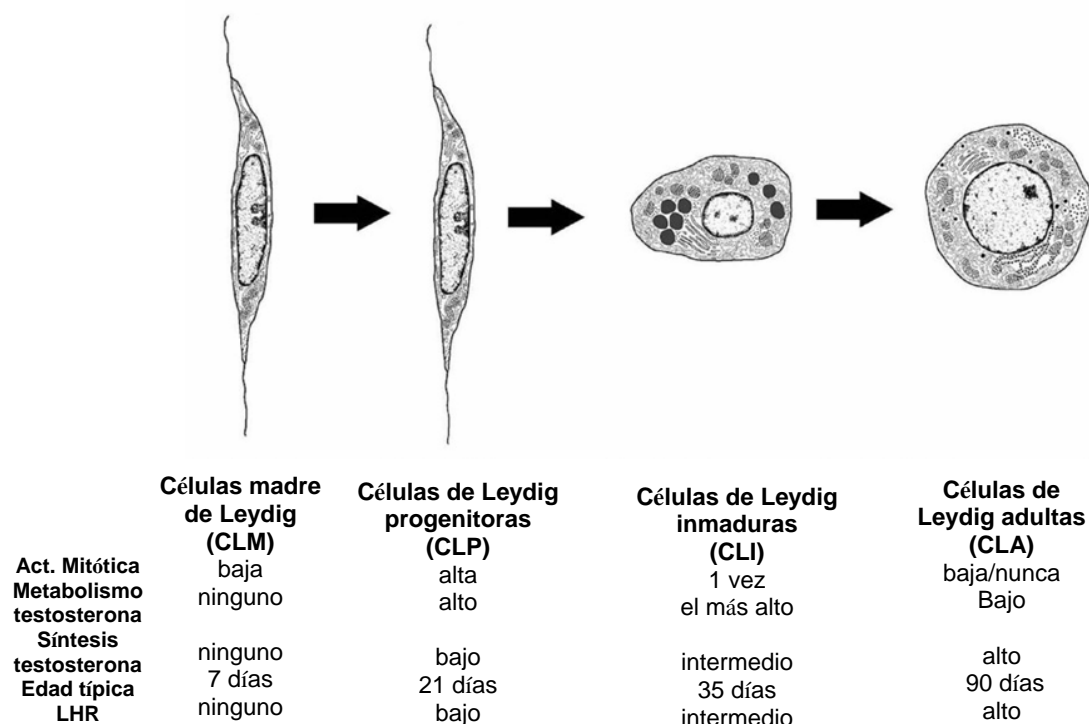
Las células de Leydig adultas (CLA) se desarrollan a partir de células indiferenciadas tipo mesenquimáticas, presentes en el intersticio testicular posnatal, conocidas como células madre de Leydig (CLM). A partir del día 7 post-natal (PN) en la rata, estas células, reconocidas por su forma ahusada y su tinción positiva para la enzima  $3\beta$ -HSD, proliferan activamente e inician el camino de diferenciación hacia el linaje de CL a través de un proceso finamente regulado que involucra el tránsito por tres estadios diferentes hasta alcanzar la madurez completa: células de Leydig progenitoras (CLP), células de Leydig inmaduras (CLI) y células de Leydig adultas (CLA) (Benton y col, 1995; Chen y col, 2009). Las características celulares más destacadas de cada estadio de desarrollo se resumen en la **Figura 4**.

A partir de los días PN 14 a 18 se hacen reconocibles las CLP, que mantienen la morfología ahusada característica de las CLM pero a diferencia de ellas comienzan a expresar receptores para LH y a producir bajos niveles de testosterona. En este estadio las células tienen una alta actividad mitótica.

Para el día PN 28, las CLP adquieren una forma redondeada, presentan numerosas inclusiones lipídicas en el citoplasma y forman la población de CLI. El retículo endoplásmico se expande, conforme aumenta la síntesis de testosterona y su metabolismo y se incrementan los niveles de expresión de las proteínas involucradas en la esteroidogénesis ( $3\beta$ -HSD, P450scy P450c17), siendo el principal esteroide producido el  $5\alpha$ -androstano- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol. La actividad mitótica baja notablemente ya que en promedio estas células llegan a duplicarse sólo una vez entre los días PN 28 a 56.

A partir del día PN 56 las CLI se han dividido hasta alcanzar la población final de CL del testículo (alrededor de 25 millones de CLA por testículo). Se reduce el metabolismo de los andrógenos y la expresión de las enzimas responsables de la síntesis de testosterona continúa aumentando, lo que redundo en la producción de testosterona como principal esteroide. Morfológicamente poseen un retículo endoplásmico más prominente que las CLI y menor cantidad de inclusiones lipídicas. Las CLA no proliferan normalmente pero pueden regenerarse atravesando la misma secuencia de estadios a partir de precursores de tipo mesenquimáticos cuyo origen aún no está claro, si la población adulta original es eliminada (Mendis-Handagama y col, 2001; Teerds y Rijntjes, 2007).





**Figura 4: Estadios de desarrollo de las células de Leydig adultas.** En el gráfico representativo se observan los estadios de células madre de Leydig, células de Leydig progenitoras, inmaduras y adultas. Las características más relevantes de cada tipo celular se indican en la figura. Modificado de Benton y col (1995).

### 1.2.3. Regulación del desarrollo de células de Leydig adultas

Las células de Leydig adultas (CLA) se originan en el testículo prepuberal a partir de precursores mesenquimáticos (CLM) que inician la transición a través de los distintos estadios de desarrollo hasta alcanzar la madurez completa. Este tránsito involucra procesos de diferenciación y proliferación que son regulados por distintas hormonas y factores de crecimiento locales. Entre las primeras se encuentra la hormona luteinizante (LH) que, si bien no es un factor mitogénico esencial para los precursores mesenquimáticos o la diferenciación a CLP, es necesaria para promover la diferenciación desde CLP a estadios madurativos más avanzados y para mantener y establecer una capacidad esteroidogénica completa (Shiraishi y Ascoli, 2007; Sriraman

y col, 2003; Teerds y col, 2007). La testosterona y los estrógenos son inhibitorios sobre la proliferación de los precursores, contribuyendo a mantener estable el número de CLA que se alcanza en la madurez completa (Wu y col, 2007). Por otra parte, la hormona tiroidea (TH) ejercería un efecto dual inhibiendo la proliferación de SCL e induciendo su diferenciación a CLP (Teerds y col, 1998; Wagner, 2008). Los andrógenos tienen un rol esencial en la auto-regulación de la maduración del linaje de CL en particular durante el estadio de CLI, donde los receptores de andrógenos son más abundantes. Un elemento fundamental en el proceso de proliferación de CLI y de su diferenciación a CLA es el factor de crecimiento insulino-simil 1 (IGF-1) como lo demuestra la reducción en el número de CL y los bajos niveles de testosterona reportados en los modelos de ratones IGF-1<sup>-/-</sup> (Hu y col, 2010; Wang y Hardy, 2004).

Además del IGF-1, los factores de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ) participan en el proceso de desarrollo de CLA estimulando la mitosis en presencia de LH. A los factores antes mencionados se sumarían otros cuya participación en el desarrollo de CLA aún no está clara. Entre ellos, la función de la hormona foliculo estimulante (FSH) es aún controversial, resta confirmar el efecto negativo sobre la diferenciación sugerido para la hormona Anti-Mulleriana y estudiar la función que desempeñarían algunas citoquinas secretadas por macrófagos testiculares (Ge y Hardy, 2007).

## 2. HISTAMINA

Histamina (HA) es, con un peso molecular de 111 Da, una de las biomoléculas más pequeñas presentes en el organismo. Está compuesta por un anillo imidazólico y un grupo amino, unidos por dos grupos metileno. Esta amina biógena es sintetizada a partir del aminoácido L-histidina a través de una reacción de decarboxilación catalizada por una única enzima, la L- Histidina Decarboxilasa (HDC) (Noszál y col, 2004).

HA es sintetizada por varios tipos celulares, entre ellos células enterocromafines de la mucosa gástrica, macrófagos, linfocitos, neuronas y tumores, siendo los principales productores los mastocitos y los basófilos, quienes además de sintetizarla pueden acumularla en gránulos citoplasmáticos y liberarla por exocitosis en respuesta a varios estímulos (alérgenos, drogas, frío, estímulos mecánicos, etc) (Dy Schneider, 2004).

Desde su descubrimiento en el año 1910 por Sir Henry H Dale hasta la actualidad, a HA se le han adjudicado numerosas funciones biológicas, siendo las mejores caracterizadas su influencia sobre la respuesta inflamatoria, la regulación de la secreción de ácido gástrico, la neurotransmisión y la modulación del sistema inmune. Esta gran diversidad funcional se debe, en parte, a su capacidad de unión a cuatro subtipos de receptores (H1, H2, H3 y H4), todos ellos pertenecientes a la familia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR) y asociados a distintas vías de señalización intracelular (Jones y Kearns, 2011).

### 2.1. Biosíntesis de Histamina

L- Histidina decarboxilasa (HDC) es la única enzima capaz de sintetizar HA a través de una reacción que involucra un solo paso: la decarboxilación del aminoácido L-histidina (**Figura 5**). En mamíferos, la enzima HDC es dependiente de piridoxal fosfato (PLP) y se expresa en una gran variedad de tejidos como estómago, bazo, cerebro, timo, riñón, hueso y, en altas concentraciones, en el hígado de embriones en desarrollo (Karlsted y col, 2001).

El gen de HDC, localizado en el cromosoma 15 en humanos, 2 en ratones y 3 en ratas, codifica para una proteína de 74 kDa que posee un alto porcentaje de homología entre las tres secuencias aminoacídicas: 92% en la región amino-terminal, y 70% en la región carboxi-terminal. Este producto proteico, de vida media corta, es modificado post-traduccionalmente por degradación proteolítica dando lugar a varias

isoformas activas en el rango de 53-55 kDa, que en la mayoría de las células se encuentran formando homodímeros (Darvas y Falus, 2004).

La expresión de HDC es regulada a nivel transcripcional por varios factores, como gastrina, LPS, ésteres de forbol, estrés oxidativo e infecciones bacterianas que activan distintos factores de transcripción que actúan sobre elementos regulatorios negativos o positivos, específicos para cada tipo celular (Dimoline y Baxendale, 1998). La configuración del cromosoma, influenciado por el grado de acetilación de histonas así como el estado de metilación del ADN, también contribuyen a la expresión célula y tejido específica de esta enzima (Ai y col, 2006)

HDC es una enzima sumamente inestable, lo cual dificulta sobremanera su caracterización y purificación. La degradación de HDC es dependiente de ATP, y ocurre a través de la vía Ubiquitina-Proteosoma 26S. Al respecto, el análisis de la secuencia de HDC de mamíferos ha revelado la existencia de regiones PEST (ricas en Prolina, Ácido Glutámico, Serina y Treonina) en los extremos carboxilo y amino terminal. También se ha demostrado la existencia de otro mecanismo de degradación de la enzima, independiente de ATP, que involucra la cisteín-proteasa m-calpaína. Así, la existencia de más de un mecanismo de degradación de HDC hace que el proceso ocurra de modo rápido y eficiente (Darvas y Falus, 2004).

La generación de un ratón KO para la enzima HDC (HDC<sup>-/-</sup>) permitió confirmar la relevancia de esta enzima y de la HA en funciones “clásicas” como la estimulación de la secreción de ácido gástrico, la contracción del músculo liso y el incremento en la permeabilidad vascular. Al mismo tiempo, reveló otras funciones para HA en procesos como angiogénesis, ciclo sueño-vigilia, diferenciación de células hematopoyéticas, esteroidogénesis y osteogénesis, que en la actualidad están siendo activamente estudiados (Ohtsu, 2010).

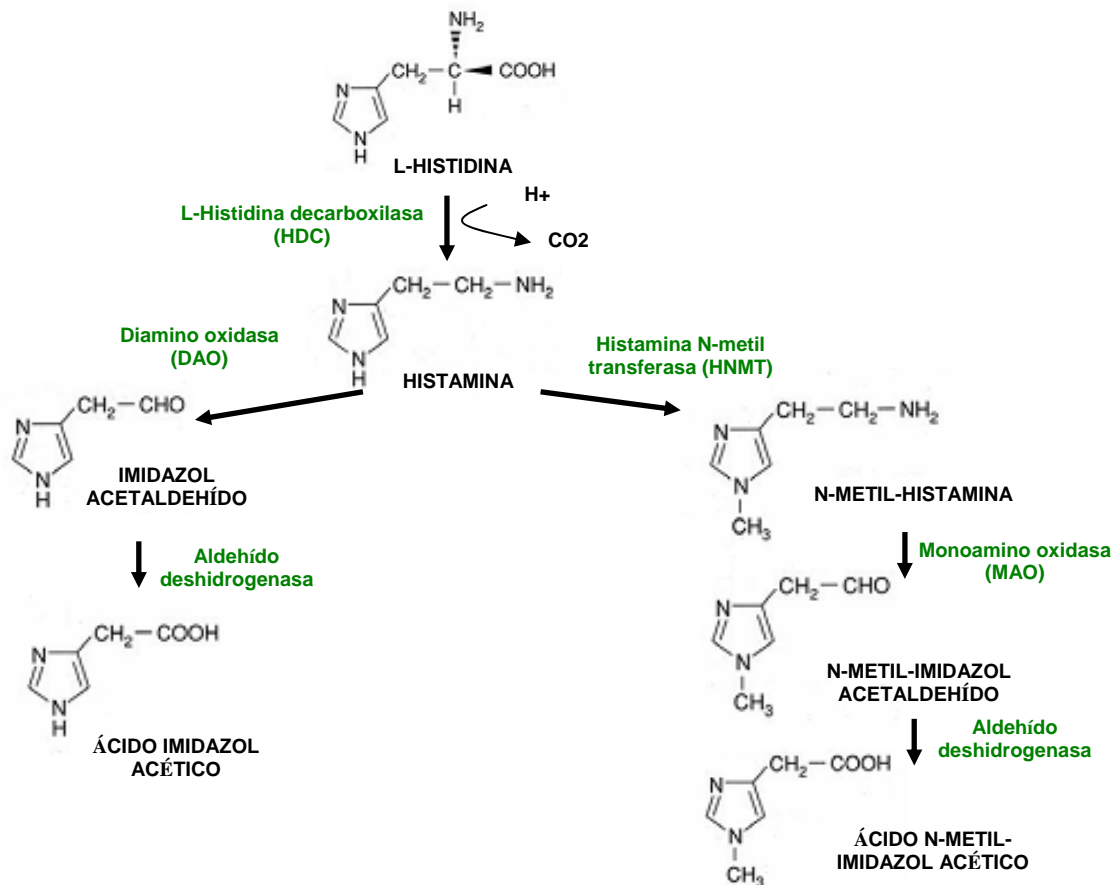
## **2.2. Catabolismo de Histamina**

Una vez liberada, HA es rápidamente metabolizada por medio de dos vías alternativas: la metilación de su anillo imidazólico, en una reacción catalizada por la enzima histamina N-metiltransferasa (HNMT) o la desaminación oxidativa del grupo amino primario, a cargo de la enzima diamino oxidasa (DAO) (**Figura 5**).

HNMT es una proteína citosólica soluble, cuya expresión ubicua es particularmente alta en riñón, hígado, bazo, colon, próstata y ovario. Esta enzima es responsable del 50-80% de la biotransformación de HA y es fundamental en el epitelio bronquial y en el sistema nervioso para dar término a las acciones de esta amina. Es altamente específica, y cataliza la transferencia de un grupo metilo desde una S-adenosil-L-metionina a HA, dando lugar al compuesto biológicamente inactivo N -metilhistamina que posteriormente es metabolizado por monoamino oxidasas y aldehído deshidrogenasas a ácido acético imidazólico, excretado en la orina.

DAO, es una glicoproteína soluble que se almacena en vesículas asociadas a la membrana plasmática de células epiteliales y es secretada a la circulación en respuesta a un estímulo. A diferencia de HNMT, es responsable de la desaminación de varios sustratos, entre ellos, HA. Esta enzima, expresada principalmente en riñón y colon, está asociada al catabolismo de la HA liberada al medio extracelular por la activación de mediadores y a la detoxificación de HA ingerida en la dieta. DAO convierte a HA en acetaldehído imidazol que se transforma en ácido imidazólico y se conjuga con ribosa fosfato eliminándose también a través de la orina.

Resta aún determinar la contribución relativa de DAO y HNMT a la inactivación de HA, sobre todo en aquellas células que expresan ambas enzimas (Schwelberger, 2004).



**Figura 5: Biosíntesis y catabolismo de histamine.** HA es sintetizada por decarboxilación a partir de L-histidina en un areacción catalizada por la enzima histidina decarboxilasa (HDC). El catabolismo de HA es llevado por desaminación oxidativa por medio de la enzima diamino oxidasa (DAO) o por mutilación del anillo inidazólico por la histamina N-metil transferasa (HNMT).

### 2.3. Receptores para HA y funciones biológicas generales

Existen cuatro subtipos de receptores para HA, denominados de acuerdo a la cronología de su descubrimiento como H1, H2, H3 y H4. A pesar de poseer una baja homología en su secuencia nucleotídica, todos ellos comparten la capacidad de unir HA y pertenecen a la familia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteínas G (**Figura 6**).

### **2.3.1. Receptor subtipo H1**

El gen para el receptor para HA subtipo H1 está localizado en el cromosoma 3 en humanos, y codifica para una proteína de 56 kDa con 487 aminoácidos. Se expresa en varios tipos celulares, incluyendo células del músculo liso de las vías aéreas y de los vasos, hepatocitos, condrocitos, células endoteliales, neutrófilos, células dendríticas, monocitos, linfocitos B y T (Igaz y Hegyesi, 2004).

El receptor H1 está asociado a una proteína Gαq/11 y la unión con su ligando desencadena la activación de una fosfolipasa C (PLC), generando inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros. IP3 media rápidamente la liberación de Ca<sup>2+</sup> de depósitos intracelulares, y el DAG activa a una serina/treonina kinasa, la proteína quinasa C (PKC), que puede a su vez fosforilar y activar otros factores y proteínas celulares (Lázár-Molnár, 2004). En algunos sistemas se ha reportado la capacidad de este receptor para modificar los niveles de AMPc (aumentándolos o disminuyéndolos), a través de mecanismos que no involucrarían la activación directa de la enzima adenilato ciclasa (Hill y col, 1997). A su vez, se ha descrito que el receptor H1 puede incrementar constitutivamente los niveles de IP3 y activar al factor nuclear κB (NF-κB), un factor transcripcional involucrado en la inflamación, por acción de la subunidad Gβγ (Bongers y col, 2010).

El receptor H1 está involucrado en procesos alérgicos, como asma, conjuntivitis, rinitis alérgica, urticaria, dermatitis atópica y anafilaxis (Thurmond y col, 2008). En el pulmón media la broncoconstricción y aumenta la permeabilidad vascular (Togias, 2003). A nivel del sistema nervioso central, media los efectos de HA sobre el ciclo de sueño-vigilia (función descubierta como efecto secundario de los antihistamínicos de primera generación, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica) (Thakkar, 2011).

El ratón KO para H1 es viable y fértil, sin embargo muestra alteraciones en la respuesta inmune, actividad locomotora y comportamiento exploratorio, poniendo de

manifiesto la participación de este receptor en numerosas acciones mediadas por HA (Inoue y col, 1996).

### **2.3.2. Receptor subtipo H2:**

El receptor H2 fue descubierto a partir de funciones de HA que no podían ser antagonizadas por los antihistamínicos para H1. El gen está ubicado en el cromosoma humano 5 y codifica para una proteína de 40 kDa con 359 aminoácidos (Igaz y Hegyesi, 2004).

Al igual que el receptor H1 se expresa en una gran variedad de tejidos, entre ellos, la mucosa gástrica, músculo liso cerebro, adipocitos y células del sistema inmune. Entre las funciones a las que está asociado, la regulación de la secreción del ácido gástrico es una de las más conocidas. También participaría en la regulación de la proliferación celular, en particular en carcinomas y tendría una función inmunoreguladora, inhibiendo la quimiotaxis de neutrófilos y basófilos (Del Valle y Gantz, 1997).

En cuanto a la vía de señalización que activa, numerosos trabajos reportan el acople de H2 a AC, a través de una proteína Gs. Así, la activación de H2 induce un importante aumento en los niveles intracelulares de AMPc en la mayoría de los sistemas estudiados, como cerebro, corazón, pulmón, mucosa gástrica, basófilos, neutrófilos (Leurs y col, 1995). El AMPc actúa como segundo mensajero activando PKA, que fosforila proteínas celulares específicas. Además de estimular la producción de AMPc, la activación de H2 en células parietales gástricas indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> e incremento en los niveles de IP<sub>3</sub>, debidos probablemente a la activación de PLC. A diferencia de lo reportado para otros receptores que activan más de un camino de señalización intracelular, una misma concentración de HA es capaz de estimular ambas vías a través de H2 (Wang y col, 1998).



### **2.3.3. Receptor subtipo H3**

El receptor subtipo H3 para HA fue descubierto en 1983 (Arrang y col, 1983). Es una proteína de 49 kDa con 445 aminoácidos y el gen que lo codifica está ubicado en el cromosoma 20 en humanos. A diferencia de los genes para H1 y H2, que no poseen intrones, el gen para H3 contiene al menos tres intrones, dando lugar en humanos y ratón a tres isoformas de este subtipo de receptor por splicing alternativo.

El receptor H3 está asociado a una proteína Gi/o cuya activación induce una inhibición de la producción de AMP cíclico, acumulación de Ca<sup>2+</sup> y la activación de la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

El receptor H3 se expresa mayoritariamente en células del sistema nervioso, donde inhibe la liberación de HA por las células histaminérgicas. Se sugiere su participación en la liberación de otros neurotransmisores como dopamina, serotonina, noradrenalina y acetilcolina, en procesos cognitivos y de memoria (Esbenshade y col, 2008) y en funciones cerebrales como la regulación del ciclo sueño-vigilia (Lin y col, 2011) y la ingesta de alimento (Passani y col, 2011; Tiligada, 2009).

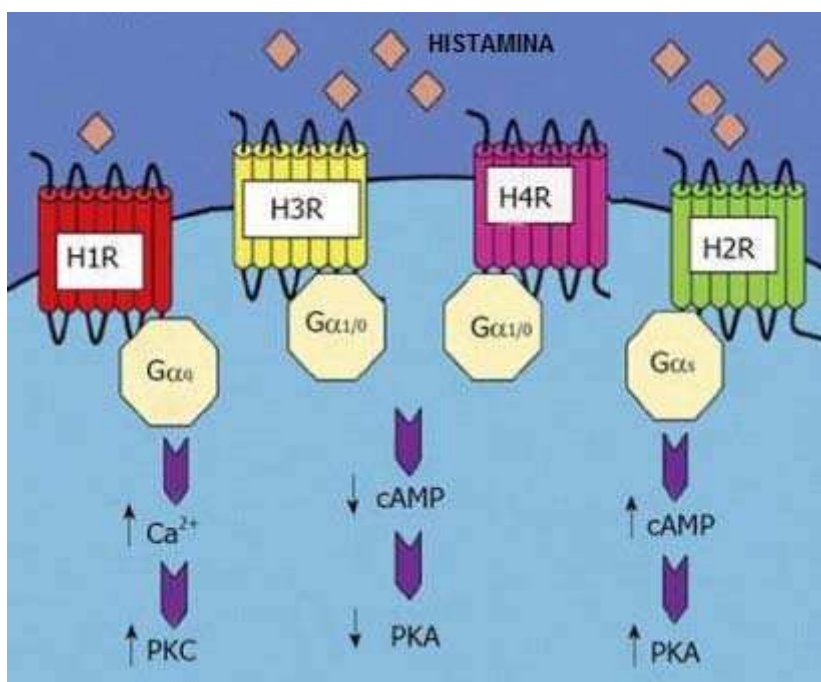
La presencia de HRH3 no está restringida al sistema nervioso central. Mediante ensayos de unión de radioligando, se han identificado sitios de unión a H3 en otras células y tejidos periféricos, aunque son cuantitativamente menos abundantes que los sitios de unión a H1 y H2. En el tracto gastrointestinal, H3 media la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios (acetilcolina) o inhibitorios (noradrenalina, somatostatina) del plexo mesentérico. En este caso, las evidencias indican que la vía AC/AMPc no estaría involucrada en la transducción de la señal del receptor (Lázár-Molnár, 2004).

### **2.3.4. Receptor subtipo H4**

El último de los receptores para HA, el receptor H4, fue descubierto a partir del análisis genómico de la secuencia del receptor H3. Ambos están cercanamente relacionados tanto estructural (37-43% de homología en su secuencia) como farmacológicamente. El receptor H4 es una proteína de 44 kDa con 390 aminoácidos y el gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 18 en humanos (Igaz y Hegyesi, 2004).

Al igual que el receptor H3, el H4 está acoplado a una proteína Gi/o, que inhibe la AC, reduciendo los niveles de AMPc intracelular. También se ha sugerido que HRH4 podría tener actividad constitutiva, esto último basado en los niveles más bajos de AMPc basal o estimulados por FSK en células transfectadas con cDNA de HRH4, en comparación con células no transfectadas (Lázár-Molnár, 2004).

Su patrón de expresión se circunscribe principalmente a células de la médula ósea, en basófilos, eosinófilos, monocitos y células T (Zampeli y Tiligada, 2009). Incluso se ha descrito su expresión en los propios mastocitos, donde mediarían procesos quimiotáxicos (Yu y col, 2008). Aunque su caracterización es reciente, hasta el momento se lo ha implicado en varios fenómenos inflamatorios, asma, prurito y alergias, lo que sugiere que este receptor desempeñaría una función relevante a nivel inmunológico (Cowden y col, 2010; Zhang y col, 2007).



**Figura 6: Receptores para histamina.** Esquema representativo de los distintos subtipos de receptores para histamina conocidos y las principales vías de señalización asociadas. Modificado de Demorrow y col. (2007).

#### 2.4. Histamina en proliferación y diferenciación celular:

Las primeras hipótesis de la participación de HA en eventos proliferativos y de diferenciación celular surgieron motivadas por la estrecha relación entre fenómenos inflamatorios prolongados y génesis tumoral y a partir de observaciones de altos niveles de actividad de HDC en distintos tejidos durante el desarrollo fetal de mamíferos (Karlstedt y col, 2001).

Varios trabajos sugieren la participación de HA tanto en procesos proliferativos fisiológicos como patológicos. Entre los primeros, se ha reportado que en la mucosa gástrica HA es capaz de inducir la proliferación y migración de células secretoras de mucus a través de la activación del receptor H3 (Morini y col, 2002). Asimismo, se ha visto que durante la supresión continuada de secreción de ácido gástrico, HA es capaz

de de inducir la proliferación de células enterocromafines mediante un mecanismo que depende del receptor H1 (Chen y col, 2000; Modlin y col, 1996).

En células hematopoyéticas, a través del receptor H2, HA ejerce un efecto diferencial sobre la proliferación de precursores de granulocitos, sin afectar otros linajes. Este mismo receptor es también responsable de la proliferación y la migración de fibroblastos en los procesos fibróticos. La proliferación normal de otros tejidos como la glándula mamaria, el útero y la piel también sería modulada por esta amina (Falus y col, 2011).

Con respecto al rol de HA en la diferenciación celular, en el sistema nervioso central de ratas se ha visto que HA contribuye a la neurogénesis a través de la activación de dos subtipos de receptores: el receptor H2 promueve la proliferación de precursores neuronales, mientras que el H1 favorece su diferenciación hacia el destino neuronal final (Molina-Hernandez y Velasco, 2008). También se ha reportado la influencia de HA en los procesos de remodelación ósea, actuando a través de los receptores H1 y H2 sobre osteoclastos y osteoblastos (Ikawa y col, 2007) y en la diferenciación de células de la mucosa gástrica y de células hematopoyéticas (Nozaki y col, 2009; Schneider y col, 2011).

En cuanto a la participación de HA en la proliferación tumoral, su efecto depende del tipo celular, del balance entre los diferentes subtipos de receptores que expresa, de la concentración de HA y de los efectores que son activados. Por ejemplo, en líneas tumorales de melanoma HA aumenta la proliferación a través del receptor H2 y la inhibe vía el receptor H1, por lo que la respuesta final depende del balance de dichos receptores. En carcinomas pancreáticos, HA posee un efecto dual; bajas concentraciones aumentan la proliferación, mientras que altos niveles de la amina inhiben el crecimiento por arresto celular. En la línea de cáncer de próstata DU-145 HA inhibe la proliferación vía el receptor H1 (Falus y col, 2010).

En cáncer de colon se ha visto que la actividad de HDC es más alta en comparación con tejidos normales y que el tratamiento con antagonistas H2 es capaz de inhibir la proliferación mediada por HA. En cáncer de mama HA ejercería un efecto similar, induciendo la proliferación a través de un mecanismo autócrino y actuando vía H1 y H2 (Pós y col, 2004).

Más recientes son los estudios de la participación del receptor H4 en los eventos de proliferación patológica. Al respecto, se ha visto que varios tejidos y líneas tumorales expresan este subtipo de receptor. En líneas celulares de melanoma, cáncer de páncreas y de mama, la activación del receptor H4 está asociado a la inhibición de la proliferación celular, resaltando un posible rol en procesos de senescencia, apoptosis y determinación del potencial metastásico tumoral (Medina y col, 2011).

### **2.5. Histamina y glándula adrenal**

Se ha demostrado que HA es capaz de regular la esteroideogénesis adrenal de ratas y perros actuando a nivel del sistema nervioso central a través del receptor H1 por medio de un mecanismo que, al menos en parte, sería independiente de ACTH (Bugajski y col, 1984; Tsujimoto y col, 1993). Por otro lado, se sabe que las células cromafines de la médula adrenal son capaces de responder a HA por medio del receptor H1, estimulando la secreción de catecolaminas y diversos neuropéptidos que, a su vez, actuarían en forma parácrina sobre las células de la corteza adrenal regulando la secreción de cortisol (Bunn y Boyd, 1992). Estos antecedentes apoyan un efecto indirecto de HA sobre la regulación de la esteroideogénesis adrenal, sin embargo la bibliografía concerniente a un posible efecto directo de esta amina sobre las células córticoadrenales es controversial. Estudios basados en ensayos de perfusión de glándulas adrenales o cultivos primarios hacen referencia a un efecto directo de HA sobre la secreción de cortisol (Aikawa y col, 1986; Matsumoto y col, 1981), mientras que otros postulan la acción directa de esta amina sólo

sobre las células cromafines (Orso y col, 1997; Yoshida y col, 1997). Hasta el momento no se han reportado ensayos que contemplen el estudio de una posible acción directa de HA sobre líneas celulares córticoadrenales puras, lo que permitiría definir la situación en forma inequívoca.

Como se mencionó previamente, en los últimos años ha cobrado relevancia el estudio de la participación de HA en procesos de proliferación, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Falus y col 2011; Medina y Rivera, 2010). Se ha demostrado que dicha amina puede actuar como inductor o inhibidor de la proliferación, dependiendo del tipo celular y del conjunto de subtipos de receptores que la célula exprese (Meng y col, 2011; Pettit-Bertrom y col, 2009; Cricco y col 2006, Stoyanob y col, 2011, Francis et al, 2008).

De nuestro particular interés, en un trabajo reciente Szabó y col (2009) compararon la expresión de genes y proteínas relacionadas con HA en muestras de tejido córticoadrenal humano normal y tumoral, hallando que tanto la expresión de HDC como el contenido de HA eran altos en los tejidos normales, bajos en los tumores benignos y significativamente menores en los carcinomas córticoadrenales (Szabó y col, 2009).

### **2.6. Histamina y células de Leydig adultas**

Los primeros indicios del efecto de HA como modulador de la esteroidogénesis testicular datan del año 1989, cuando Mayerhofer y colaboradores describieron una acción estimuladora de la amina, mediada por H1, sobre la síntesis de testosterona en parénquima testicular de hámster dorado (Mayerhofer y col, 1989). En nuestro laboratorio se extendieron las observaciones de Mayerhofer y colaboradores a células de Leydig de rata y ratón, caracterizándose por primera vez los receptores H1 y H2, y demostrándose un efecto dual de HA sobre la esteroidogénesis aguda (Mondillo y col,

2005) que interesantemente fue luego confirmado en CL de lagartos (Khan y col, 2007).

Respecto al citado efecto dual, altas concentraciones de HA modularían negativamente la síntesis de esteroides a través del receptor H1, mientras que bajas concentraciones producirían una inducción mediada por la activación del receptor H2 (Mondillo y col, 2005 y 2009). A su vez, estudios posteriores llevados a cabo en ratones HDC<sup>-/-</sup> demostraron que la ausencia prolongada de HA afecta varios aspectos fisiológicos de las CL, entre ellos su respuesta a hCG (Mondillo y col, 2007). Así, las evidencias señalan que HA desempeñaría un rol importante como modulador directo de la esteroidogénesis testicular.

Sumado a lo anterior, Albretch y colaboradores han descrito en el testículo humano la existencia de interacciones entre diversos tipos celulares capaces de expresar receptores de HA y células productoras de dicha amina, apoyando la hipótesis de la presencia de un sistema histaminérgico en el ambiente testicular (Albretch y col, 2005).

De particular interés para este trabajo, se ha sugerido que HA cumpliría un papel importante en la maduración del testículo, contribuyendo al proceso de diferenciación de CL. Al respecto, Pap y colaboradores reportaron que ratones HDC<sup>-/-</sup> poseen testículos de tamaño significativamente menor a los de ratones de genotipo salvaje, tanto en edad adulta como prepuberal. A su vez, las células de Leydig de los primeros presentan un alto contenido de inclusiones lipídicas en el citoplasma, sumado a otras características morfológicas de células de Leydig inmaduras (Pap y col, 2002). A estas evidencias se agrega el hallazgo de altas concentraciones de HA testicular en ratas prepúberes, en comparación con animales adultos (Zieher y col, 1971). Además varios trabajos han sugerido una asociación entre el desarrollo de mastocitos (principales células productoras de HA) y células de Leydig en diversas especies (Gaytan y col, 1992; Frungieri y col, 1999; Frungieri y col, 2000).

De esta manera, las publicaciones citadas sugieren que HA podría ejercer su influencia, actuando en forma autócrina o parácrina, sobre el desarrollo de células de Leydig.



**HIPÓTESIS**

Considerando los antecedentes antes mencionados, en este trabajo se planteó investigar la relevancia del mediador ubicuo HA en dos sistemas esteroideogénicos de relevancia fisiológica para el humano: las células de la corteza adrenal y las células de Leydig, planteando en cada caso las siguientes hipótesis:

- En las células córticoadrenales, la HA sería capaz de modular en forma directa la síntesis de esteroides, de una manera similar a lo observado en las células de Leydig. Esta amina podría también modular la capacidad proliferativa de tumores córticoadrenales, presumiblemente reduciendo su crecimiento.
- En el testículo, la HA ejercería un efecto directo sobre las CL en su transición hacia la forma adulta. Los altos niveles de HA hallados en animales prepúberes modularían el desarrollo de CL ya sea a través de la regulación de la proliferación o la diferenciación celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Para intentar verificar las hipótesis descriptas se propuso estudiar la posible función de HA como modulador de la fisiología de células productoras de esteroides, investigando en particular los efectos de la HA sobre la esteroidogénesis y la proliferación de células córticoadrenales y sobre el desarrollo de células de Leydig.

Los objetivos específicos se encuentran detallados en cada capítulo.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. MATERIALES**

### **1.1. Reactivos generales**

La gonadotropina coriónica humana (hCG) (CR-127, 14900 UI/mg) fue provista por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, Bethesda, MD, EEUU) y la adrenocorticotrofina porcina sintética (ACTHelea, 25 UI) fue de Laboratorios ELEA (Buenos Aires, Argentina). La progesterona, testosterona, dibutil AMPc (dbAMPc), histamina, 2-[(3-trifluorometil)fenil] histamina (agonista H1), amtamina (agonista H2), imetit (agonista H3), Vuf 8430 (agonista H4), mepiramina (antagonista H1), JNJ 7777120 (antagonista específico H4), 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX), inhibidor de la fosfolipasa C U-71322 y su análogo inactivo U-73343, 3,3-diaminobenzidina (DAB), HEPES, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), ortovanadato de sodio, leupeptina, aprotinina, pepstatina, fluoruro de sodio, carbón activado, anhídrido acético, bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Tris hidroximetil aminoetano (Trizma base), albúmina sérica bovina grado inmunoanálisis (BSA), azida sódica, ácido etilen-2-glicol-2-etilaminotetracético (EGTA), ácido etilen- diamino – tetracético (EDTA), ácido tricloro acético (TCA), Percoll, azul de tripán y Ponceau S fueron comprados a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

El dextrano T-70 y la gelatina para RIA de esteroides fueron de Pharmacia (Amersham-Pharmacia, Reino Unido) y Panreac Química S.A. (Barcelona, España), respectivamente. La resina de intercambio utilizada para la determinación de inositoles fosfato (AG 1-X8 forma formiato) fue de Bio-Rad Laboratories, Buenos Aires, Argentina). La colagenasa tipo CLS II (125 UI/mg) utilizada fue provista por Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ, EEUU).

## **1.2. Medios y soluciones**

Los medios Ham's/F12, M199 y DMEM/F10 fueron comprados a Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU), así como la transferrina humana, el ácido linoleico y el selenito. La insulina fue una donación de los Laboratorios Beta (Laboratorios Beta S.A., Buenos Aires, Argentina). El suero de caballo el suero fetal bovino y la solución de tripsina/EDTA (0,25 % /1 mM) fueron de Gibco Laboratories (Grand Island, NY, EEUU). El suero de ternero Cosmic fue comprado a Hyclone Laboratories (Logan, Utah, EE.UU). La penicilina-estreptomicina fue de Invitrogen (Carlsbad, CA).

## **1.3 Material plástico**

El material de cultivo utilizado fue de Corning o Falcon. Para la preparación de los medios, se utilizaron unidades filtrantes de acetato de celulosa (0,22  $\mu$ m) de Corning Incorporated (Corning, NY, US).

## **1.4. Radiactivos**

El ligando radiactivo específico para el subtipo de receptor H1 ([Piridinil-5-3H]-Pirilamina, 25 Ci/mmol) y la [3H]-Timidina (20 Ci/mmol) fueron de New England Nuclear (Boston, MA, EE.UU) como así también el Na<sup>125</sup>I (utilizado para la marcación de AMPc, 600 Ci/mmol). [1,2,6,7-3H]-Progesterona (80,2 Ci/mmol) y [2,3,4,5-3H]-Testosterona (80 Ci/mmol) fueron obtenidos de Amersham International (Buckinghamshire, GB). [2-3H(N)]-Mio-inositol (25 Ci/mmol) fue obtenido de PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, EEUU).

### **1.5. Anticuerpos**

El anticuerpo anti-testosterona fue donación del Dr GD Niswender (Animal Reproduction, Biotechnology Lab, Colorado State University, Fort Collins, CO, EEUU) y el anti-progesterona fue obtenido y obsequiado por el Dr Leonardo Bussmann (IBYME-CONICET).

El anticuerpo anti-Ig de conejo y de ratón acoplados a peroxidasa y el anti-Ig acoplado a Alexa Fluor 488 fueron de Vector Laboratories (Burlingame, EEUU). El anticuerpo anti-AMPC fue cedido por el Dr AF Parlow (NIDDK's National Hormone and Pituitary Program; Torrance, CA, EEUU). El anticuerpo anti-StAR fue donado por el Dr. Walter L. Miller (University of California, San Francisco, EEUU), mientras que el anticuerpo anti-CYP11A fue provisto por el Dr. D. B. Hales (University of Illinois, EEUU). El anticuerpo anti-histamina fue cedido gentilmente por la Dra Elena Rivera (Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). El anticuerpo anti-HDC y anti-H4 fueron comprados a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EEUU). El anticuerpo anti-H1 fue comprado a Alpha Diagnostic International (Texas, EEUU) y el anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina y el anti-caspasa 3 a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

### **1.6. Reactivos de electroforesis**

Acrilamida, bisacrilamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sodio (SDS), tetrametil-etilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (APS), glicina, Tween 20 (solución al 10 %) y membrana de nitrocelulosa fueron de Bio-Rad Laboratories (Buenos Aires, Argentina). Los marcadores de peso molecular fueron de Amersham Biosciences (GE Healthcare, New Jersey, EEUU).



### **1.7. Solventes**

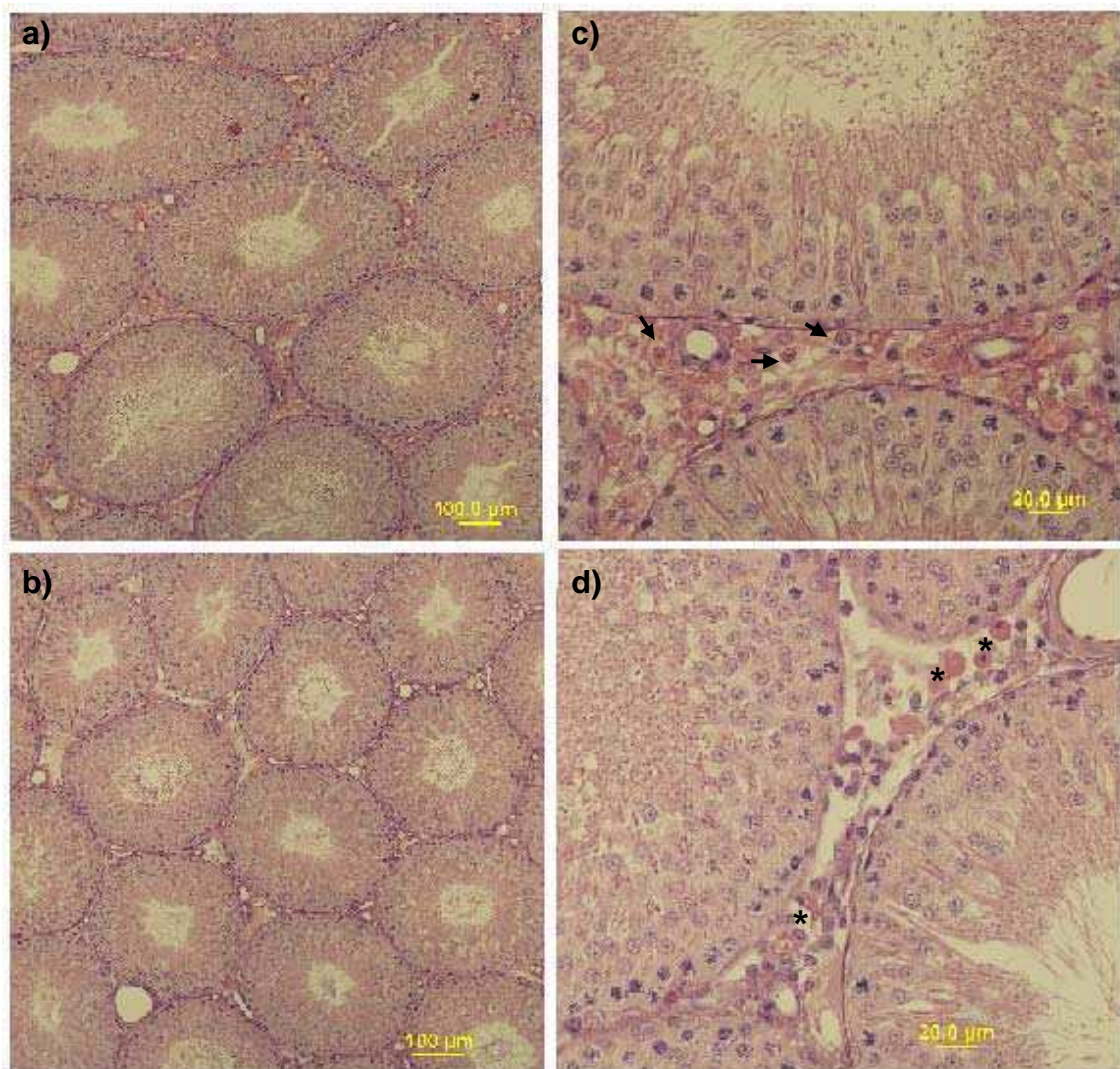
Todos los solventes utilizados en este trabajo fueron comprados a Sintorgan S.A o Merck. Otros reactivos utilizados fueron del mejor grado disponible, obtenidos de los proveedores habituales.

### **1.8. Síntesis del compuesto 1,2-dimetano etano sulfonato (EDS)**

El 1,2-dimetano etano sulfonato (EDS) es un compuesto no comercial que utilizado a una concentración de 75 a 100 mg/kg de peso, destruye específicamente las células de Leydig adultas en ratas y otras especies, por inducción de apoptosis (Molenaar y col, 1985).

Este compuesto fue sintetizado por nuestro laboratorio en colaboración con los Dres. Juan B. Rodríguez y Sergio H. Szajnman (Depto de Química Orgánica-FCEN-UBA) a partir de etilenglicol y cloruro de mesilo, en presencia de piridina, en base a lo descrito por Jackson y Jackson (1984), con algunas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 2 g de etilenglicol con 9,8 ml de piridina en un baño de hielo y sal en agitación constante. A esta mezcla de reacción se le agregaron 4,9 ml de cloruro de mesilo gota a gota, manteniendo la temperatura del sistema entre 5-15°C. Se agitó hasta finalizar la reacción (dos horas aproximadamente) y luego el sistema se volcó en un vaso de precipitado de 200 ml conteniendo una mezcla de 9 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 3/4 partes de hielo molido, en agitación. El precipitado cristalino formado se recuperó, se lavó con agua fría y se secó al vacío. Se obtuvieron 3 g de EDS en forma de cristales blancos, con un punto de fusión de 45-47 °C y con una pureza mayor al 98% de acuerdo a los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) realizados por el Dr Sergio H. Szajnman en el Dpto Química Orgánica, FCEN, UBA.

Para comprobar la eficacia del compuesto se realizaron estudios histológicos de cortes de testículo y se cuantificaron los niveles de de testosterona sérica (por RIA, rango de sensibilidad 1-800 pg/100 ml) de ratas inyectadas intraperitonealmente con una única dosis de EDS (75 mg/ kg de peso corporal). A las 48 horas post-tratamiento las ratas tratadas con EDS reportaron un valor de testosterona sérica de  $196 \pm 62$  pg/ml, mientras que los valores para las ratas que recibieron sólo vehículo (control) alcanzaron un valor de  $1931 \pm 256$  pg/ml. Estos valores coinciden con las características histológicas evaluadas con la colaboración y asistencia del Dr Roberto Ponzio (IdIR, Facultad de Medicina, UBA). Los testículos de la ratas tratadas con EDS mostraron un intersticio con una menor densidad celular comparada con el control y las CLA presentaron signos característicos de apoptosis, como ser el núcleo con cromatina condensada y un citoplasma acidófilo (**Figura 7**).



**Figura 7: Histología testicular de ratas control y animales inyectados con EDS, 48 horas post única administración. a,c) Corte de testículo de rata adulta (60 días) tratada con vehículo (control). Se observa el intersticio de aspecto saludable con abundantes CL de morfología normal (flechas, células con coloración violácea). b,d) Testículo de rata tratada con EDS, 48 hs post-inyección. El intersticio testicular presenta una menor densidad celular (observable tanto a menor como a mayor aumento) y un número muy reducido de CL, la mayoría de las cuales presentan un núcleo con cromatina condensada, y citoplasma acidófilo (asterisco, células con coloración rosada), indicadores de apoptosis. La barra representa 100  $\mu\text{m}$  (a y b) o 20  $\mu\text{m}$  (c y d).**

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Modelos experimentales**

A lo largo de este trabajo se utilizaron los siguientes modelos experimentales:

- Línea celular H295R: línea clonal proveniente de un carcinoma adrenocortical humano, cuyo origen y manipulación han sido descritos (Rainey y col, 2004).
- Línea celular Y1: línea clonal murina derivada de un tumor adrenocortical, cuyo origen y manipulación ya han sido descritos (Rainey y col, 2004).
- Células de Leydig normales de rata, aisladas y purificadas a partir de ratas macho de la cepa Sprague Dawley (Pignataro y col, 1983).
- Ratos macho de la cepa Sprague Dawley.

#### **2.1.1. Línea celular H295R:**

La línea celular H295R fue comprada a la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EEUU). Es una subcepa derivada de la línea celular H295, cuyo origen proviene de un carcinoma adrenocortical hallado en una paciente de sexo femenino de 48 años de edad. A diferencia de su antecesora, las H295R pueden crecer adheridas a sustrato y su tiempo de duplicación se redujo de 5 días a 48hs.

Las células H295R se propagaron a 37 °C en atmósfera humidificada al 5 % con CO<sub>2</sub> en medio DMEM/F12, suplementado con NaHCO<sub>3</sub> 1,2 g/l, insulina (6,25 ug/ml) transferrina (6,25 ug/ml) selenito (6,25 ng/ml), ácido linoléico (5,35 ug/ml) 1 % penicilina-estreptomicina y 5 % suero de ternero Cosmic, a pH 7,4 esterilizado por filtración (medio completo).

### **2.1.2. Línea celular Y1:**

La línea celular Y1 fue comprada a la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EEUU). Al igual que las células de la corteza adrenal normal, las células Y1 responden a ACTH (EC50= 50pM) incrementando la síntesis de esteroides y llegando a niveles de 4 a 10 veces mayores que los basales cuando el estímulo es máximo.

A diferencia de su contraparte normal que produce mayormente corticosteroides, las Y1 producen como principales esteroides 20 $\alpha$ -dihidroxi progesterona y 11 $\beta$ ,20 $\alpha$ -dihidroxi progesterona debido a que carecen de la enzima 21-hidroxilasa (CYP21).

Para su mantenimiento, las Y1 se cultivaron a 37 °C en atmósfera humidificada al 5 % con CO<sub>2</sub> en medio Ham's/F12 suplementado con 12,5 % de suero de caballo inactivado y 2,5 % de suero fetal bovino inactivado, 1 % penicilina-estreptomicina, NaHCO<sub>3</sub> 1,2 g/l, pH 7,4, esterilizado por filtración (medio completo).

### **2.1.3. Mantenimiento de las líneas celulares:**

#### **2.1.3.1. Expansión celular**

La expansión de la población celular se llevó a cabo sembrando las células en frascos T-25 conteniendo 10 ml de medio completo o en frascos T-75 conteniendo 20 ml del mismo medio, renovándolo cada 48 hs. Antes de llegar a confluencia, 1 o dos veces por semana, dependiendo del tipo celular, las células se repicaron con tripsina y se pasaron a un nuevo frasco. Cada lote de células se mantuvo en cultivo durante un período de tiempo limitado (3 meses). Pasado este período, se descongeló un nuevo lote para la propagación celular y la posterior utilización de las células en los distintos ensayos.

### **2.1.3.2. Tripsinización de células**

Las células fueron separadas de la superficie de cultivo mediante un tratamiento con tripsina (tripsinización). Para ello, se aspiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con 2 a 4 ml de Buffer fosfato estéril (PBS). Posteriormente, se agregó 1 a 2 ml de solución de tripsina-EDTA, y la misma se dejó actuar durante 45 a 60 segundos. Se aspiró luego la solución de tripsina, y los frascos se incubaron a 37 °C durante 2 minutos. Finalmente, se verificó la separación de todas las células de la superficie de cultivo y se agregó medio fresco. Una alícuota de la suspensión celular se utilizó para el recuento en cámara de Neubauer, previa tinción con azul de tripán 4 %, y se eligió la densidad de siembra apropiada según la superficie de cultivo a utilizar.

### **2.1.3.3. Criopreservación de células**

A la suspensión celular obtenida luego de la tripsinización se le adicionó glicerol estéril como crioprotector (concentración final: 10 %), y alícuotas de 1,5ml de esta suspensión fueron transferidas a criotubos (densidad celular:  $5 \times 10^6$  células/criotubo). Los mismos se congelaron a -70 °C, y al día siguiente se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido.

### **2.1.3.4. Descongelamiento de células**

El descongelamiento de cada lote de células se llevó a cabo en forma rápida, para maximizar la supervivencia celular. Cada tres meses se retiró un criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se lo colocó en hielo durante 2 minutos. Seguidamente, el criotubo se llevó a un baño a 37 °C durante aproximadamente 2 minutos, agitándolo hasta el descongelamiento de su contenido. Posteriormente, la suspensión celular se

transfirió a un frasco T-25 conteniendo 10 ml de medio de crecimiento, incubado previamente en estufa a 37 °C.

Antes de comenzar cada serie de experimentos, se llevaron a cabo ensayos control: se incubaron las células con concentraciones máximas de ACTH y análogos de AMPc, y se determinó la capacidad de respuesta esteroideogénica de las mismas. Esto permitió garantizar el óptimo estado fisiológico de cada lote utilizado para los diferentes ensayos.

#### **2.1.4. Células de Leydig de rata**

##### **2.1.4.1. Aislamiento y purificación de células de Leydig de rata**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley para la obtención de células de Leydig adultas (80-90 días de edad) inmaduras (30-35 días de edad) y progenitoras (18-21 días de edad), criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental bajo temperatura controlada (21 a 25 °C), y períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron dieta balanceada y libre acceso a agua, respetándose las reglas de la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH).

Las ratas fueron sacrificadas por asfixia utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>. Los testículos fueron extraídos y decapsulados. La dispersión del tejido se llevó a cabo por agitación (20 minutos para las adultas y 12,5 minutos para las inmaduras y progenitoras, 80 ciclos/minuto, a 34 °C) en un tubo de plástico de 50 ml conteniendo solución enzimática (1 ml/testículo, 0,25 mg/ml de colagenasa) en Medio 199 suplementado con HEPES 20 mM; NaHCO<sub>3</sub> 1,2 g/l; BSA 0,1 %; antibiótico; pH 7,4) (M199). Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por dilución con M199 frío. Posteriormente, el tubo se agitó en forma rotatoria durante 3 minutos, a fin de lograr una mayor dispersión del tejido. Se dejó reposar otros 3 minutos para que decanten

los túbulos seminíferos, y el sobrenadante fue filtrado a través de Nitex (malla de poro 40  $\mu\text{m}$ ).

Posteriormente, el filtrado conteniendo las células intersticiales se centrifugó durante 10 minutos a 700 x g. Para eliminar los glóbulos rojos presentes en la preparación, las células se resuspendieron en una solución isotónica de Tris-NH<sub>4</sub>Cl (1,7 y 140 mM respectivamente, pH 7,2) y se incubaron durante 2 minutos a 37 °C. La lisis de los glóbulos rojos se detuvo por dilución con M199 frío, y las células se centrifugaron nuevamente a 700 x g durante 10 minutos. Los macrófagos se separaron de la preparación por adherencia diferencial a placas de Petri de plástico. Las células fueron incubadas en M199 durante 15 minutos a 37 °C, bajo una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. Se recuperó luego el medio conteniendo las células no adheridas, que fueron centrifugadas a 700 x g durante 10 minutos.

Finalmente, las células de Leydig se purificaron por fraccionamiento en un gradiente de densidad discontinuo de Percoll, de cinco fases: 21, 26, 34, 40 y 60 % en M199. El gradiente se centrifugó a 800 x g durante 30 minutos, después de los cuales se recuperó la fracción enriquecida en células de Leydig (interfase 40-60 %). Dicha fracción se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos, y el pellet de células fue resuspendido en M199.

La pureza de las preparaciones fue del 91 %, y se determinó mediante la tinción histoquímica combinada para 3 $\beta$ -HSD, específica para células de Leydig (Hedger y Eddy, 1987).

### **2.1.4.2. Tinción histoquímica para 3 $\beta$ -HSD**

Se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular a 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla conteniendo 25  $\mu\text{l}$  de dehidroepiandrosterona (5 mg/ml en propilenglicol), 25  $\mu\text{l}$  de hCG (120 ng/ml), 100  $\mu\text{l}$  de nitrobluetetrazolium (4 mg/ml) y 50  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -NAD (16 mg/ml). La mezcla se incubó a 34 °C durante 1 hora, y se observó una alícuota al microscopio óptico. Se



determinó el número de células de Leydig por recuento de células azules (tinción positiva) (Payne y col, 1980) en cámara de Neubauer, obteniéndose en cada aislamiento aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  células de Leydig funcionales por testículo.

### **2.1.5. Ratas de la cepa Sprague-Dawley**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, bajo las condiciones antes mencionadas, respetándose en todo momento las reglas de la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH).

### **2.2. Ensayos de unión ligando-receptor**

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos ( $2,5 \times 10^5$  células/pocillo), y se agregó a cada pocillo 1 ml medio de crecimiento. Las placas se mantuvieron a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de  $\text{CO}_2$  y fueron utilizadas el día 3, cuando la densidad celular alcanzó un valor de  $6,5 \times 10^5$  células/pocillo. Luego de dos lavados, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de  $[\text{3H}]$ -Pirilamina (1 a 1000 nM) en un volumen final/pocillo de 200  $\mu\text{l}$  de Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), durante 40 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Para cuantificar la unión inespecífica, se agregó a cada pocillo pirilamina en concentración final de 100  $\mu\text{M}$ . Finalizado el período de incubación, los pocillos se lavaron tres veces con buffer Tris/HCl 50 mM, las células fueron levantadas con rastrillo y transferidas a viales de conteo. Se agregó en cada vial 2,5 ml de líquido de centelleo (Opti/Phase “Hisafe” 3, ETC, Buenos Aires, Argentina) y la radioactividad se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Perkin-Elmer Tri Carb 2800TR (65% de eficiencia).

El análisis de las saturaciones se llevó a cabo graficando los datos experimentales de unión específica (Unido) *versus* la concentración de radioligando libre (Libre). Se empleó el programa GraphPad Prism (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc, San Diego, California, EEUU) para calcular los parámetros cinéticos (constante de disociación, KD y capacidad máxima de unión, Bmax), utilizando un método de regresión no lineal para definir las curvas hiperbólicas. En todos los casos, se comparó el ajuste de los datos al modelo de un sitio o dos sitios de unión, y se determinó el mejor ajuste mediante la prueba parcial F. Según este análisis, puede concluirse que el modelo de dos sitios es estadísticamente mejor sólo si se obtienen valores de F correspondientes a  $p < 0,05$  (Motulsky, 1995).

### **2.3. Determinación de esteroides**

#### **2.3.1. Extracción de Testosterona de suero de rata:**

Para medir los niveles de testosterona en suero de rata, inmediatamente luego de sacrificar al animal por asfixia en cámara de CO<sub>2</sub>, se tomó una muestra de sangre por punción cardíaca. Después de la formación del coágulo el tubo fue centrifugado a 800 xg por 15 minutos a 4 °C y el suero obtenido se separó y se reservó a -20 °C para la posterior extracción de esteroides y medición de testosterona.

Los esteroides se extrajeron del suero mediante una separación en fase orgánica. Para ello se tomó una alícuota de 200 µl de suero y se la colocó en un tubo de vidrio cónico. Se agregaron 2,5 ml de éter etílico (fase orgánica), se agitó en un vórtex en forma continua por 30 segundos y se dejó decantar por 15 minutos a -70 °C. La fase orgánica superior conteniendo los esteroides fue recuperada y con la fase inferior (suero) se repitió una vez más el proceso de extracción. Los dos extractos orgánicos se juntaron en un único tubo y se llevó a evaporación bajo flujo continuo de N<sub>2</sub>, sobre

una plancha caliente. El extracto seco se disolvió en 300  $\mu$ l de buffer RIA y se reservó a -20 °C hasta la posterior determinación de testosterona.

### **2.3.2. Incubación de células para los ensayos de respuesta esteroideogénica**

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (día cero: 3,5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo), y se agregó a cada pocillo 1 ml de medio de crecimiento. Las placas se mantuvieron a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>, y fueron utilizadas el día 3, cuando la densidad celular llegó a 7 x 10<sup>5</sup> células/pocillo.

Luego de dos lavados con medio fresco sin suero, se agregó a cada pocillo 0,5 ml del mismo medio sin suero suplementado con 1 mg/ml de BSA (medio de ensayo), conteniendo los estímulos correspondientes según se especifica en cada figura, continuando la incubación por 5 o 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se recolectaron los medios y se conservaron a -20 °C para la posterior determinación de esteroides (ver sección 4.2.3.3).

En los ensayos realizados en condiciones de esteroideogénesis estimulada las células fueron incubadas con concentraciones submáximas de ACTH 1 mUI/ml en el caso de la línea Y1, mientras que para las células H295R se empleó dbAMPc 0,5 mM ya que se ha reportado que la expresión de receptores para ACTH en esta línea es baja (Rainey y col, 2004).

### **2.3.3. Cuantificación de los niveles de esteroides por radioinmunoensayo**

Para cuantificar los niveles de esteroides liberados al medio de incubación por las células o presentes en el suero de ratas, se empleó la técnica de radioinmunoensayo (RIA) (Charreau y col, 1981). La cuantificación de progesterona (en las células Y1) y de testosterona (en las células de Leydig y en el suero de ratas), se realizó por duplicado. Se utilizaron anticuerpos específicos previamente titulados para determinar

la dilución óptima a usar, correspondiente al 40 % de unión de la hormona tritiada de referencia (aproximadamente 10.000 cpm).

Brevemente, alícuotas de 100  $\mu$ l del medio de incubación (o de la dilución adecuada) fueron transferidas a tubos de plástico, donde se agregaron 200  $\mu$ l de buffer RIA ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  30 mM; NaCl 150 mM; azida sódica 0,01 % y gelatina 0,1 %; pH 7,0), 100  $\mu$ l de hormona tritiada y 100  $\mu$ l de la dilución óptima del anticuerpo. Las muestras fueron incubadas durante 16 h a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Finalizada la incubación, la hormona libre se separó de la unida al anticuerpo mediante el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón (Norit A; 0,5 % P/V)-dextrano (dextrano 70; 0,05% P/V) en buffer RIA, y posterior centrifugación a 1400 x g durante 10 min. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales de conteo, a los que se les agregó 1,5 ml de líquido de centelleo. La radioactividad de los mismos se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Perkin-Elmer TriCarb 2800TR (65% de eficiencia).

El rango de utilidad del ensayo fue de 25 a 1600 pg/tubo para progesterona, y de 12,5 a 800 pg/tubo para testosterona (volumen final/tubo: 500  $\mu$ l). Los coeficientes de variación intra e interensayo en ambos casos fueron menores al 12%.

Los niveles de cortisol producidos por la línea H295R también fueron medidos por RIA, utilizando el kit comercial Coat-a-Count TKCO2 (Siemmes Healthcare Diagnostics) según las especificaciones del fabricante. Se determinó la radioactividad del pellet en un contador Beckman Gamma 4000. El rango de sensibilidad del ensayo fue de 1 a 50  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .

## **2.4. Determinación de AMPc intracelular**

### **2.4.1. Incubación de células para la determinación de AMPc intracelular**

Se procedió según se describió previamente para los ensayos de respuesta esteroideogénica, sembrando las células en placas de cultivo de 24 pocillos, y utilizando

las mismas el día 3. Luego de dos lavados, se agregó a cada pocillo 0,5 ml de medio de ensayo conteniendo IBMX 0,2 mM y los estímulos correspondientes según se especifica en cada figura. Finalizada la incubación de 20 minutos a 37 °C, las placas se colocaron rápidamente en hielo. Se aspiró el medio de cada pocillo y se reemplazó por 250 µl de agua destilada conteniendo IBMX 0,1 mM. Las placas se conservaron a -20°C hasta el día siguiente, en que las células fueron descongeladas a temperatura ambiente, desprendidas de la superficie de cultivo mediante raspado con rastrillo de plástico y transferidas a tubos eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, las muestras se sonicaron para completar la ruptura de las células (3 ciclos de 15 segundos en un oscilador de ultrasonido), se calentaron durante 5 minutos a 95 °C, y se centrifugaron a 9000 x g durante 15 minutos. Alícuotas apropiadas de los sobrenadantes fueron utilizadas para la determinación de los niveles intracelulares de AMPc como se indica en la siguiente sección.

#### **2.4.2. Cuantificación de AMP cíclico por radioinmunoensayo**

La medición del nucleótido cíclico se llevó a cabo por RIA, según el método descrito por Steiner y col (1969), con algunas modificaciones (Del Punta y col, 1996). El AMPc fue iodinado con [125I]-Na en el laboratorio mediante el método de cloramina T limitante, utilizando TME-AMPc. Alícuotas de 100 µl de los sobrenadantes recuperados fueron transferidos a tubos de plástico, y se les agregó una mezcla acetilante de anhídrido acético-trietilamina (1:2 V/V). La acetilación de las muestras aumenta la sensibilidad del método, dado que el AMPc acetilado tiene mayor afinidad por el anticuerpo. Pasados 5 minutos, se agregó a cada tubo 100 µl de [125I]TME-AMPc (30.000 cpm) y 100 µl de la dilución óptima del anticuerpo (correspondiente a un 40 % de unión del nucleótido radiactivo). Las muestras fueron incubadas durante 16 h a 4 °C. Finalizada la incubación, se provocó la precipitación del AMPc unido al anticuerpo mediante el agregado de 50 µl de una solución de BSA (2 %) en buffer

acetato (50 mM, pH 6,2) y 2 ml de etanol frío (95 %), seguido de una centrifugación a 1400 x g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, y se determinó la radioactividad del pellet en un contador Beckman Gamma 4000. El rango de sensibilidad del ensayo fue de 25 a 5000 fmoles de AMPc/tubo (volumen final/tubo: 300 µl). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores al 10%.

## **2.5. Determinación de inositoles fosfato (IPs)**

### **2.5.1. Incubación de células para la determinación de IPs**

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos (día cero,  $1 \times 10^6$  células/pocillo) y se agregó a cada pocillo 2 ml de medio de crecimiento. Las placas se mantuvieron durante dos días a 37 °C, en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalizado este período, se lavaron las células y se agregó a cada pocillo 1 ml de medio de ensayo conteniendo 2 µCi/ml de [3H]-Mio-inositol. Las células fueron incubadas en este medio durante 36 horas para permitir la incorporación del inositol radioactivo a las membranas celulares.

Finalizado el período de marcación, se recuperó el medio de cada pocillo y se evaluó el porcentaje de incorporación del radioactivo, que fue de 15 a 20% en todos los experimentos. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces y se incubaron durante 15 minutos en 1 ml de medio de ensayo conteniendo cloruro de litio (LiCl) 20 mM. El LiCl se utiliza como inhibidor de fosfatasas intracelulares, favoreciendo la acumulación de las distintas especies de inositoles fosfato. Pasada la preincubación en presencia de LiCl, se agregaron los estímulos correspondientes según se aclara en cada figura. Las células fueron incubadas durante 30 minutos en estas condiciones. Posteriormente, las placas se colocaron rápidamente en hielo, se descartó el medio de cada pocillo y se llevó a cabo la determinación de inositoles fosfato como se indica en la sección siguiente.

### **2.5.2. Recuperación y Cuantificación de IPs**

La determinación de inositoles fosfato se llevó a cabo según la técnica descrita por Ascoli y col (1989). Finalizada la incubación en presencia de los distintos estímulos, las placas de cultivo conteniendo las células fueron colocadas en hielo, y el medio de cada pocillo fue rápidamente descartado. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 0,5 ml de ácido perclórico frío (PCA, 0,5 N), y las células fueron despegadas por raspado con rastrillo de plástico y transferidas a tubos de polipropileno de 5 ml. Los pocillos fueron luego lavados con 0,7 ml de PCA frío, y el extracto obtenido se juntó con el anterior. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, y luego de una centrifugación a 1400 x g durante 10 minutos a 4 °C, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos limpios. Seguidamente, se agregó a cada tubo 0,6 ml de una solución de KOH/KHCO<sub>3</sub> (0,72 M/0,6 M) a fin de neutralizar el pH ácido, y los tubos fueron centrifugados a 1400 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante en cada tubo fue recuperado y transferido a un tubo limpio, descartándose el pellet (KClO<sub>4</sub> precipitado junto con el remanente de membranas celulares). Posteriormente, se agregó a cada tubo 0,5 ml de mio-inositol 100 mM. El volumen fue ajustado a 5 ml con agua destilada, y las muestras fueron sometidas a cromatografía de intercambio iónico en columnas de 0,5 x 3,0 cm con resina DOWEX AG 1-X8 (trama 200-400 forma formiato), lavadas previamente con 10 ml de mio-inositol 10 mM. El proceso de elución de las muestras se llevó a cabo en 2 etapas, agregando en forma secuencial 15 ml de mio-inositol 10 mM para lavar el [3H]-Mio-inositol residual y luego 5ml de una solución de ácido fórmico 0,1 M/formiato de amonio 1 M para eluir las tres especies de inositoles fosfato (inositoles fosfato totales, IPs). Alícuotas de 0,5 ml de cada eluido fueron transferidas a viales de conteo, se les agregó 6 ml de líquido centelleante y se determinó la radioactividad utilizando un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresaron como la relación obtenida entre la radioactividad correspondiente a los [3H]-IPs totales y la recobrada como [3H]-Inositol libre.

## **2.6. Ensayos de proliferación celular**

### **2.6.1. Ensayo de incorporación de [3H]-Timidina en células Y1 y H295R**

Las células fueron sembradas en sus correspondientes medios completos en placas de cultivo de 96 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  células/ pocillo) a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % CO<sub>2</sub>. En el caso de la línea celular Y1 las placas fueron previamente polilisinadas para facilitar la adherencia y 24 horas después de la siembra se realizó un hambreo de 24 horas en medio reducido en suero (1,5 %) con el objeto de ciclar las células antes de iniciar el ensayo de proliferación.

La línea H295R no necesitó hambreo debido a que estas células presentan un período de duplicación más prolongado por lo cual al momento del iniciar el experimento el conjunto de células aún se hallaba en G1, como lo confirmó el análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

Luego de 24 horas de hambreo (en el caso de las Y1) o de 18 horas posteriores a la siembra (en el caso de las H295R), el medio de cultivo fue reemplazado por medio reducido en suero (1,5 % para las Y1 y 0,1 % para las H295R) para minimizar interferencias en los resultados de factores de crecimiento presentes normalmente en el suero. Se agregaron los estímulos que se indican en cada figura (16 réplicas por tratamiento) en un volumen final de 200 µl por pocillo y se continuó la incubación por 24 horas más, dando un pulso de 0,25 µCi/ml [3H]-Timidina durante las últimas 12 horas. Al finalizar la incubación las células se colocaron a -20 °C y fueron cosechadas al día siguiente por filtración a través de discos de fibra de vidrio. Los filtros conteniendo las células se lavaron con etanol al 95%, se colocaron en tubos con 0,5 ml de líquido de centelleo y la radioactividad se determinó utilizando un contador de centelleo líquido.



**2.6.2. Ensayo de incorporación de [3H]-Timidina en células de Leydig de rata**

Las células de Leydig purificadas (tanto las adultas como las inmaduras) fueron resuspendidas en medio M199 suplementado con antibióticos y 0,5 % de suero fetal bovino y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos ( $7 \times 10^4$  células/pocillo) a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % CO<sub>2</sub>. Las placas fueron pretratadas con una solución de gelatina al 0,01% en PBS estéril, que se retiró al momento de realizar la siembra y que ofreció una matriz de adherencia a las células. Luego de 18 horas, se agregaron los estímulos que se indican en cada figura (12 réplicas por tratamiento) y se continuó la incubación por 24 horas más, dando un pulso de 0,25 µCi/ml [3H]-Timidina durante las últimas 16 horas. Al finalizar la incubación las células se colocaron a -20 °C y fueron cosechadas al día siguiente por filtración a través de discos de fibra de vidrio. Los filtros conteniendo las células se lavaron con etanol al 95 %, se colocaron en tubos con 0,5 ml de líquido de centelleo y la radioactividad se determinó utilizando un contador de centelleo líquido.

**2.6.3. Ensayo de proliferación celular por MTT**

Las células fueron sembradas en medio completo en placas de cultivo de 96 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo) a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % CO<sub>2</sub>. A las 18 horas posteriores a la siembra, el medio de cultivo fue reemplazado por medio reducido en suero (0,1 %). Se agregaron los estímulos según se indica en la figura correspondiente y se continuó con la incubación por 24 horas. Finalizado ese tiempo, el medio fue reemplazado por 200 µl de PBS y se agregó a cada pocillo bromuro de 4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en una concentración final de 0,5 mg/ml. Se incubó durante 1 hora en oscuridad a 37 °C, se removió el medio con MTT y se agregó isopropanol-HCl para disolver el precipitado de MTT reducido. La absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de ELISA. Paralelamente a los

tratamientos, se realizó una curva de crecimiento con distintas concentraciones de células, observándose una relación lineal entre el número de células y los valores de absorbancia leídos.

## **2.7. Western blot**

### **2.7.1. Preparación de extractos celulares de las líneas Y1 y H295R**

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos (día cero;  $3 \times 10^6$  células/pocillo) y se agregaron 2 ml de medio de crecimiento. Las placas se mantuvieron a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub> y fueron utilizadas el día 3, ya sea para la extracción directa de las proteínas o para evaluar la expresión de la proteína StAR. En este último caso, el medio completo se reemplazó por medio sin suero suplementado con BSA 1mg/ml (medio de ensayo) y las células se preincubaron durante 10 minutos en presencia o ausencia de HA 10<sup>-5</sup> M. Luego se agregó al medio ACTH 1mUI/ml o dbAMPc 0,5mM para inducir esteroidogénesis aguda y las incubaciones se mantuvieron por 3, 6, 12 y 24 horas.

Finalizados los ensayos, las placas se lavaron 3 veces con PBS, y las células adheridas fueron despegadas mediante raspado con rastrillo, transferidas a tubos eppendorf y centrifugadas durante 10 minutos a 700 x g. A continuación, se descartaron los sobrenadantes y se continuó con la extracción de proteínas del pellet celular (ver sección **2.7.3.**).

### **2.7.2. Preparación de extractos celulares de testículo total de rata y de células de Leydig purificadas.**

Las células de Leydig purificadas fueron centrifugadas a 700 x g durante 10 minutos y el pellet obtenido se utilizó para la extracción de proteínas.

Para la preparación de extractos a partir de los testículos de ratas, una porción del testículo se homogeneizó manualmente en un tubo cónico en PBS a 4 °C. El homogenato se centrifugó a 700 x g por 10 minutos y el pellet recuperado se utilizó para la extracción de proteínas.

### **2.7.3. Extracción de proteínas para Western blot**

Los pellets celulares fueron resuspendidos en buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8, Tritón X-100 1 %, EGTA 0,5 mM, leupeptina 5 µg/ml, NaF 25 mM, ortovanadato de sodio 25 mM, PMSF 400 µM, pepstatina 5 µg/ml y aprotinina 5 µg/ml) a razón de 5 veces el volumen del pellet celular. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 15 minutos para completar la lisis, y luego fueron sometidos a una centrifugación de 20 minutos, a 12000 x g. Se recuperaron los sobrenadantes, se separó una alícuota para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y el remanente se utilizó para el ensayo de Western blot.

### **2.7.4. Electroforesis en matriz de poliacrilamida**

Las proteínas de los extractos celulares fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) (SDS-PAGE), según la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), y transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (BioRad Life Science Products), según el procedimiento descrito por Towbin y colaboradores (Towbin y col, 1970). Previo a la corrida electroforética, los extractos celulares obtenidos fueron resuspendidos en buffer de siembra 3 x (Tris-HCl 0,06 M; pH 6,8, glicerol 25 % V/V, SDS 2 % P/V, azul de bromofenol 0,01 % P/V, β-mercaptoetanol 5 % V/V) e incubados en un baño a 95°C durante 5 minutos.

La electroforesis se llevó a cabo empleando un sistema discontinuo, con dos tipos de gel: un gel concentrador (4% de acrilamida-bisacrilamida (29 : 1) en buffer Tris-HCl 0,5 mM; pH 6,8), y un gel separador (10 % de acrilamida-bisacrilamida (29 : 1) en buffer Tris-HCl 1,5 mM; pH 8,8). El buffer utilizado para la corrida fue Tris 0,025 M; glicina 0,192 M, SDS 0,1 % P/V, pH 8,3). La misma se desarrolló a voltaje constante (75 V para el gel concentrador y 125 V para el gel separador), empleando un dispositivo de BioRad (Miniprotean III).

Finalizada la corrida electroforética, el gel fue equilibrado en buffer de transferencia semi-seco (Tris-HCl 25mM, glicina 0,192 M y metanol 20% V/V, pH 8,3). Las proteínas fueron luego transferidas a la membrana de nitrocelulosa equilibrada en el mismo buffer. El proceso se desarrolló a corriente constante (15 volts) durante 20 minutos. Posteriormente, se recuperó la membrana y se tiñó con una solución de Rojo Ponceau-ácido acético (0,2-0,5 %) para verificar la transferencia de las proteínas. El colorante fue luego removido mediante sucesivos lavados con PBS.

### **2.7.5. Revelado de proteínas específicas**

A fin de bloquear posibles sitios de unión inespecífica del anticuerpo, la membrana fue incubada en una solución de PBS, conteniendo 0,1 % de Tween 20 (PBS-Tween) y leche descremada al 5 % o BSA al 3 % (dependiendo del anticuerpo a utilizar), durante 2 horas a temperatura ambiente. La incubación en presencia del anticuerpo específico se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-HDC (dilución 1:750); anti-StAR (dilución 1:2500); anti-caspasa 3 (dilución 1:500); anti- $\beta$ tubulina (dilución 1:20000) Luego de sucesivos lavados con PBS-Tween 0,1 %, la membrana fue incubada por 1,5 horas en presencia de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón (dilución 1:4000), acoplado a peroxidada. Finalmente, el revelado se llevó a cabo incubando la membrana en una solución sustrato de peroxidasa, amplificadora de quimioluminiscencia (luminol 250

mM, cumárico 90 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % V/V y Tris 1mM, pH 8,5) y exponiendo luego la misma a una placa para autorradiografía (Kodak X-OMAT AR Film, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EEUU) en el interior de un cassette con pantalla intensificadora. Una vez expuesta, la película se reveló y fijó con reactivos fotográficos.

### 2.8. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como estándar. Las medidas se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, registrándose las lecturas de absorbancia a 620 nm en un lector de ELISA (Bio Rad Microplate Reader).

### 2.9. Inmunocitoquímica

Las células fueron sembradas sobre vidrios circulares (12 mm de diámetro, Marienfeld, Germany) pretratados con polilisina en placas de cultivo de 24 pocillos (3 x 10<sup>4</sup> células/vidrio), en 0,5 ml de medio de crecimiento a 37 °C, en atmósfera humidificada conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Al tercer día, las células adheridas a los vidrios fueron lavadas con PBS y fijadas durante 10 minutos en una solución de formaldehído 4% en PBS (pH 7,4), lavadas y permeabilizadas con Tritón X-100 (0,25 % en PBS) durante 10 minutos. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y posteriormente incubadas en solución de bloqueo (BSA 1 % en PBS) durante 1 hora. Todos los pasos descritos hasta aquí se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con agitación.

Las células fueron luego incubadas durante 24 horas en presencia de los anticuerpos primarios específicos: anti-HA (dilución 1:100), anti-HDC (dilución 1:100), anti-CYP11A (dilución 1:200), anti H1-4 (dilución 1:50) en cámara húmeda a 4°C en solución de bloqueo. Para el control negativo se omitió el anticuerpo primario y en su reemplazo se utilizó solución de bloqueo. A continuación, las células se lavaron tres

veces con PBS, y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:4000) para P450scc e HA y anti-IgG de conejo conjugado a biotina (dilución 1:200) para H1-H4 y HDC, y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (dilución 1:200) para la detección por inmunofluorescencia del receptor H1. La incubación se realizó durante dos horas, en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente, luego de tres lavados con PBS y un enjuague con agua destilada (previamente filtrada), se procedió al revelado con diaminobenzidina utilizando el mismo tiempo de revelado para las distintas líneas (5 minutos para P450scc e HA y 10 minutos para los receptores), a fines comparativos.

El montaje se realizó en medio orgánico (bálsamo líquido de Canadá sintético) para los anticuerpos asociados a peroxidasa o en medio acuoso con DAPI (Vectashield Mounting Media con DAPI, Vector Labs, Burlingame, EEUU) para el anticuerpo fluorescente. La visualización de la fluorescencia verde y la visualización del DAB se realizó con un microscopio Zeiss Axiophot y cámara digital Olympus DP70 utilizando un aumento con un objetivo de 40X y un ocular de 10X. Las imágenes fotografiadas fueron procesadas con los programas DP Controller (versión 1.2.1.108) y DP Manager (versión 1.2.1.107) (Olympus optical Co, LTD). Las láminas fueron confeccionadas mediante el programa computacional Adobe Photoshop 7.0.

### **2.10. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

#### **2.10.1. Incubación y fijación de células**

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos ( $3 \times 10^6$  células/pocillo) en medio completo. Al día siguiente se les cambió el medio completo por medio reducido en suero (0,1 %) y se les agregaron los estímulos según se indica en las figuras correspondientes. Al cabo de 24 horas se recuperaron tanto las células en suspensión como las adheridas a la placa (estas últimas con tratamiento con

tripsina-EDTA 0,25 %) en tubos de polipropileno de 12 x 75 mm, se centrifugaron a 800 x g por 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Luego del último lavado, aproximadamente  $1,5$  a  $2 \times 10^6$  células se resuspendieron en 0,5 ml de PBS frío y se fijaron con 1,5 ml de etanol absoluto frío, muy lentamente, gota a gota, con agitación constante y la fijación continuó a  $-20$  °C, hasta su posterior tinción con yoduro de propidio (IP).

### **2.10.2. Tinción con Yoduro de propidio**

Las células ya fijadas se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de buffer citrato de sodio 3,8 mM. Luego se le agregaron 200 µl de una solución de IP 1 mg/ml en PBS y 50 µl de RNasa A 10 µg/ml (Sigma, St Luis EE.UU) y se incubó como mínimo por tres horas a 4 °C, al resguardo de la luz.

Cada tratamiento se hizo por quintuplicado y por cada muestra se analizaron 10000 eventos utilizando un citómetro de flujo FACsARIA (BD Biosciences, NJ). Los datos fueron analizados con los programas WinMDI 2.8 (J.Trotter) y Cychred (Cardiff University, Gales, Reino Unido), ambos disponibles gratuitamente en internet.

### **2.11. Determinación de apoptosis por citometría flujo**

#### **2.11.1. Incubación y fijación de células**

Las células fueron sembradas y recolectadas siguiendo el mismo protocolo que para el análisis del ciclo celular (ver sección **2.10.1.**). Luego del último lavado, aproximadamente  $1,5$  a  $2 \times 10^6$  células se resuspendieron en 0,5 ml de PBS frío, se fijaron con 1,5 ml de paraformaldehído (concentración final 2 %), muy lentamente, gota a gota, con agitación constante y se reservaron a  $-20$  °C, para el posterior estudio de apoptosis.

### **2.11.2. Ensayo de Tunel por citometría de flujo**

Para la determinación del porcentaje de células apoptóticas se empleó el kit comercial In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Brevemente, Las células previamente fijadas fueron permeabilizadas con tritón X-100 0,1 % en buffer citrato durante 2 minutos en hielo. Luego de dos lavados con PBS las células fueron incubadas en 10 µl de la mezcla de reacción Tunel (Solución enzimática y solución de tinción en relación 1:9, según especificaciones del producto) y se incubaron durante 60 minutos en oscuridad a 37 °C. Finalizada la incubación, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 500 µl de PBS y fueron analizadas por citometría de flujo. Cada tratamiento fue analizado por quintuplicado con el programa WinMDI 2.8 y los resultados se expresaron en función del porcentaje de células apoptóticas de un total de 10000 eventos adquiridos por cada muestra.

Para el control negativo de la técnica la enzima transferasa fue reemplazada por la solución de tinción. Para el control positivo de la técnica, células control fueron incubadas con DNAsa I (3 U/ml) por 10 minutos a temperatura ambiente, para inducir la ruptura del ADN, antes de agregarle la mezcla de reacción Tunel. Como control positivo del ensayo, las células fueron incubadas durante 24 horas con el inductor de apoptosis doxorubicina en dos concentraciones diferentes  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-3}$  M.

### **2.12. Estudio del contenido de HA y HDC durante el desarrollo de células de Leydig adultas**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 7, 21, 35, 90 y 240 días, representativas de los distintos estadios de desarrollo de las células de Leydig adultas. A las edades citadas los animales fueron sacrificados por asfixia en cámara de CO<sub>2</sub>. Se tomó una muestra de sangre para la medición de testosterona plasmática. Se



extrajeron los testículos, uno de ellos fue fijado para estudios inmunohistoquímicos del contenido endógeno de HA mientras que el otro se reservó para la extracción de proteínas y el estudio por Western blot de la expresión de HDC.

### **2.13. Estudios *in vivo***

#### **2.13.1. Tratamiento *in vivo* de ratas con el compuesto EDS:**

Se utilizaron un total de 36 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 60-65 días de edad repartidos uniformemente en tres grupos: control, EDS y EDS+HA. Al inicio del experimento (día cero) las ratas recibieron una inyección intraperitoneal de EDS (75 mg/kilo de peso corporal) disuelto en agua y DMSO (relación 3:1) o vehículo (agua: DMSO, 3:1), en un volumen final de 200  $\mu$ l. A partir del día 29 post-EDS los animales recibieron durante 3 días sucesivos una inyección intratesticular de HA (10  $\mu$ g/g testículo) o solución fisiológica, en un volumen final de 80  $\mu$ l. La dosis de HA se seleccionó en función a los valores fisiológicos máximos reportados para esta amina en el testículo de ratas durante el desarrollo post-natal normal (Zieher y col, 1971). Durante esos días, los animales se revisaron periódicamente sin encontrarse signos de inflamación o malestar durante el tiempo de experimentación.

A los 32 días post-EDS los animales fueron sacrificados por asfixia en cámara de CO<sub>2</sub>, y los testículos se reservaron para posteriores estudios inmunohistoquímicos, recuento de células de Leydig, determinación de testosterona plasmática y expresión de HDC por ensayos de Western blot.

#### **2.13.2. Fijación y procesamiento de los testículos:**

Tanto las ratas de distintas edades como las utilizadas para los estudios del efecto *in vivo* de HA fueron sacrificadas por asfixia en cámara de CO<sub>2</sub>. Ambos testículos

fueron removidos y pesados en fresco. Uno de los testículos se reservó a -70 °C para la extracción de proteínas y determinación de testosterona, mientras que el otro fue fijado por perfusión para estudios inmunohistoquímicos. Para ello se introdujo una aguja 27 G (0,40 x 19 mm) en la arteria testicular, visible por debajo de la túnica albugínea, haciendo circular por ella una solución de heparina 0,01% en PBS a pH 7,4, seguida de la solución fijadora de Bouin durante 10 minutos a un flujo de menos de 2 ml por minuto utilizando una bomba de perfusión. Cada testículo fue cortado transversalmente en segmentos de igual ancho y la fijación continuó por inmersión en el mismo fijador por 24 horas más. Dos segmentos por testículo, seleccionados al azar, fueron posteriormente deshidratados en un gradiente creciente de etanol y embebidos en parafina. El material fue cortado con micrótopo en secciones de 5 µm de grosor (con dos cortes seriados por preparado) y procesados para tinción con hematoxilina-eosina y para inmunohistoquímica.

### **2.13.3. Inmunohistoquímica**

Los testículos fijados fueron incluidos en parafina y procesados para inmunohistoquímica. Cortes de 5µm de grosor fueron desparafinados pasándolos por dos lavados con xilol, un gradiente decreciente de etanol (100 %, 95 %, 70 %) y dos lavados con agua destilada. La recuperación antigénica se realizó en solución de citrato de sodio 100 mM pH=6 precalentada a 95°C, incubando los cortes durante dos minutos a potencia media en microondas. Finalizado ese tiempo, se los dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se lavaron dos veces con agua destilada. Para bloquear las peroxidasas endógenas los cortes fueron incubados en una solución de agua oxigenada al 0,3 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se procedió al bloqueo de inespecíficos incubando los cortes con una solución de BSA 1 % en PBS Tween 20 0,1 % durante 2 horas a temperatura ambiente.

Los cortes fueron incubados durante 24 horas en presencia de anticuerpos primarios específicos: anti-HA (dilución 1:100) o anti-P450scc (dilución 1:200) en cámara húmeda a 4 °C en solución de bloqueo. Para el control negativo se omitió el anticuerpo primario y en su reemplazo se utilizó solución de bloqueo. A continuación, los cortes se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:4000) en solución de bloqueo, durante dos horas, en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente, luego de tres lavados con PBS y un enjuague con agua destilada (previamente filtrada), se procedió al revelado con diaminobenzidina utilizando el mismo tiempo de revelado (5 minutos) para todos los cortes, a fines comparativos. El montaje se realizó en medio orgánico (bálsamo líquido de Canadá sintético). Los cortes se observaron con un microscopio Zeiss Axiophot y cámara digital Olympus DP70 (Olympus optical Co, LTD) utilizando un aumento con un objetivo de 40 X y un ocular de 10 X. Las imágenes fotografiadas fueron procesadas con los programas DP Controller (versión 1.2.1.108) y DP Manager (versión 1.2.1.107) (Olympus optical Co, LTD). Las láminas fueron confeccionadas mediante el programa computacional Adobe Photoshop 7.0.

### **2.13.4. Recuento de Células de Leydig:**

Para determinar la densidad numérica de Células de Leydig (número de CL por unidad de volumen) se contabilizó el número de núcleos (Na) de CL en un área de 875000  $\mu\text{m}^2$  (calculado a partir de la superposición de una grilla con 414 puntos distribuidos uniformemente sobre el campo del microscopio). Las CL se distinguieron de otros tipos celulares del intersticio testicular por dos parámetros: su núcleo ovoide, prominente, con nucléolos conspicuos y por la tinción citoplasmática positiva para el marcador P450scc. Se evaluaron 6 animales por tratamiento y se analizaron 10 campos seleccionados al azar en cada preparado.

La densidad numérica de CL por unidad de volumen ( $N_v$ ) fue calculada utilizando la ecuación de Floderus (1944):  $N_v = N_a/D + T - 2h$ , donde  $T$  es el grosor del corte,  $h$  es un factor de corrección para calcular el diámetro nuclear y  $D$  es el promedio del diámetro nuclear de la CL. De acuerdo a lo publicado por otros autores (Mori y Christensen, 1980; Suescun y col, 1994) y nuestros propios datos, consideramos  $T = 5 \mu\text{m}$  (grosor de los cortes), fijamos arbitrariamente  $h = 10\% D$  y consideramos diámetro promedio  $D = 6,37 \mu\text{m}$ . El número de CL por unidad de volumen testicular fue calculado multiplicando el  $N_v$  por el volumen del testículo. Este último se calculó a partir del peso del testículo y de su gravedad específica, considerada igual a la de un testículo fresco ( $1,039 \sim 1,040$ ), por lo que 1 g testículo es equivalente a  $0,962\text{cm}^3$  (Mori y Christensen, 1980).

#### **2.14. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos experimentales se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software Inc, San Diego, California, EEUU). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (ES). Para comparar las medias de dos grupos de datos se empleó el test  $t$  de Student, en tanto que se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con post test de Bonferroni para comparaciones múltiples. En caso de detectarse heterogeneidad entre las varianzas de los tratamientos (prueba de Bartlett), esto fue corregido mediante la transformación logarítmica de los datos, previo al análisis de varianza.

En todos los casos,  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Todos los resultados fueron confirmados mediante la realización de al menos tres experimentos independientes.

# **CAPÍTULO 1**

**EFFECTOS DE LA HISTAMINA (HA) SOBRE CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS DE  
LA GLÁNDULA ADRENAL**

**1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Considerando los datos previos de nuestro laboratorio sobre el efecto dual de HA en la síntesis de esteroides en células de Leydig de rata (Mondillo y col, 2005-2009) y la amplia bibliografía sobre la participación de esta amina en la proliferación de diversos tumores (Medina y Rivera, 2011), en este primer capítulo se planteó el estudio de los posibles efectos de HA sobre la glándula adrenal, utilizando dos líneas celulares esteroideogénicas derivadas de tumores de la corteza adrenal.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

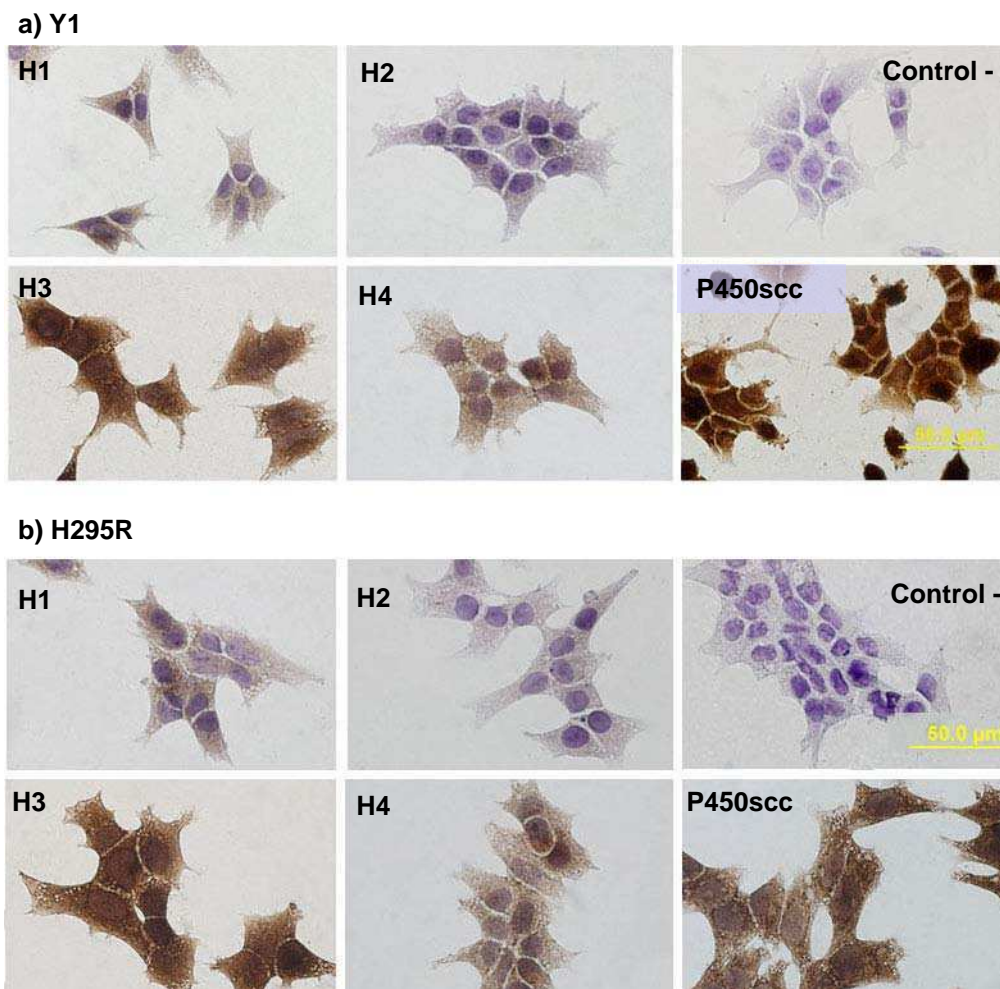
- Evaluar la presencia de los subtipos de receptores para HA en las células tumorales córticoadrenales Y1 y H295R.
- Estudiar el efecto de la histamina sobre la esteroideogénesis y la proliferación de estas células.
- Evaluar el contenido endógeno de HA y la expresión de la enzima histidina decarboxilasa (HDC) en las líneas celulares Y1 y H295R.

## 2. RESULTADOS

### 2.1. Receptores para Histamina en las líneas celulares Y1 y H295R

La presencia de los distintos subtipos de receptores para HA en las líneas celulares Y1 y H295R fue evaluado por medio de la técnica de inmunocitoquímica empleando anticuerpos específicos para cada subtipo de receptor (**Figura 8**). La presencia de los receptores se observó como una marca color marrón. A fin de establecer comparaciones de tipo cualitativas entre las células Y1 y H295R, el tiempo de revelado fue el mismo para ambas líneas celulares y las pruebas inmunocitoquímicas se llevaron a cabo por triplicado y en tres ocasiones independientes, siendo consistente el patrón de marcación hallado en todas las oportunidades.

Tanto en las células Y1 como en las H295R se hallaron todos los subtipos de receptores para HA. En ambas, los receptores H4 y H3 mostraron una marcación positiva intensa, mientras que la marca para el receptor H1 fue menor y similar en ambas líneas celulares. La marcación para H2, en cambio, fue muy tenue en las células H295R comparada con la obtenida en las Y1.



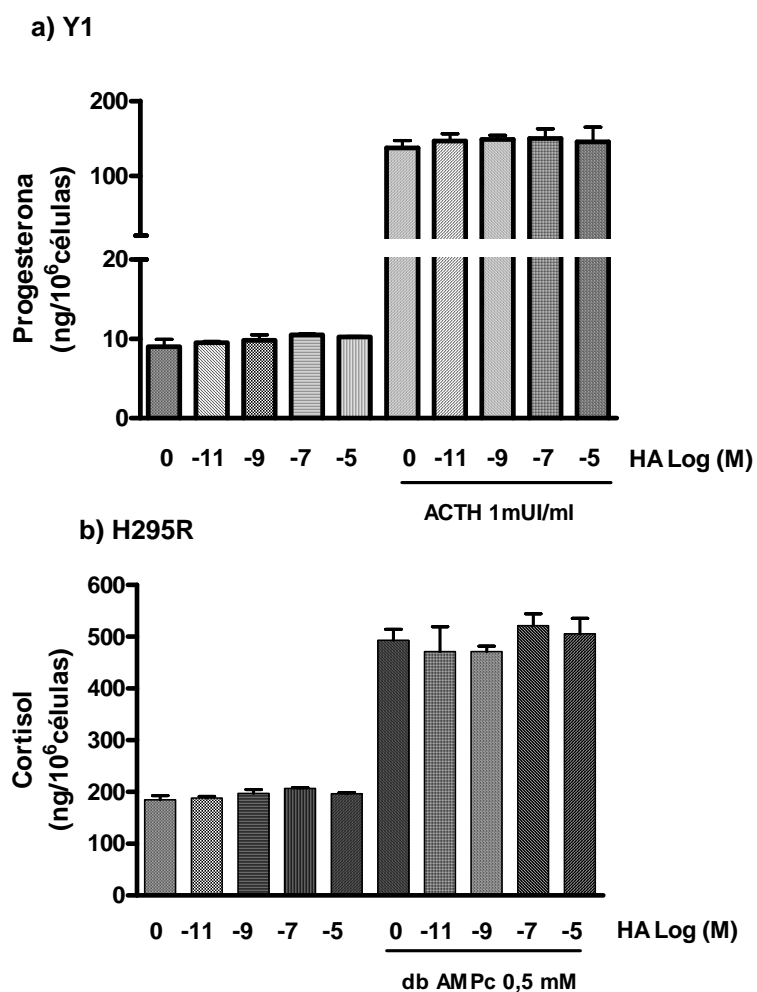
**Figura 8: Receptores para Histamina en las líneas celulares Y1 y H295R.** Se realizaron inmunocitoquímicas en células **a)** Y1 y **b)** H295R para los subtipos de receptores de HA y la enzima esteroidogénica P450scc, utilizando anticuerpos específicos. El revelado se realizó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, en presencia de DAB. Para el control negativo se omitió el anticuerpo primario. La barra representa 50 $\mu$ m.

## 2.2. Efecto de la HA sobre la esteroidogénesis de las líneas córticoadrenales Y1 y H295R

La respuesta esteroidogénica de las líneas celulares H295R e Y1 fue evaluada en presencia de distintas concentraciones de HA ( $10^{-11}$  M a  $10^{-5}$  M) a 5 y 24 horas. Como indicativo de la respuesta esteroidogénica se midió la síntesis de uno de los esteroides producidos mayoritariamente por cada célula, progesterona en la línea Y1 y cortisol en las células H295R. En la **Figura 9** se observa que el tratamiento con HA no modificó

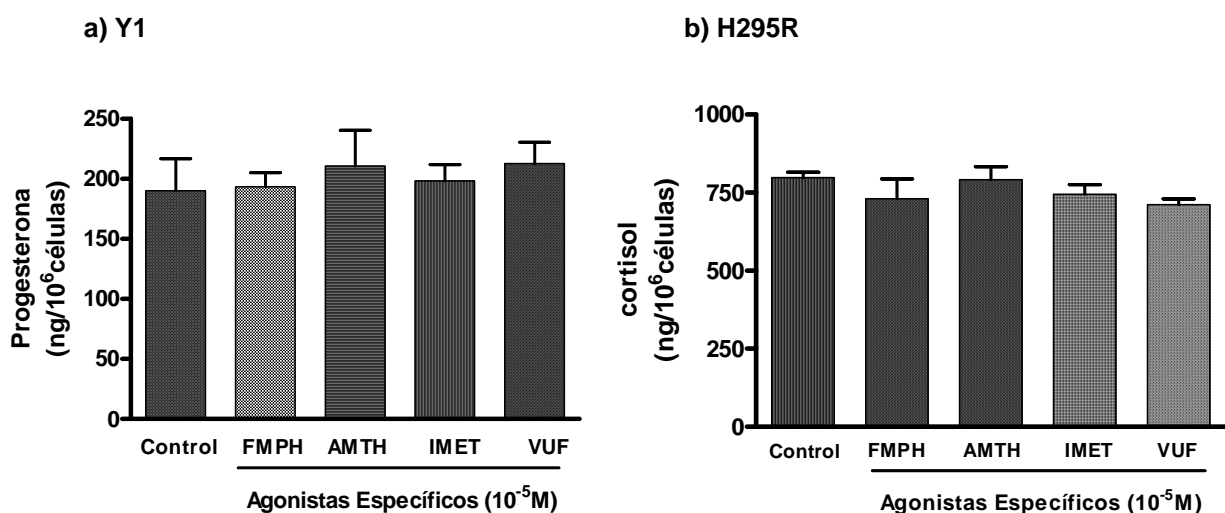


significativamente los niveles de esteroides producidos por ambas líneas celulares, ya sea en condiciones basales o en las condiciones de estimulación especificadas, en ninguno de los tiempos evaluados (sólo se muestran los gráficos a 24 horas). No se utilizaron concentraciones más elevadas de HA a fin de evitar posibles efectos citotóxicos.



**Figura 9: Efecto de HA sobre la respuesta esteroidogénica de las líneas celulares Y1 y H295R.** Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de HA durante 24 horas a 37°C. Los medios recuperados fueron utilizados para evaluar la producción de **a)** progesterona en la línea Y1 y **b)** cortisol en la línea H295R tanto en condiciones basales como en condiciones de esteroidogénesis estimulada.

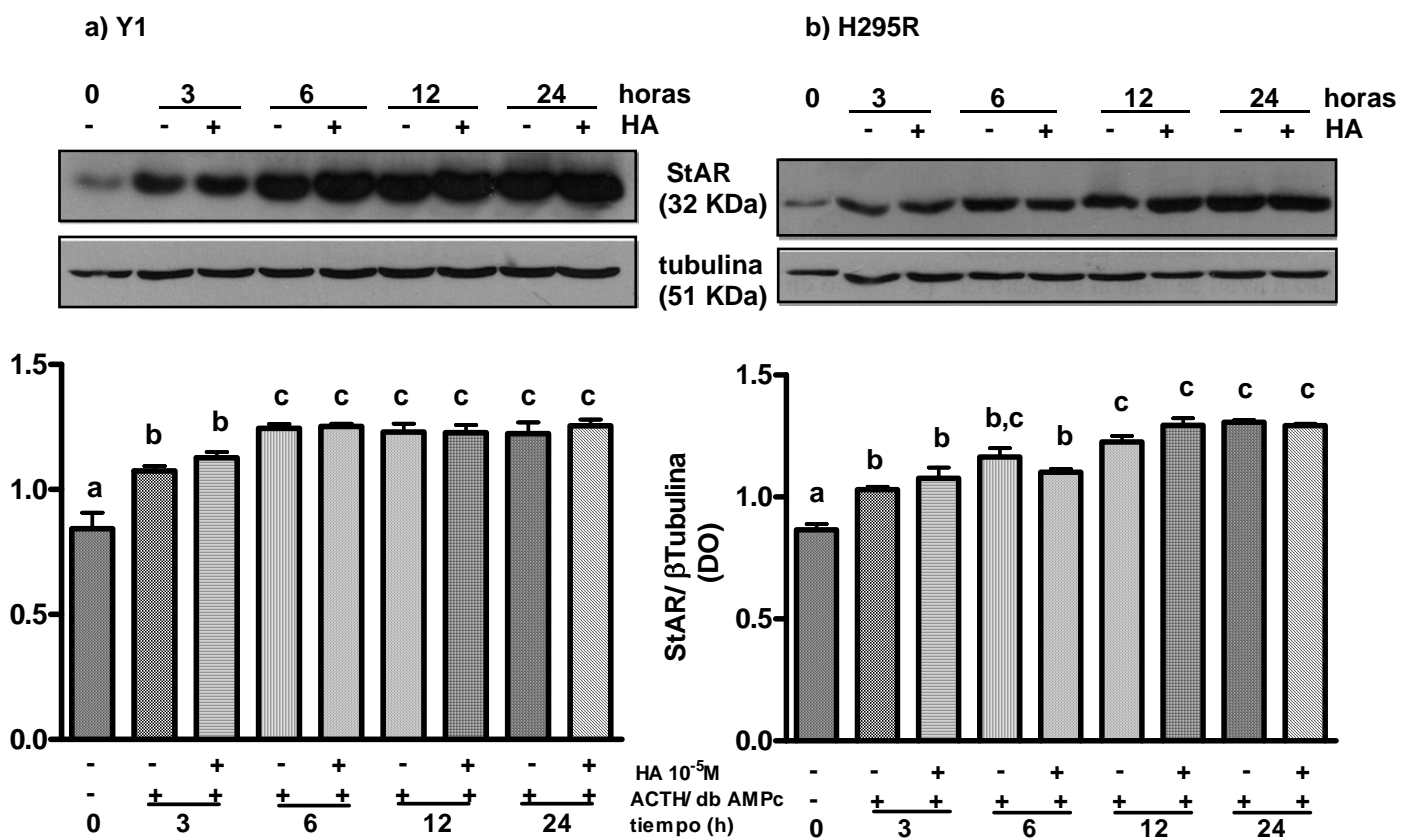
Para corroborar estos resultados y descartar una posible activación conjunta de distintos receptores con efectos antagónicos, se evaluó la producción de esteroides a 24 horas en presencia de distintos agonistas específicos para cada subtipo de receptor en condiciones de esteroidogénesis estimulada (ACTH 1mUI/ml para las células Y1 y dbAMPc 0.5mM para las H295R). El 2-[(3-trifluorometil)fenil] histamina (FMPH) se empleó como agonista H1, la amtamina (AMTH) como agonista H2, el imetit (IMET) como agonista H3 y el Vuf 8430 (VUF) como agonista H4, todos en una concentración  $10^{-5}$  M. Sin embargo bajo estas condiciones tampoco se observaron diferencias significativas con respecto al correspondiente control en los niveles de esteroides producidos (**Figura 10**).



**Figura 10: Efecto de agonistas específicos de HA sobre la respuesta esteroidogénica de las líneas celulares Y1 y H295R.** Las células fueron incubadas con agonistas específicos para cada subtipo de receptor para HA durante 24 horas a 37 °C. Los medios recuperados fueron utilizados para evaluar la producción de **a)** progesterona en la línea Y1, en presencia de ACTH 1 mUI/ml y **b)** cortisol en la línea H295R en presencia de dbAMPc 0,5 mM.

Dado que en publicaciones previas de nuestro laboratorio se reportó un efecto modulador negativo de HA  $10^{-5}$  M sobre la expresión de la proteína StAR durante la esteroidogénesis aguda de células de Leydig, en el presente trabajo se decidió evaluar

la expresión de dicha proteína en células córticoadrenales. Para ello las células Y1 y H295R fueron preincubadas con HA  $10^{-5}$  M y luego se estimuló la esteroidogénesis aguda con concentraciones submáximas de ACTH (1 mUI/ml) y dbAMPc (0,5 mM) respectivamente, evaluando la expresión de StAR a distintos tiempos (**Figura 11**). En concordancia con lo observado en la cuantificación de esteroides, los niveles de la proteína StAR en células tratadas con HA no difirieron respecto del correspondiente control, mientras que el aumento progresivo de la expresión de StAR a lo largo del tiempo respondió a los efectos ya conocidos de los inductores esteroidogénicos utilizados (Manna y col, 2009).



**Figura 11: Efecto de HA sobre la expresión de la proteína StAR.** Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de HA  $10^{-5}$ M en condiciones de esteroidogénesis estimulada durante distintos tiempos. Finalizadas las incubaciones se extrajeron las proteínas y se evaluó la expresión de StAR por Western blot. Inmunoblot de un experimento representativo y densitometría para StAR en **a)** la línea Y1 y **b)** la línea H295R. Los valores representan la

media  $\pm$  ES de 2 experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas al menos a nivel de  $p < 0,05$ .

### 2.3. Efecto de la HA sobre la proliferación de las líneas adrenocorticales Y1 y H295R

Se evaluó el crecimiento de ambas líneas celulares a 24 horas utilizando ensayos de incorporación de [3H]-Timidina durante la síntesis de ADN en ausencia (control) o presencia de concentraciones crecientes de HA ( $10^{-11}$  M a  $10^{-5}$  M), de acuerdo a los protocolos detallados en Materiales y Métodos (ver sección 2.6.).

Los resultados obtenidos difirieron entre las líneas celulares evaluadas; no se observó un efecto significativo de la HA sobre la proliferación de la línea murina Y1, mientras que las células córticoadrenales humanas H295R respondieron al tratamiento con una reducción del crecimiento concentración dependiente, alcanzando niveles de proliferación del  $67,4 \pm 3,7$  % respecto del control con la concentración máxima usada (HA  $10^{-5}$ M). En ambos casos se utilizó medio completo como control positivo de proliferación (Figura 12).

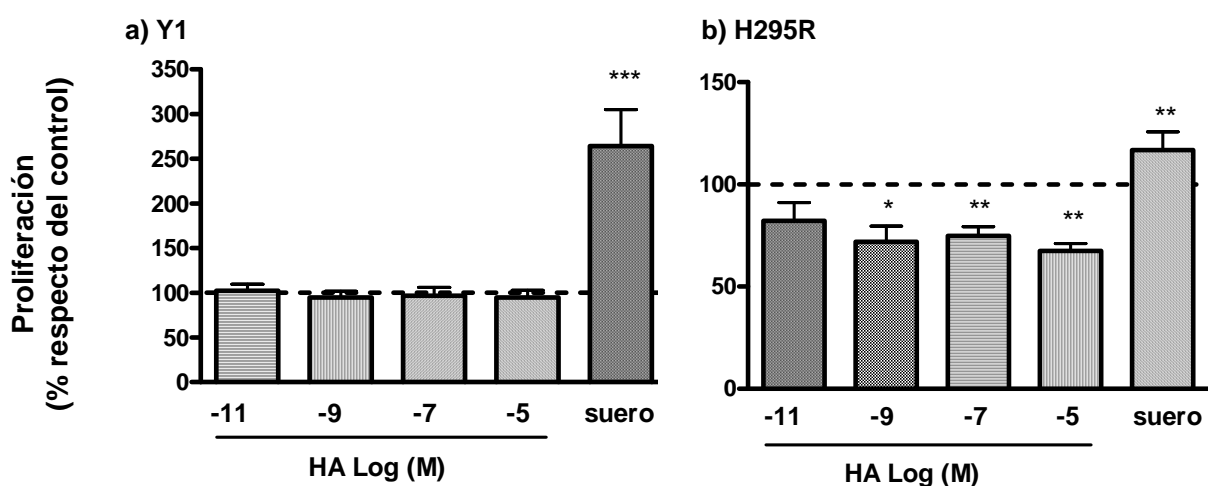


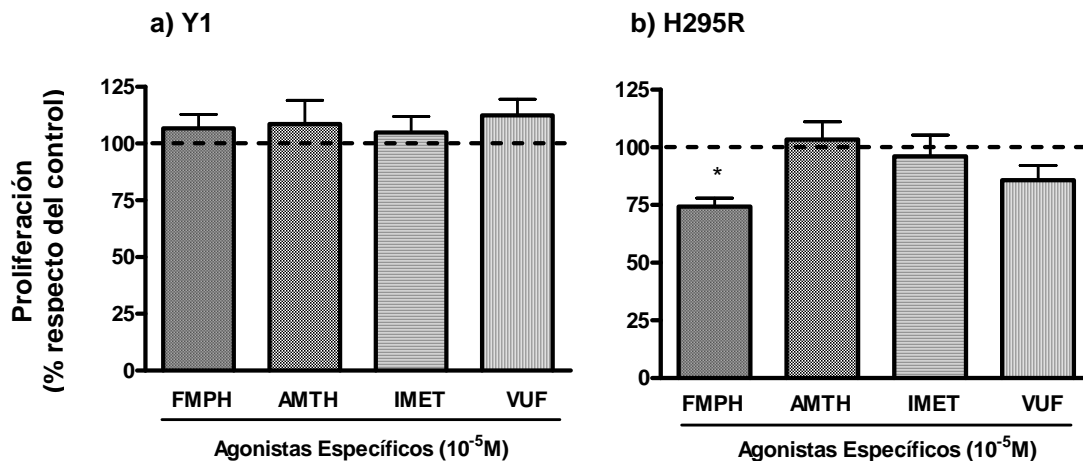
Figura 12: Efecto de la HA sobre la proliferación de las líneas adrenocorticales Y1 y H295R. Las células a) Y1 y b) H295R fueron incubadas durante 24 horas con concentraciones

crecientes de HA y durante las últimas 12 horas se dio un pulso de [3H]-Timidina. En presencia de HA la proliferación en la línea H295R se redujo un 30% mientras que no se observaron diferencias significativas en la proliferación de la línea murina Y1. Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes respecto del control de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 16 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100% de proliferación de las células incubadas en ausencia de HA (control). Los símbolos sobre las barras representan diferencias respecto del control con un nivel de significación de \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### **2.4. Efecto de agonistas específicos para los receptores de HA sobre la proliferación de las líneas córticoadrenales Y1 y H295R**

Se realizaron ensayos de proliferación en ambas líneas celulares por incorporación de [3H]-Timidina por 24 horas en presencia de concentraciones máximas no tóxicas ( $10^{-5}$  M) de agonistas específicos para cada subtipo de receptor. El 2-[(3-trifluorometil)fenil] histamina (FMPH) se empleó como agonista H1, la amtamina (AMTH) como agonista H2, el imetit (IMET) como agonista H3 y el Vuf 8430 (VUF) como agonista H4.

Como se observa en la **Figura 13**, el tratamiento con los distintos agonistas no produjo diferencias significativas en la proliferación de las Y1 respecto de su control. Estos resultados coinciden y apoyan los observados con las distintas concentraciones de HA en esta misma línea celular. En las células H295R, en cambio, el agonista H1, FMPH, fue el único capaz de inhibir la proliferación reduciendo el porcentaje a un valor similar al observado para una concentración equivalente de HA ( $74,31 \pm 3,61$  % respecto del control).



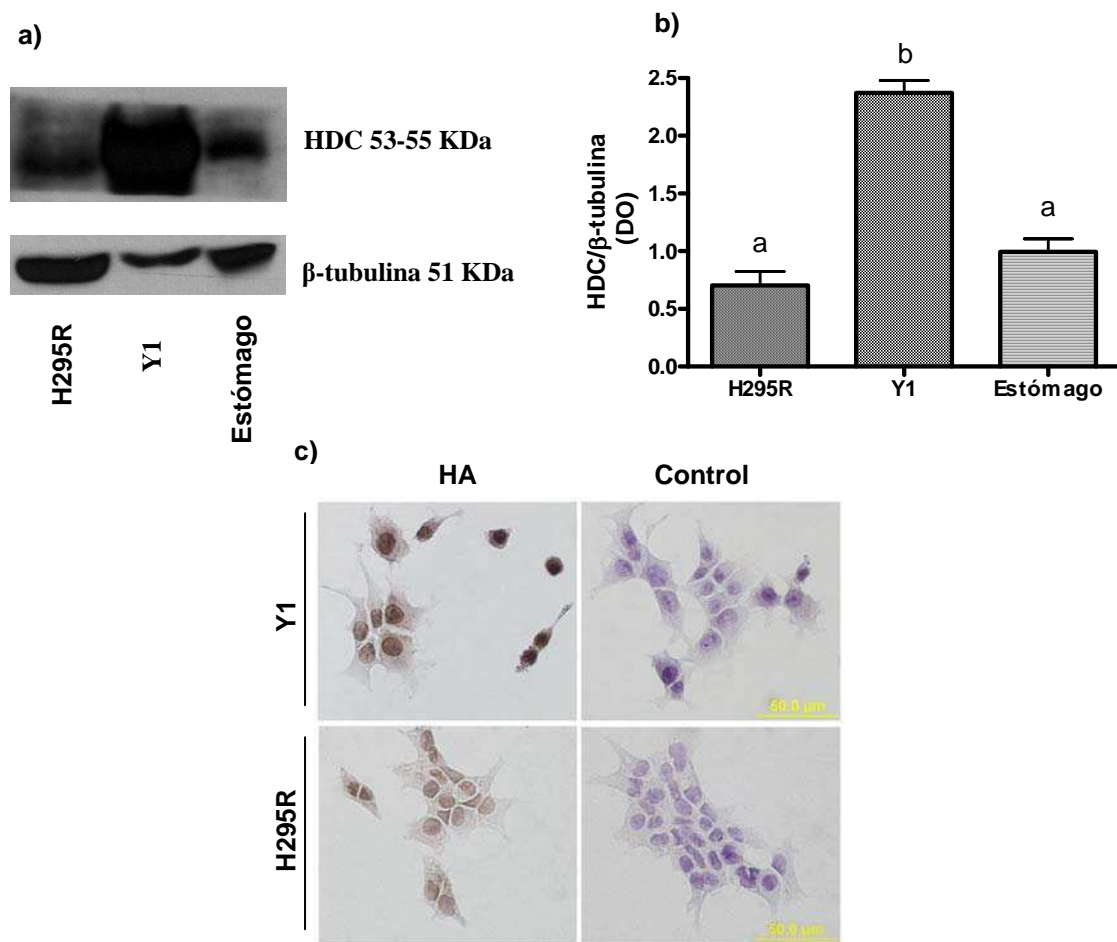
**Figura 13: Efecto de agonistas específicos para los receptores de HA sobre la proliferación de la línea adrenocortical Y1 y H295R.** Las células a) Y1 y b) H295R fueron incubadas durante 24 horas con agonistas específicos para los cuatro subtipos de receptores de HA: TFPM (H1), AMTH (H2), IMET (H3) y VUF (H4), en una concentración  $10^{-5}$  M y durante las últimas 12 horas se dio un pulso de [3H]-Timidina. El agonista H1 redujo significativamente la proliferación en la línea celular H295R. Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes respecto del control de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 16 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100 % de proliferación de las células incubadas en ausencia de HA (control). El símbolo \* sobre la barra representa diferencias respecto del control con un nivel de significación de  $p < 0,01$ .

## 2.5. Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa (HDC) y contenido endógeno de HA en las líneas celulares Y1 y H295R

En ambas líneas celulares la capacidad endógena para sintetizar HA fue evaluada mediante la detección de la proteína HDC, única enzima capaz de sintetizar esta amina. Las células mantenidas en cultivo durante tres días se procesaron como se indica en Materiales y Métodos (ver sección 2.7.) y los extractos celulares se emplearon para realizar Western blot. El revelado permitió visualizar bandas en el

rango de 53-55 KDa, que coinciden con la forma activa de la enzima. Como control positivo se utilizó un extracto de estómago de ratón, en el que se observó el mismo patrón de bandas. El análisis densitométrico de las bandas mostró que el nivel de expresión de la proteína HDC resultó ser significativamente mayor en la línea murina Y1 en comparación con las células H295R.

El contenido endógeno de HA se evaluó cualitativamente por medio de una inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo específico anti-HA. Este ensayo se repitió al menos tres veces y en todos los casos los resultados fueron consistentes. La marcación para HA fue más intensa en la línea Y1, indicando un contenido endógeno mayor que en las H295R, coincidiendo con los niveles proteicos de HDC hallados. Los resultados se observan en la **Figura 14**.



**Figura 14: Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa en las líneas celulares Y1 y H295R.** Extractos proteicos de la línea celular Y1, H295R y de extracto de estómago de ratón

fueron separados por SDS-PAGE e incubados con un anticuerpo anti-HDC. **a)** Western blot de un experimento representativo y **b)** densitometría. Se observaron bandas correspondientes a la forma activa de HDC (53-55 KDa) en los tres extractos, siendo mayor la DO de la banda para las células Y1. Los valores representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas a nivel de  $p < 0,01$ . **c)** Inmunocitoquímica para el contenido endógeno de HA en ambas líneas celulares. Para el control negativo se omitió el anticuerpo primario. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ .



### **3. DISCUSIÓN**

Como se mencionó en la introducción, en trabajos previos de nuestro laboratorio se reportó un efecto dual de HA sobre la síntesis de esteroides en células de Leydig de roedores. Sobre la base de dichos trabajos, bajas concentraciones de esta amina ( $10^{-9}$  M) inducían un aumento en la esteroidogénesis aguda, mientras que altas concentraciones ( $10^{-5}$  M) la inhibían (Mondillo y col, 2005). Estos mismos resultados fueron reproducidos en células de Leydig de otras especies, como lagartos (Khan y col, 2007). En hámster, HA también fue capaz de modular la esteroidogénesis en ese tipo celular, si bien sólo se describió un efecto estimulador, (Mayerhofer y col, 1989).

Con el objeto de evaluar si los efectos de HA sobre la síntesis de esteroides eran extrapolables a otros tejidos esteroidogénicos, en este trabajo de Tesis Doctoral se estudió la acción directa de la amina y de sus agonistas sobre células córticoadrenales Y1 y H295R. Sin embargo no se halló un efecto significativo sobre la producción de esteroides en ninguna de las condiciones evaluadas. Es más, a diferencia de lo observado en células de Leydig, en los modelos experimentales utilizados HA no modificó los niveles de expresión de StAR, una proteína clave para el transporte de colesterol al interior de la mitocondria durante la fase aguda de la esteroidogénesis.

Estos resultados coinciden con trabajos previos realizados en co-cultivos primarios de médula y corteza adrenal bovina, en los que se descarta una acción directa de HA sobre células de la corteza adrenal, sugiriéndose un efecto indirecto (Yoshida et al, 1997). En dichos trabajos se propone que HA actuaría a través del receptor H1 presente en las células cromafines de la médula induciendo la liberación de neuropéptidos. Serían estas moléculas y no HA las que en última instancia, actuarían directamente sobre las células de la corteza adrenal, regulando la secreción de cortisol (Ehrhart-Bornstein y col, 2000).

Si bien existen algunas publicaciones que apoyan un rol estimulador directo de HA sobre la síntesis de esteroides en células córticoadrenales (Aikawa y col, 1981;

Hirose y col, 1978), la mayoría de ellas basaron sus estudios en ensayos de perfusión de glándulas adrenales enteras o cultivos primarios, por lo que no se puede descartar que el efecto reportado haya sido mediado por células cromafines presentes en la médula adrenal o remanentes en los cultivos. En este estudio, el empleo de líneas celulares córticoadrenales puras como modelo de trabajo permitió evaluar un rol directo de HA sobre este tipo celular, excluyendo la contaminación con células cromafines. De acuerdo a lo observado en las líneas Y1 y H295R, HA no sería capaz de regular en forma directa la síntesis de esteroides de células córticoadrenales, demostrando que el efecto modulador observado en células de Leydig no sería extrapolable a todos los sistemas esteroidogénicos.

En cuanto a la capacidad de HA para regular la proliferación de células tumorales córticoadrenales, los resultados fueron diferentes entre las líneas evaluadas. La línea murina Y1 no respondió al tratamiento con HA o con los agonistas específicos para los subtipos de receptores, mientras que la línea humana H295R redujo su crecimiento a alrededor del 60 % respecto del control con concentraciones máximas (HA  $10^{-5}$  M), efecto que fue reproducido por el agonista específico H1 (FMPH).

A pesar de que ambas líneas celulares derivan de tumores de la corteza adrenal, el hecho de que sean células inmortalizadas y provengan de distintas especies animales implica diferencias a nivel fisiológico y molecular que podrían explicar la respuesta diferencial a HA. En la bibliografía existen evidencias de acciones proliferativas variables de HA en distintas líneas celulares provenientes de una misma especie y tipo celular. Al respecto, Adams y col (1994) estudiaron el efecto de un antagonista H2 sobre la proliferación de 4 líneas celulares de cáncer de colon humano, encontrando un efecto inhibitorio en sólo dos de ellas. Un resultado similar fue publicado por Reynolds y col (1996) que estudiaron los efectos de HA sobre la proliferación de cuatro líneas de melanoma, hallando un efecto significativo sólo en dos de ellas.

En el presente trabajo se observó que el patrón de expresión de los receptores para HA fue muy similar entre las líneas Y1 y H295R, excepto por el receptor H2, cuya marca fue casi nula en la segunda. Sin embargo, es poco probable que esta diferencia explique la variabilidad en la respuesta a HA entre las citadas líneas celulares, ya que el efecto antiproliferativo en las H295R resultó ser mediado por el receptor H1, cuya marcación por la técnica de inmunocitoquímica fue muy similar a la observada para las Y1.

Para tratar de explicar esta diferencia, se compararon los niveles de expresión de la proteína HDC y de HA endógena entre las dos líneas, encontrándose mayor expresión para ambos parámetros en las células Y1. En varios trabajos se ha hallado una correlación positiva entre un incremento en la actividad de HDC y la incidencia de algunos tipos de tumores, como el cáncer de colon, melanoma, cáncer de páncreas, de mama y de estómago (Ai y col, 2006). HA contribuiría en el desarrollo de estos tipos tumorales promoviendo la angiogénesis a través de los receptores H1 y H2. En este sentido, estudios realizados en ratones HDC<sup>-/-</sup> demostraron que la capacidad angiogénica y los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son más bajos en el ratón HDC<sup>-/-</sup> comparado con el salvaje. A su vez, la producción de HA también estaría asociada a la progresión tumoral al contribuir con la generación de un ambiente inflamatorio crónico, por inducción de la producción de citoquinas inflamatorias (Artuc y col, 2011; Conti y col, 2007).

Al igual que lo observado en otros tipos tumorales, los resultados que se presentan en este trabajo de Tesis sugieren que el cáncer de células córticoadrenales en ratón podría estar asociado a un alto contenido de HA y de su enzima sintetizadora.

A su vez, la diferencia en los niveles de expresión de la enzima HDC y en el contenido endógeno de HA entre las líneas celulares Y1 y H295R podría explicar el efecto diferencial de la amina sobre la proliferación de las mismas. Las concentraciones de HA utilizadas en los ensayos podrían no haber sido suficientes

para superar los niveles basales endógenos de las células Y1. Además el contenido endógeno de HA sostenido en el tiempo podría haber provocado la internalización de sus receptores e incluso reducir sus niveles de expresión, como se ha reportado en otros sistemas, anulando la capacidad de respuesta a HA (Hishinuma y col, 2010; Miyoshi y col, 2006).

Se ha demostrado que los efectos de HA sobre la proliferación celular pueden ser mitogénicos o antimitogénicos, dependiendo del tipo celular blanco de su acción, el patrón de expresión de los receptores y la concentración de HA empleada (Falus y col 2011; Medina y Rivera, 2010). En particular en la corteza adrenal humana, un trabajo reciente demostró que tanto los niveles de ARN mensajero para HDC como el contenido de HA son significativamente más bajos en tumores córticoadrenales en comparación con la corteza adrenal normal. Más aún, en dicho trabajo las muestras de carcinoma córticoadrenal presentaron valores de ambos parámetros más bajos que los adenomas (Szabó y col, 2009). Estos resultados sugieren que en la corteza adrenal humana HA regularía el crecimiento basal limitando la proliferación. Niveles de HA más bajos que los normales estarían asociados a una proliferación patológica; más aún, HA podría cumplir un rol en la determinación del grado de malignidad de este tipo de tumores. Los resultados que aquí se presentan apoyan estas evidencias ya que en la línea celular H295R, proveniente de un carcinoma córticoadrenal humano, HA ejerció un efecto antiproliferativo a través de la activación del receptor H1, como lo confirmaron los ensayos realizados con el agonista específico para este subtipo de receptor, el FMPH.

Este mismo mecanismo de acción de HA ha sido descrito en la línea de cáncer de próstata DU-145 y en células de ovario de hámster (CHO) transfectadas de manera estable con el receptor H1 (Valencia y col, 2001; Notcovich y col, 2010). En ambos casos la activación del receptor H1 por acción de HA conlleva a una inhibición de la proliferación celular.

En conjunto, los resultados de este primer capítulo de Tesis sugieren que HA, en forma autócrina y/o parácrina, modularía la proliferación de las líneas celulares tumorales humanas H295R, induciendo una reducción de su crecimiento través de la activación del receptor para HA subtipo H1.

## **CAPÍTULO 2**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN INVOLUCRADO EN EL EFECTO  
INHIBITORIO DE HA MEDIADO POR EL RECEPTOR H1 SOBRE LA  
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS H295R.**

**1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

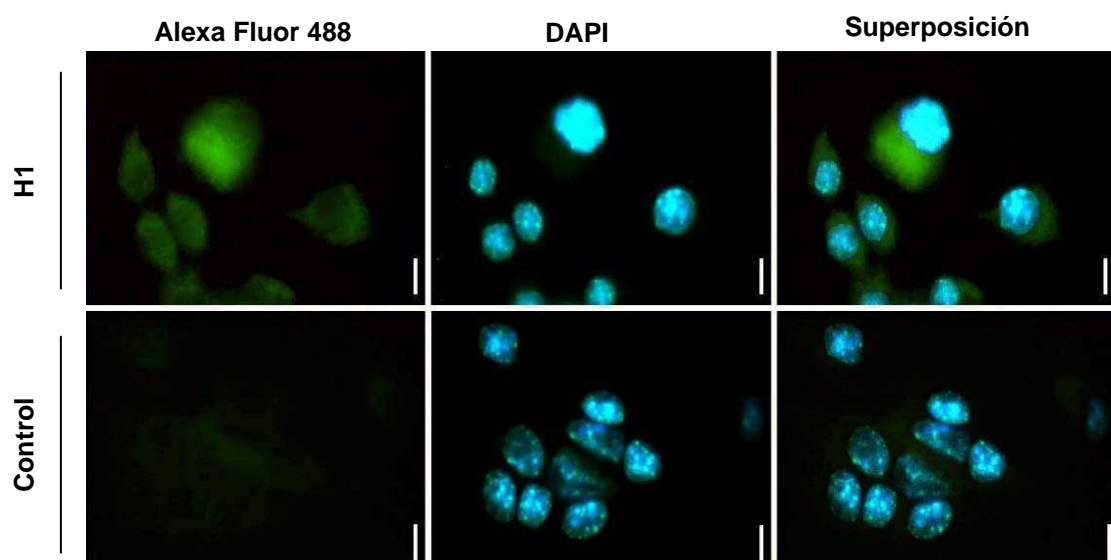
Para dilucidar el mecanismo de señalización involucrado en el efecto antiproliferativo mediado por HA a través del receptor H1 en las células H295R se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el receptor H1 en la línea H295R
- Evaluar posibles vías de señalización asociadas a la activación del receptor H1 en las células H295R mediante el estudio de los segundos mensajeros involucrados
- Profundizar el estudio del efecto inhibitorio ejercido por HA sobre la proliferación de las células H295R analizando el efecto de la amina sobre las distintas fases del ciclo celular y la inducción de apoptosis.

## 2. RESULTADOS

### 2.1. Estudio del receptor histaminérgico H1 en la línea celular H295R.

Mediante un ensayo de inmunofluorescencia se evaluó la presencia del receptor H1 en las células H295R. Para ello se utilizó un anticuerpo específico anti-H1 y un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488. En la **Figura 15** se observa una marcación positiva para el receptor H1 (verde) en el citoplasma celular.

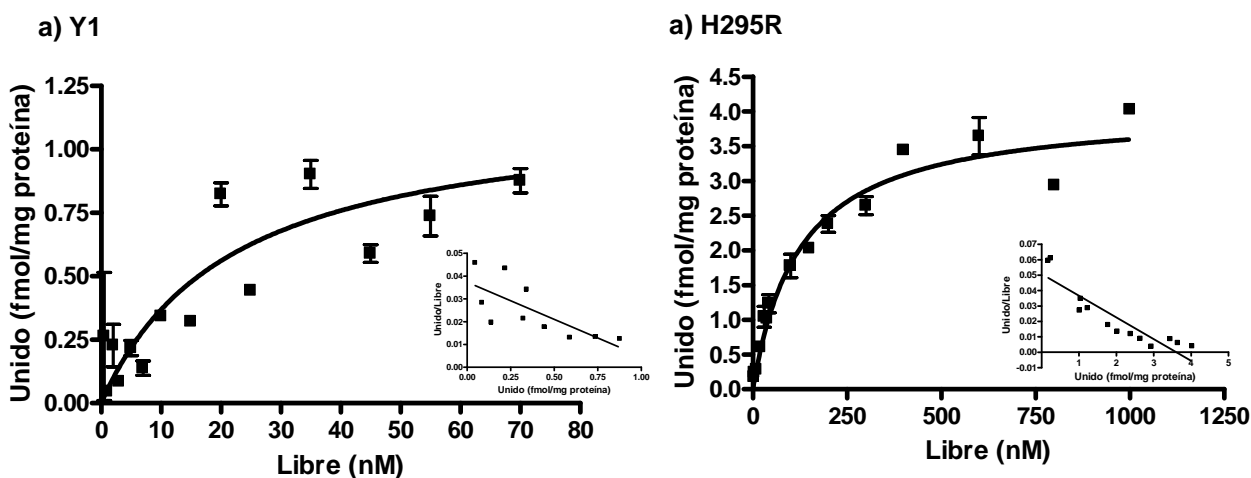


**Figura 15: Identificación del receptor H1 en células H295R por inmunofluorescencia.** Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un primer anticuerpo anti-H1 y un segundo anticuerpo conjugado con Alexa Fluor 488. Se observó una marcación positiva (verde) para el receptor H1 en el citoplasma de las células H295R. Los núcleos se muestran con DAPI (azul). La barra representa 25  $\mu\text{m}$ .

Para corroborar la presencia del receptor H1 en la superficie celular y determinar sus parámetros cinéticos ( $K_d$  y  $B_{\text{máx}}$ ) se realizó un ensayo de unión ligando-receptor utilizando  $[^3\text{H}]$ -Pirilamina como radioligando específico. El mismo ensayo se realizó



con la línea celular Y1 a efectos comparativos. La **Figura 16** muestra la curva de saturación obtenida para ambas líneas celulares, a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo de un sitio de unión, que resultó significativamente mejor según la prueba parcial F. El receptor H1 en la línea H295R presentó una  $K_d$  significativamente mayor que el mismo receptor en Y1, indicando que la afinidad del receptor para su ligando específico es menor en las H295R ( $K_d$  para H1 en H295R =  $124,4 \pm 15,8$  nM, siendo el intervalo de confianza 95 % = 93,5 a 155,2 y  $K_d$  para H1 en Y1 =  $21,8 \pm 8,3$ , siendo el intervalo de confianza 95 % = 4,8 a 38,8). Por el contrario, las células Y1 presentaron una  $B_{máx}$  menor que las H295R para el receptor H1, por lo que en estas últimas habría más sitios de unión para H1 (en H295R  $B_{máx}$  =  $4,0 \pm 0,2$  fmol/mg proteína con IC 95 % = 3,7 a 4,4; en Y1  $B_{máx}$  =  $1,2 \pm 0,2$  con IC 95 % = 0,8 a 1,5).

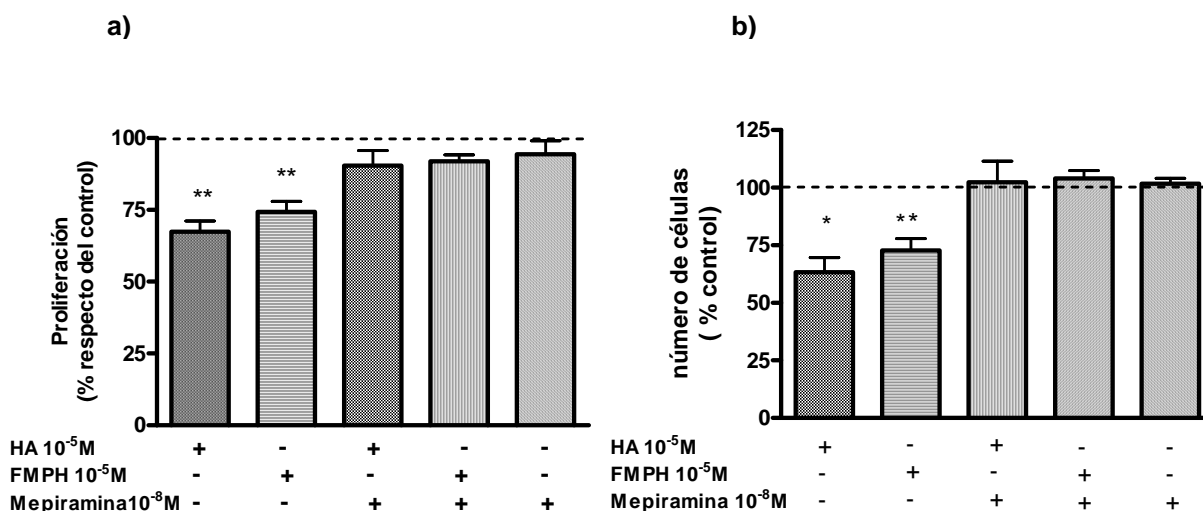


**Figura 16: Ensayo de saturación con [3H]-Pirilamina.** El gráfico Unido vs Libre muestra la unión específica al receptor H1 en función de la concentración de radioligando libre en **a)** células Y1 y **b)** células H295R. Cada punto representa el promedio  $\pm$  ES de 3 experimentos independientes. La linealización según Scatchard correspondiente a los datos de saturación se muestra en el gráfico interior.

## 2.2. Participación del receptor H1 en el mecanismo de inhibición de la proliferación mediado por HA

Se utilizaron dos técnicas diferentes (incorporación de [3H]-Timidina y MTT) para confirmar la participación del receptor H1 en el efecto inhibitorio mediado por HA sobre la proliferación de la línea celular H295R. Las células fueron preincubadas durante 30 minutos con el antagonista específico H1 Mepiramina en una concentración final de  $10^{-8}$  M. Transcurridos los 30 minutos se le agregó al medio HA o FMPH en las concentraciones que producían un efecto inhibitorio máximo ( $10^{-5}$  M) y se continuó el ensayo de acuerdo a los protocolos correspondientes para cada técnica (ver secciones 2.6.1. y 2.6.3.).

Los resultados indican que la preincubación con el antagonista Mepiramina revirtió los efectos de HA y del agonista H1, sin tener un efecto significativo por sí mismo sobre la proliferación (Figura 17).



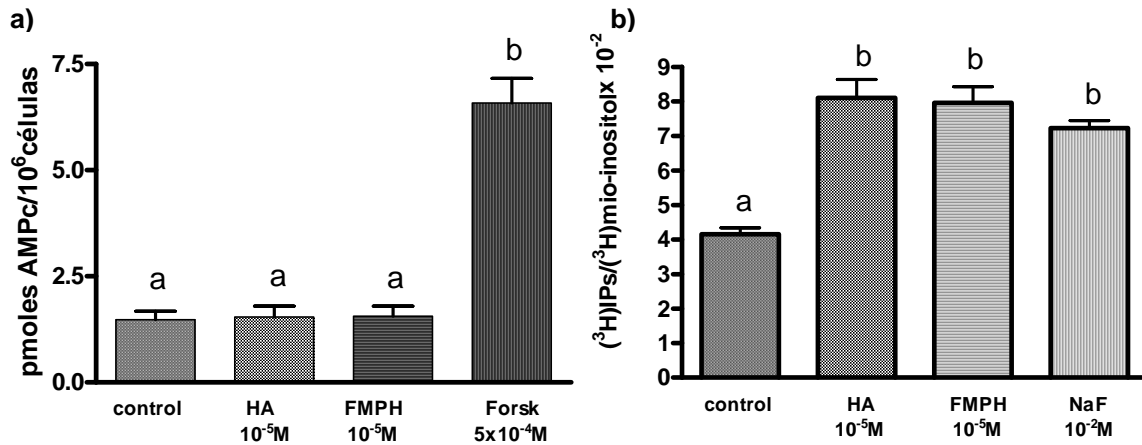
**Figura 17: Efectos del antagonista específico H1, Mepiramina, sobre la inhibición de la proliferación mediada por HA a) Incorporación de [3H]-Timidina y b) MTT. La reducción en la proliferación observada con HA y con el agonista específico H1 (FMPH) se revirtió en presencia del antagonista Mepiramina. Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes**

respecto del control de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 16 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100% del control (sin tratamientos). Los símbolos sobre las barras representan diferencias respecto del control con un nivel de significación de \* =  $p < 0,001$  y \*\* =  $p < 0,01$ .

La vía clásica de transducción descrita para el receptor H1 involucra un GPCR asociado a una proteína Gq, con la consecuente activación de una fosfolipasa C (PLC), la producción de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) y la liberación de  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares. Sin embargo en diversos sistemas tumorales los receptores para HA se han visto asociados a vías de señalización atípicas o a entrecruzamientos de señales (Davio y col, 1995; Fitzsimons y col, 1997; Hill, 1991). A fin de evaluar la vía activada por el receptor H1 en la línea celular H295R, se midieron los niveles de AMPc e inosoles fosfato (segundos mensajeros involucrados en la activación de los GPCR) en presencia de HA y del agonista H1, FMPH de acuerdo al protocolo especificado en Materiales y Métodos (ver secciones **2.4.** y **2.5.**).

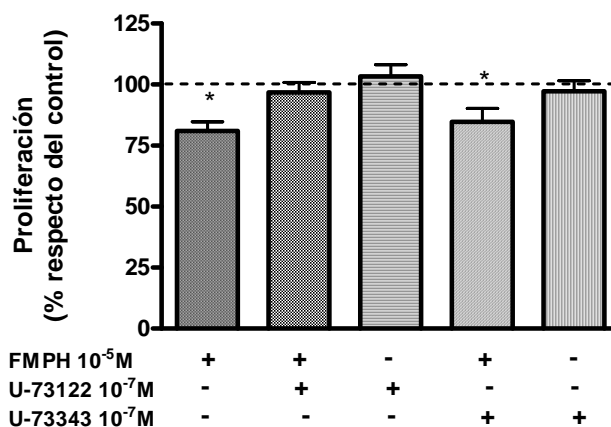
Como se puede observar en la **Figura 18 a**, no se encontraron diferencias significativas respecto del control en los niveles de AMPc producidos con HA ni con FMPH. Sin embargo la incubación con el activador de la adenilato ciclasa, Forskolina 10 mM (utilizado como control positivo) indujo un incremento de 4 veces el valor del control (en pmoles AMPc/ $10^6$  células: Forsk 10mM =  $6,4 \pm 0,6$ ; control =  $1,4 \pm 0,2$ ).

Para la medición de inosoles fosfato totales (IPs), las células premarcadas con [ $^3H$ ]-Mio-inositol fueron incubadas durante 30 minutos con HA  $10^{-5}$  M, FMPH  $10^{-5}$  M o NaF  $10^{-2}$  M, éste último utilizado como control positivo. Finalizada la incubación los IPs se separaron por columna de intercambio iónico y se cuantificaron por medición de la radioactividad recuperada, como se indica en Materiales y Métodos. Como se observa en la **Figura 18 b**, tanto el tratamiento con HA como FMPH incrementaron los niveles de IPs en 2 veces el valor del control (en [ $^3H$ ]-IPs/[ $^3H$ ]-mio-inositol  $\times 10^{-2}$ : HA  $10^{-5}$  M =  $8,1 \pm 0,5$ ; FMPH  $10^{-5}$  M =  $7,9 \pm 0,4$ ; control =  $4,1 \pm 0,4$ ).



**Figura 18: Medición de segundos mensajeros.** a) Medición de AMPc intracelular: las células fueron incubadas por 20 minutos con los estímulos. El AMPc intracelular se recuperó y se midió por RIA. b) Medición de IPs: las células premarcadas con [<sup>3</sup>H]-Mio-inositol fueron incubadas durante 30 minutos, y los IPs separados se cuantificaron por radiactividad recuperada. Se utilizó NaF 10<sup>-2</sup> M como control positivo. Los valores representan la media ± ES de los porcentajes respecto del control de tres experimentos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas al menos a un nivel de significancia de p<0,01.

A fin de confirmar la participación de la vía PLC/IP3 en el mecanismo de señalización de H1, se estudió el efecto de un inhibidor específico de PLC (U-73122) y de su análogo inactivo (U-73343) sobre la proliferación de las células H295R. Para ello, se realizaron ensayos de incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina en células incubadas con FMPH 10<sup>-5</sup> M, en ausencia o presencia de U-73122 o U-73343 (ambos 10<sup>-7</sup> M) durante 24 horas. Los resultados muestran que el inhibidor U-73122 fue capaz de revertir el efecto inhibitorio del agonista H1 sobre la proliferación, a diferencia de su análogo inactivo U-73343 (**Figura 19**).



**Figura 19: Efecto del inhibidor de la PLC U-73122 sobre la inhibición de la proliferación mediada por el agonista H1 en las células H295R.** Se realizaron ensayos de proliferación por incorporación de [3H]-Timidina en células H295R incubadas con FMPH  $10^{-5}$  M en ausencia o presencia del inhibidor de PLC U-73122 o su análogo inactivo U-73343. Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes respecto del control de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 12 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100% del control (sin tratamientos). Los símbolos sobre las barras representan diferencias respecto del control con un nivel de significación de \* =  $p < 0,05$ .

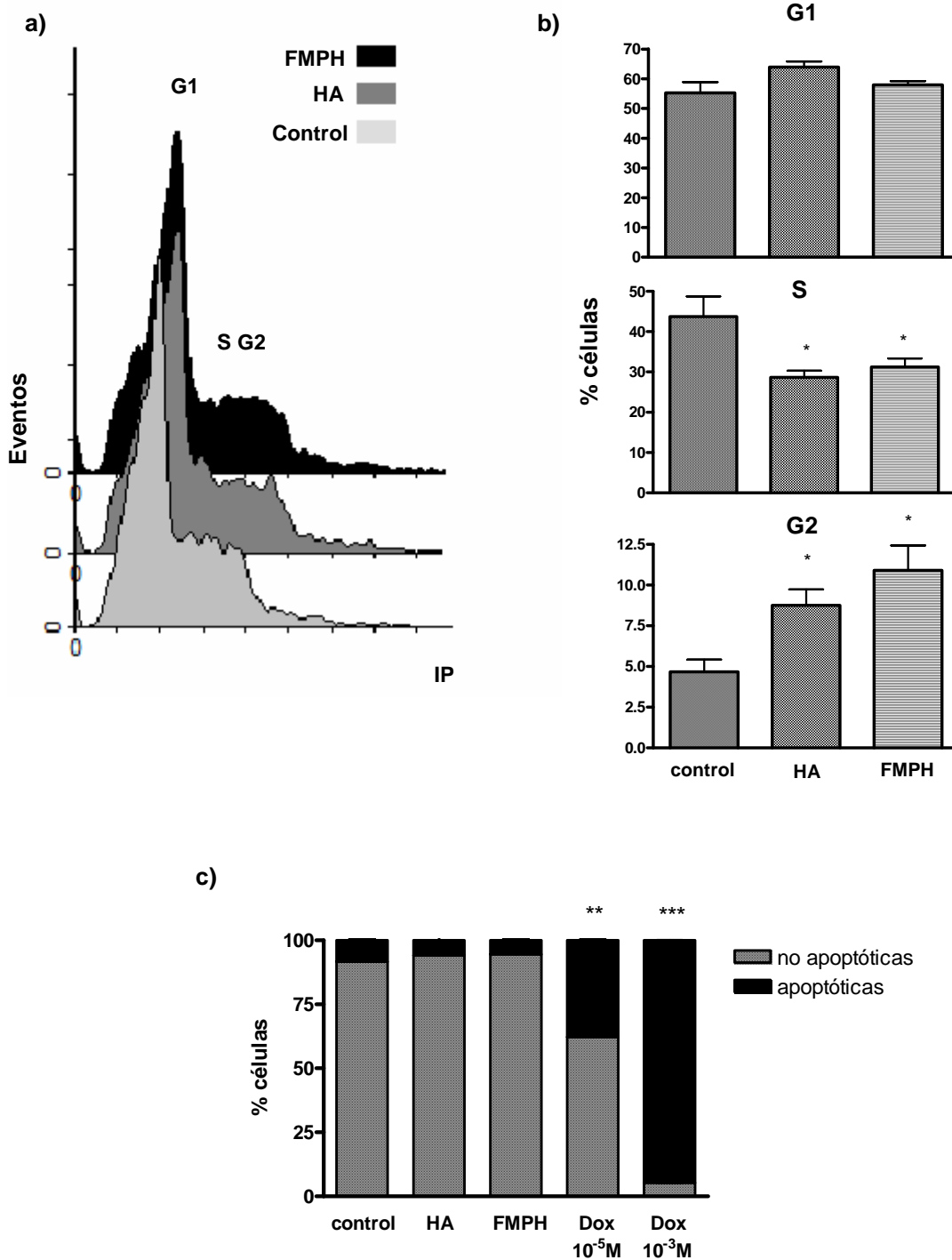
### 2.3. Efecto de HA y FMPH sobre la progresión del ciclo celular y la inducción de apoptosis en las células H295R

Para profundizar los estudios sobre el mecanismo por el cual HA inhibe la proliferación en las células H295R se procedió al estudio del ciclo celular.

Las células tratadas con HA o FMPH ( $10^{-5}$  M) por 24 horas fueron fijadas y procesadas para la tinción con IP y el análisis por citometría de flujo.

Los resultados muestran que a 24 horas el tratamiento con HA y FMPH indujo un incremento significativo en el porcentaje de células en la fase G2/M (G2/M en % de células: C =  $4,6 \pm 0,8$ ; HA =  $8,75 \pm 0,9$ ; FMPH =  $10,9 \pm 1,5$ ), acompañado por una reducción en la fase S (S en % de células: C =  $43,0 \pm 4,9$ ; HA =  $28,6 \pm 1,6$ ; FMPH =  $31,2 \pm 2,11$ ) (**Figura 20 a,b**).

Por otra parte, se evaluó la inducción de apoptosis por la técnica de TUNEL. Esta técnica permite detectar las rupturas en el material genético que tienen lugar durante la apoptosis por acción de endonucleasas específicas. Parte de las células sembradas se destinaron como controles positivos para apoptosis y para ello fueron incubadas con doxorrubicina durante 24 horas.

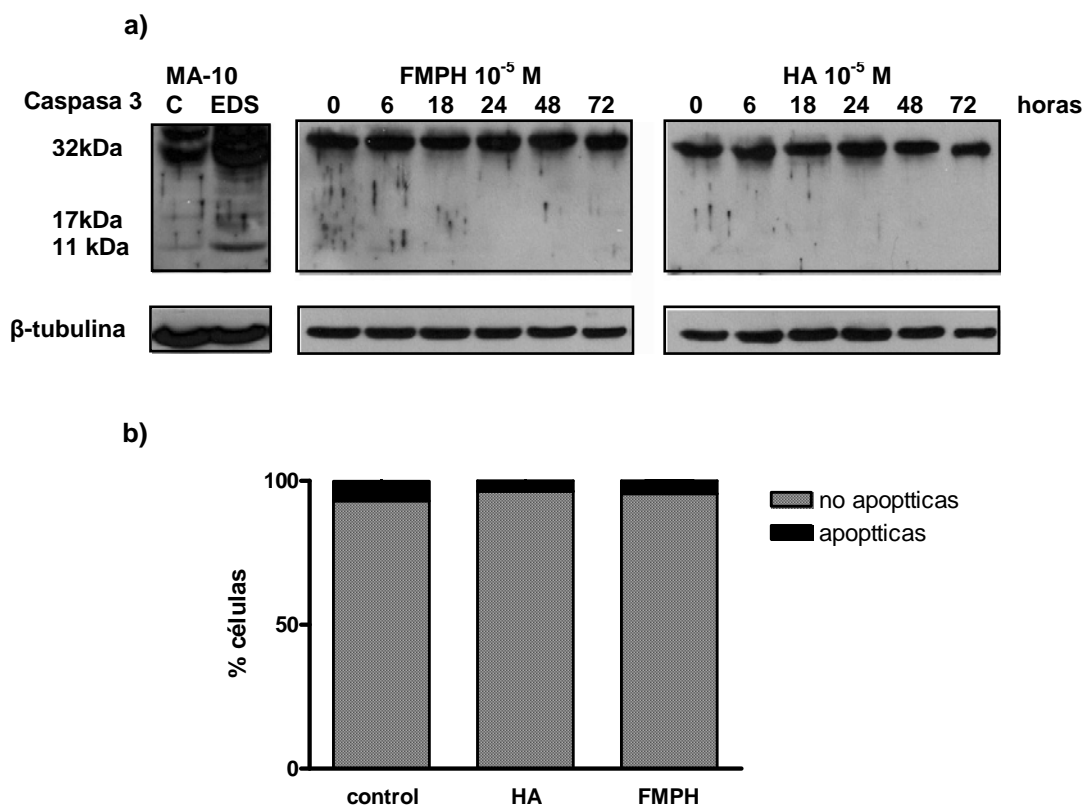


**Figura 20: Efecto de HA y FMPH sobre la progresión del ciclo celular y la inducción de apoptosis en células H295R a 24 h de tratamiento.** Las células fueron incubadas durante 24 horas con HA y FMPH ( $10^{-5}$  M). Posteriormente se evaluó ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo **a)** y **b)** Ciclo celular por tinción con IP. **a)** Histogramas del contenido de ADN celular para los distintos tratamientos de un experimento representativo; **b)** Porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. **c)** Medición de la apoptosis por la reacción de Tunel. Como control positivo de apoptosis se utilizó doxorubicina  $10^{-3}$  M y  $10^{-5}$  M. Los valores representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 5 réplicas por tratamiento. El símbolo sobre las barras representa diferencias respecto del control con un nivel de significación de \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$  y \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Si bien los controles positivos mostraron un alto porcentaje de células apoptóticas, confirmando la utilidad de la técnica, los tratamientos con HA y FMPH durante 24 horas no mostraron niveles de apoptosis diferentes respecto del control, como se observa en la **Figura 20 c**.

Dado que la reacción de Tunel reconoce un evento apoptótico tardío, se contempló la posibilidad de que la ventana temporal evaluada (24 horas) no fuera la adecuada para detectarlo. Para confirmar estos resultados se evaluó nuevamente apoptosis por la técnica de Tunel a 72 horas de iniciado los respectivos tratamientos, sin renovar estímulos durante ese período de tiempo. Además se realizó un ensayo de Western blot a distintos tiempos post-tratamiento para la detección específica de la proteína caspasa 3. Ésta es una de las enzimas efectoras tanto de la vía apoptótica intrínseca como extrínseca; se expresa en las células en forma de un precursor inactivo que durante la apoptosis es clivado dando lugar a dos subunidades de menor peso molecular (11 y 17 kDa), que son las formas ya maduras y activas de la enzima. Para la detección de la caspasa 3 se utilizó un anticuerpo anti-caspasa 3 (Santa Cruz, SC 7148) capaz de reconocer la forma de pro-caspasa 3 (32 kDa) y de sus subunidades (11, 17 y 20 kDa).

En la **Figura 21** se muestran los inmunoblots representativos para la detección de la enzima caspasa 3 obtenidos a partir de extractos de células H295R tratadas con HA y FMPH, ambos a una concentración  $10^{-5}$  M, a distintos tiempos y el porcentaje de células apoptóticas a 72 horas, evaluado por la técnica de TUNEL y citometría de flujo.



**Figura 21: Estudio de la inducción de apoptosis por HA en células H295R.** a) Detección de caspasa 3 activada. Las células H295R fueron incubadas en presencia de HA o FMPH  $10^{-5}$  M durante distintos tiempos. Se extrajeron las proteínas y se realizaron ensayos de Western blot para la detección de caspasa 3 en su forma de precursor inactivo y sus subunidades activas. Como control de apoptosis se utilizaron células MA-10 tratadas durante 24 horas con el compuesto EDS. b) Determinación de apoptosis a 72 horas post-tratamiento por la técnica de TUNEL.

En ninguno de los dos tratamientos (HA y FMPH, ambos  $10^{-5}$  M) se observaron bandas correspondientes a las subunidades clivadas de caspasa 3, y en cambio sí se



revelaron bandas en el rango de 32 kDa pertenecientes al precursor inactivo (**Figura 21 a**). Para verificar la capacidad del anticuerpo de reconocer las subunidades clivadas se empleó como control positivo de apoptosis un extracto de células esteroideogénicas MA-10 tratadas por 24 horas con 1ug/ml de EDS (Kim y col, 2000). Como se observa en la figura, bajo estas condiciones el anticuerpo anti-caspasa 3 reveló la existencia de las dos subunidades de menor peso molecular (17 y 11 kDa) correspondientes a la forma activa de la enzima.

Acorde con los resultados obtenidos con el estudio de la caspasa 3, el ensayo de Tunel a 72 horas no mostró diferencias significativas en el porcentaje de células apoptóticas entre los tratados con HA y FMPH y el control (células sin tratamiento) (**Figura 21 b**).

### **3. DISCUSIÓN**

El receptor para HA subtipo H1 se encuentra presente en varios tipos celulares incluyendo células endoteliales, del músculo liso y del sistema nervioso (Thurmond y col, 2008). A través de ensayos de unión utilizando como ligando específico [3H]-Mepiramina se ha demostrado la presencia de este receptor en varios órganos, siendo el cerebro, el corazón, el pulmón y la glándula adrenal los de mayor número de sitios de unión (Chang y col, 1979; Casale y col, 1985; Driver y col 1987; Mizuguchi y col, 1991).

En particular en la glándula adrenal bovina, se ha reportado la presencia del receptor H1 en la corteza y en la médula, siendo más abundante y teniendo mayor afinidad por HA el presente en esta última región (Yamashita y col, 1991). En este trabajo, por primera vez, se identificó el receptor H1 en la línea celular córticoadrenal humana H295R empleando la técnica de inmunofluorescencia. Sus parámetros cinéticos fueron determinados por medio de un ensayo de unión ligando-receptor utilizando [3H]-Pirilamina como ligando específico. En cuanto a los valores obtenidos para  $K_d$  y  $B_{máx}$ , éstos se ubicaron dentro del rango de los reportados en la bibliografía. El receptor H1 de las células H295R presentó una afinidad menor y una mayor cantidad de sitios de unión que el de las células murinas Y1. Por otra parte, sólo las células H295R respondieron al tratamiento con HA y FMPH, lo que sugiere que bajo las condiciones evaluadas, una mayor afinidad del receptor por su ligando no sería una característica determinante para asegurar una respuesta biológica. Una afinidad menor por HA podría verse compensada por la presencia de más sitios de unión y, a su vez, un receptor con alta afinidad podría ser más susceptible a fenómenos de desensibilización, lo que explicaría, al menos en parte, las diferentes respuestas a HA entre ambas líneas celulares. Al respecto, se ha reportado en células CHO transfectadas con el receptor H1 que HA es capaz de regular negativamente dicho receptor a través de un mecanismo de desensibilización que involucraría la

internalización de los receptores por endocitosis mediada por clatrina y su degradación por proteasomas (Hishinuma y col, 2010). La fosforilación de al menos cinco residuos treonina y serina presentes en la secuencia aminoacídica del receptor sería otro evento necesario en este proceso de desensibilización (Horio y col, 2004).

Existen evidencias que demuestran que HA es capaz de modular negativamente la proliferación celular en varios sistemas y a través de más de un subtipo de receptor. Por ejemplo, en células de cáncer de próstata HA inhibe la proliferación a través del receptor H1, mientras que en cáncer de páncreas el receptor involucrado es el H2. La proliferación de queratinocitos es inhibida mediante el receptor H3 y en colangiocarcinomas, mediante el receptor H4 (Valencia y col, 2001; Cricco y col, 2006; Meng y col, 2011; Francis y col, 2009).

En las células H295R, HA fue capaz de inhibir la proliferación a 24 horas a través de la activación del receptor H1, conforme los ensayos con el agonista y antagonista específicos permitieron corroborarlo. El incremento en los niveles de IPs sin modificación del contenido de AMP cíclico indicaron que la activación del receptor H1 en este tipo celular estaría asociada a la vía de señalización clásica, que involucra la participación de una proteína Gq y una PLC, con el consecuente incremento en los niveles de IP<sub>3</sub> y DAG como segundos mensajeros. Asimismo, la reversión del efecto antiproliferativo de HA observado en presencia del inhibidor específico de la PLC (U-73122) permitió confirmar la participación de la citada vía en la inhibición de la proliferación (**Figura 22**).

Este mismo mecanismo de señalización fue descrito en la línea de cáncer de próstata DU-145 (Valencia y col, 2001) y en células CHO transfectadas de forma estable con el receptor H1, en las cuales HA también ejerce un efecto antiproliferativo. En este último caso, se demostró que la unión de HA al receptor H1 y la consecuente activación de la proteína Gq y PLC inducía una inhibición de la proliferación a través de un mecanismo mediado por la proteínas GTPasa Rac y la quinasa c-Jun-N-terminal

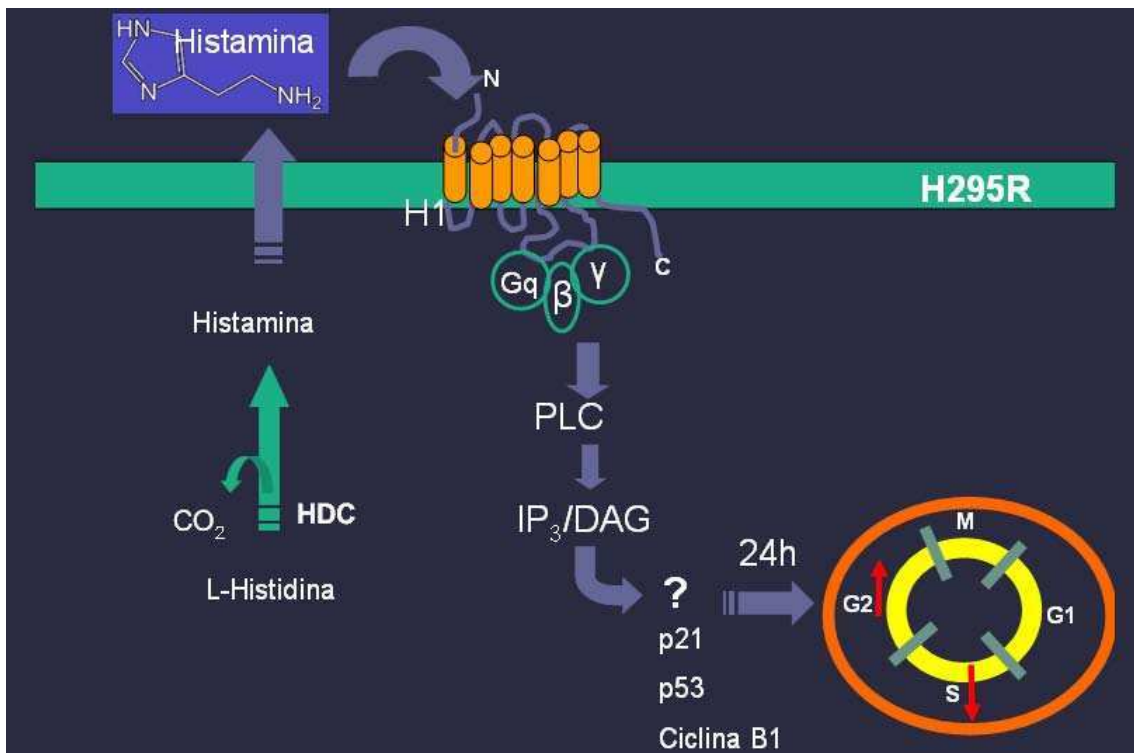
(JNK) (Notcovich y col, 2010). La proteína Rac, perteneciente a la familia de las GTPasas Rho, cuya activación depende de la unión a GTP, está involucrada en mecanismos de motilidad celular, progresión del ciclo y expresión de genes (Etienne-Manneville y Hall, 2002). La quinasa JNK, por su parte, es miembro del grupo de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y se caracteriza por responder a estresores ambientales (radiaciones, estrés osmótico, estrés oxidativo) y a citoquinas que afectan negativamente la proliferación celular (Woodgett y col, 1996).

Teniendo en cuenta los efectos de HA sobre las células H295R reportados en este trabajo y la participación del receptor H1 en dichos eventos, es probable que un mecanismo similar al descrito en las células CHO, en el que participen las proteínas Rac y JNK, esté regulando la proliferación en las células córticoadrenales humanas. Futuros análisis de la expresión de estas proteínas permitirán poner a prueba esta nueva hipótesis.

Por otra parte, el tratamiento con HA y FMPH por 24 horas produjo un arresto de las células H295R en la fase G2/M del ciclo celular. La transición entre las distintas fases del ciclo celular es un proceso temporalmente ordenado, que depende de la activación de proteínas específicas denominadas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (complejos ciclina/cdk) así como de su interacción con inhibidores de dichos complejos. Entre las proteínas responsables de controlar la entrada de G2 a mitosis se encuentran la proteína p53, las ciclinas B1 y cdc2, la proteína p21 y 27 (Smits y Medema, 2000).

Al igual que lo observado con HA, se ha reportado que el tratamiento conjunto con mitotane (un conocido agente adrenalítico) y radiaciones ionizantes induce un arresto en la fase G2/M del ciclo celular en las células H295R. Estos agentes actúan atenuando los mecanismos de reparación del ADN e interfieren con la activación de factores promotores de mitosis (MPF), manteniendo altos los niveles del complejo ciclina B1/cdc2, responsables del arresto en G2/M (Cerquetti y col, 2010). Es probable

que dichas ciclinas también contribuyan en alguna medida al arresto celular inducido por HA.



**Figura 22: Mecanismo de acción de HA sobre la proliferación de células corticoadrenales humanas H295R.** En forma autócrina y/o parácrina HA sería capaz de inhibir la proliferación de las células H295R. Para ello se uniría al receptor subtipo H1 presente en la membrana plasmática de células H295R, activando la vía de señalización mediada por la proteína Gq, la PLC y la generación de IP<sub>3</sub>/DAG como segundos mensajeros. Éstos a su vez, activarían efectores río abajo cuya identidad aún no ha sido determinada, y que serían responsables de inducir un arresto del ciclo celular en la fase G2/M.

En la actualidad, los tratamientos no quirúrgicos para los ACC se basan principalmente en terapias de radiación ionizante y en la administración de mitotane, una sustancia citotóxica que debe emplearse en dosis elevadas ya que posee una baja tasa de absorción (Maluf y col, 2011). En este trabajo se demostró que el tratamiento con HA y FMPH inhibió la proliferación celular sin inducir apoptosis,

conforme lo demostraron los ensayos para la detección de caspasa 3 y la técnica de Tunel. Esto sugiere que HA ejercería un efecto citostático sobre las células H295R, inhibiendo el crecimiento celular sin inducir la muerte. Esta característica sumada a la mayor sensibilidad de la fase G2/M frente a agentes que dañan el ADN, convertiría a la HA en un buen candidato para el desarrollo de terapias combinadas que permitan reducir la dosis de drogas citotóxicas o radiaciones, minimizando los efectos adversos del tratamiento, como se ha reportado en células de carcinoma de colon humano con el empleo combinado de loratadina y radiaciones ionizantes (Soule y col, 2010).

Más allá de los nuevos interrogantes planteados, en este trabajo se identificó un nuevo rol de HA en la modulación de la proliferación de células tumorales corticoadrenales humanas. Dado los escasos tratamientos médicos efectivos para los carcinomas corticoadrenales, sería interesante profundizar estos estudios que podrían contribuir a una mejor comprensión de la patología tumoral y al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

## **CAPÍTULO 3**

**EFFECTO DE LA HA SOBRE EL DESARROLLO DE CÉLULAS DE LEYDIG  
ADULTAS**

**1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Como se indicó en la Introducción, se sabe que dos generaciones de células de Leydig, una fetal y otra postnatal, pueblan el testículo. De ellas, la segunda generación es la que predomina en el adulto y son llamadas células de Leydig adultas (CLA). Se ha demostrado que los niveles testiculares de HA presentan variaciones a diferentes edades, siendo considerablemente mayores en ratas prepúberes, donde predominan formas inmaduras de células de Leydig, en forma simultánea con un mayor número de mastocitos intersticiales (Nistal y col, 1984; Zieher y col, 1971). Esto sugiere que en el testículo, HA podría estar ejerciendo también un efecto directo sobre las CL en su transición hacia la forma adulta. En base a esta hipótesis, los objetivos planteados en este capítulo fueron los siguientes:

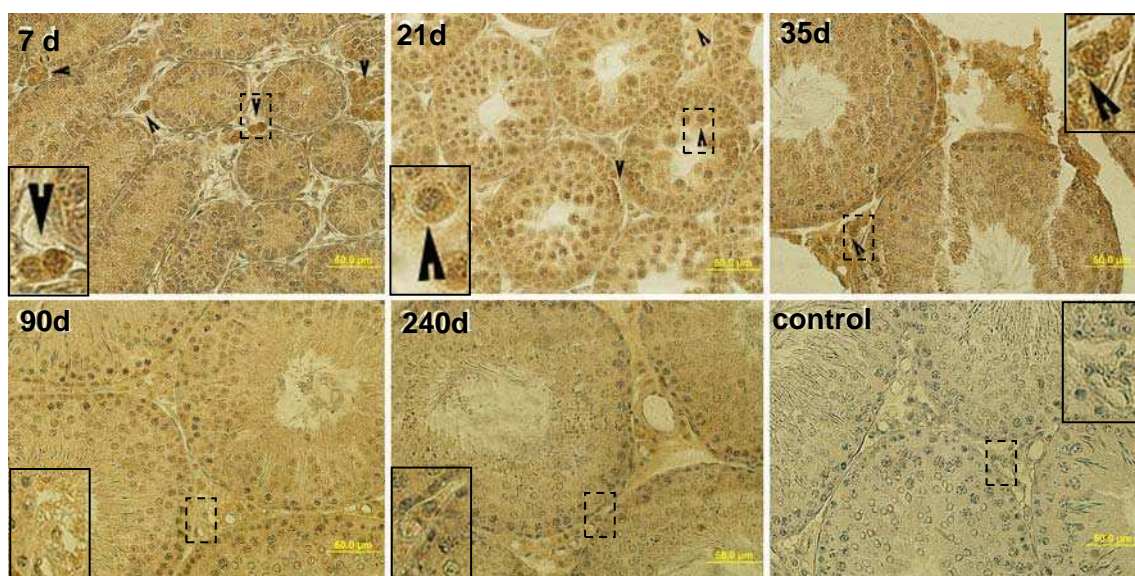
- Evaluar el contenido testicular de HA en los distintos estadios de diferenciación de las células de Leydig adultas (CLA).
- Evaluar la acción de HA sobre la proliferación de CL utilizando modelos *in vitro* (cultivo primario de células de Leydig purificadas) e *in vivo* (ratas adultas tratadas con EDS).



## 2. RESULTADOS

### 2.1. Evaluación del contenido testicular de HA en ratas de distintas edades

Se sacrificaron ratas macho de edades correspondientes a distintos estadios de desarrollo de las CLA (7, 15, 21, 35, 90 y 240 días). Los testículos fueron fijados y procesados en parafina para luego proceder a la marcación del contenido endógeno de HA utilizando un anticuerpo específico. Como se observa en la **Figura 23** la marcación para HA fue más intensa en los cortes de testículo de ratas de menor edad (7 días), localizándose en nidos celulares compactos del intersticio testicular que constituyen el remanente de células de Leydig fetales. Dicha marcación disminuyó en intensidad con el avance de la edad, hasta ser muy baja en las ratas adultas. A los 21 días, se observó marcación para HA no sólo en el intersticio sino también dentro de los túbulos seminíferos, en las células germinales.

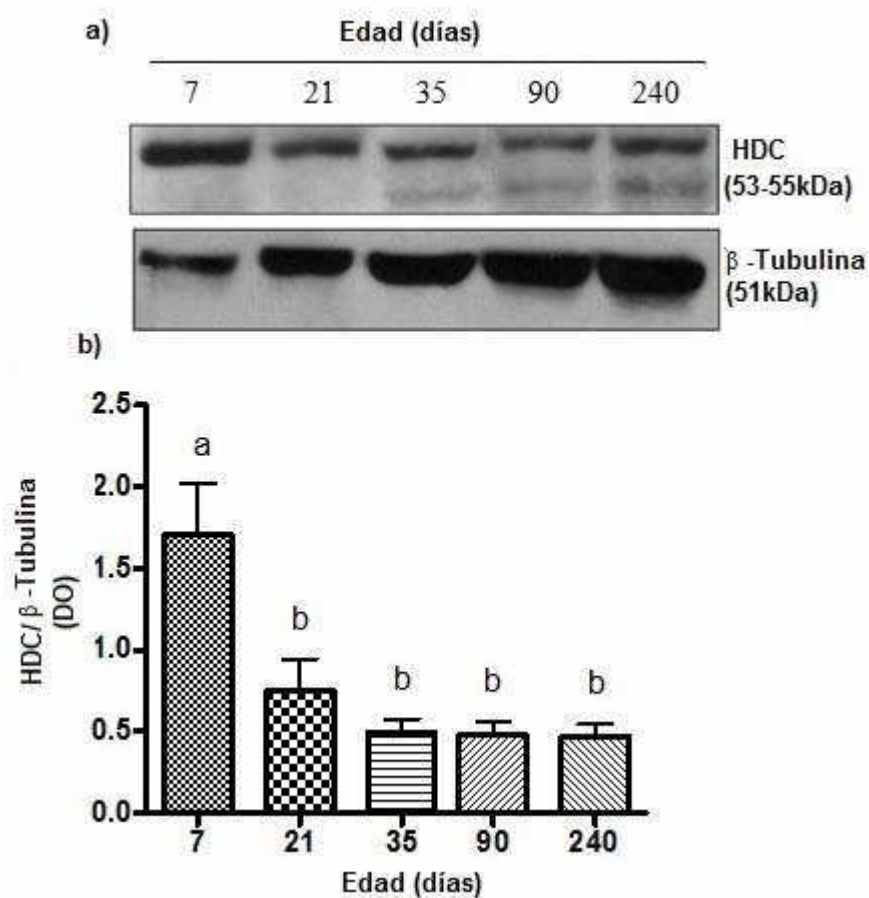


**Figura 23: Evaluación del contenido testicular de HA en ratas de distintas edades.** Se realizaron pruebas inmunohistoquímicas para HA en cortes de testículo de ratas de **a)** 7 días, **b)** 21 días, **c)** 35 días, **d)** 90 días y **e)** 240 días, previamente fijados y procesados en parafina. **f)** Control negativo sin anticuerpo primario. Las flechas indican células positivas para la marca

de HA. La barra representa 50  $\mu$ m. El recuadro interno en cada fotografía representa el área punteada con un aumento 3 X.

## 2.2. Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa (HDC) en testículos de ratas de distintas edades.

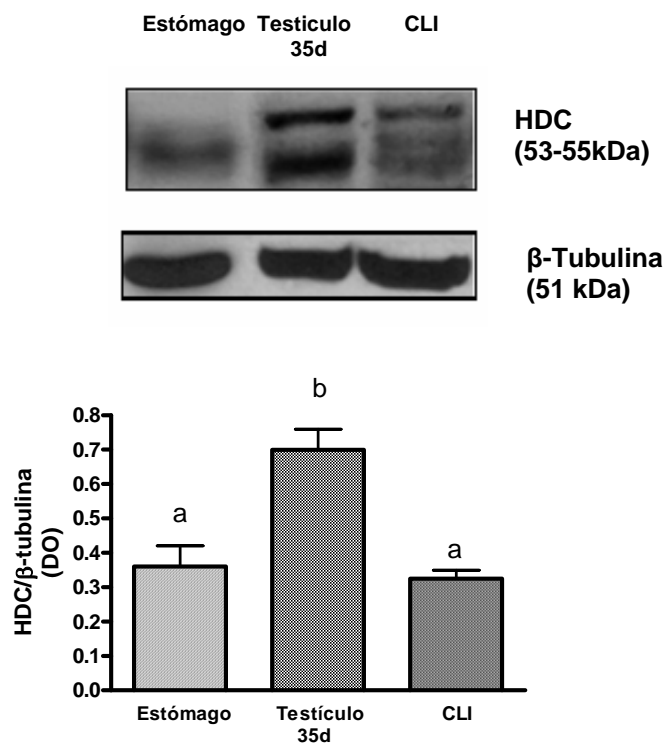
Utilizando extractos proteicos de testículo de ratas de distintas edades se realizaron ensayos de Western blot para la proteína HDC, única enzima responsable de la síntesis de HA. Los resultados revelaron la presencia de bandas en la región de los 53-55 kDa (correspondientes a la forma activa de HDC) en los extractos testiculares de todas las edades. El nivel de expresión fue significativamente mayor a los 7 días y disminuyó con la edad (en unidades arbitrarias de DO: 7 días =  $1,7 \pm 0,5$ ; 240 días =  $0,4 \pm 0,1$ ) (Figura 24).



**Figura 24: Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa en testículo de ratas de distintas edades.** Se emplearon extractos proteicos de testículo de ratas de 7, 21, 35, 90 y 240 días para detectar la presencia de la enzima HDC por medio de ensayos de Western blot. **a)** Inmunoblot de un experimento representativo. Se observan bandas en el rango de 53-55 kDa, coincidentes con la forma activa de HDC. **b)** Densitometría de las bandas para HDC. Los valores representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas a nivel de  $p < 0,01$ .

Para evaluar si la expresión de HDC testicular provenía de las células de Leydig presentes en el intersticio, se repitieron los ensayos de Western blot utilizando extractos proteicos de testículo total de 35 días, extractos de CLI (estadio representativo de los 35 días de edad) y extracto proteico de estómago de ratón, este último utilizado como control positivo ya que es sabido que las células enterocromafines del estómago producen la enzima HDC (Dimaline y col, 1999).

Como se puede observar en la **Figura 25** las CLI expresan la proteína HDC, aunque en menor proporción que lo hallado en el testículo total. Esto sugiere la presencia de otras células en el ambiente testicular capaces de sintetizar esta enzima.



**Figura 25: Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa en CLI.** Se emplearon extractos proteicos de testículo de ratas 35 días, de estómago de ratón y de CLI para detectar la presencia de la enzima HDC por medio de ensayos de Western blot. **a)** Inmunoblot de un experimento representativo. Se observan bandas en el rango de 53-55 kDa, coincidentes con la forma activa de HDC. **b)** Densitometría de las bandas para HDC. Los valores representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas a nivel de  $p < 0,01$ .

### **2.3. Estudio del efecto de HA sobre el desarrollo de CLA utilizando un modelo de ratas adultas tratadas con etano-dimetano sulfonato (EDS).**

El desarrollo de las CLA es un proceso dinámico y complejo regulado por diversos factores, que actuando en forma autócrina o parácrina coordinan la transición entre los distintos estadios.

Como primera aproximación al estudio *in vivo* del rol de la HA en el desarrollo de CL se planteó el uso de un modelo de ratas adultas tratadas con etano-dimetano sulfonato (EDS). Una única dosis intraperitoneal de EDS (75 mg/kg de peso corporal) produce la apoptosis específica de la población adulta de células de Leydig. Posteriormente, dicha población se regenera a través de un proceso que reproduce los distintos estadios de un testículo normal en desarrollo (Teerds y Rijntjes, 2007). Este proceso de regeneración de CLA se inicia al cuarto día post-EDS, a partir de los estadios más indiferenciados (células de tipo mesenquimáticas) recuperándose la población original a los 55 días posteriores.

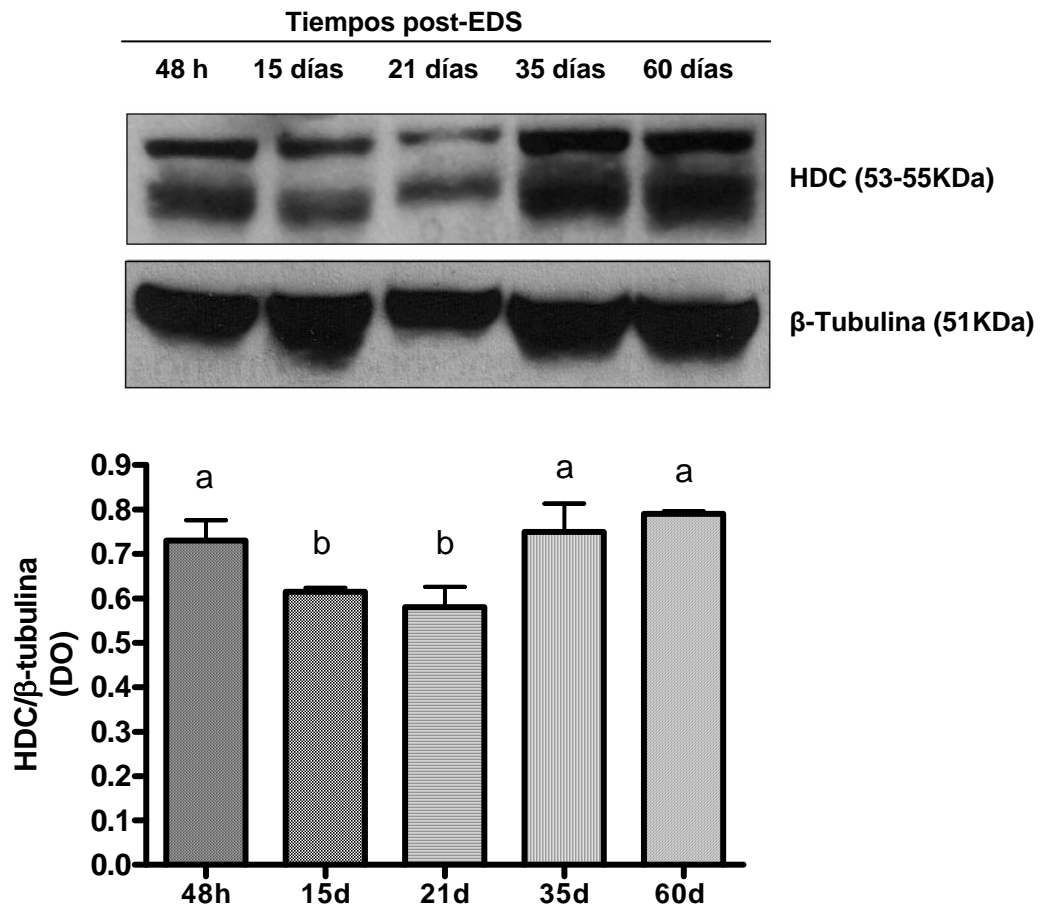
Cabe agregar que el EDS es un compuesto no comercial, utilizado y validado por varios grupos de investigación (Gaytan y col, 1994; Sriraman y col, 2003; Teerds y Rijntjes, 2007). Para llevar a cabo los experimentos de este trabajo de Tesis, el EDS fue sintetizado por nuestro laboratorio con la colaboración y el asesoramiento de los

Dres Juan Bautista Rodríguez y Sergio M. Szajnman (Depto de Química Orgánica-FCEN-UBA) según lo especificado en Materiales y Métodos.

### **2.3.1. Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa (HDC) a distintos tiempos post EDS.**

Como la regeneración de CL que sigue al tratamiento con EDS reproduce lo acontecido en un testículo normal en desarrollo, se evaluó la expresión de HDC a distintos tiempos post-EDS para compararla con lo observado en los testículos de ratas de distintas edades.

Los animales recibieron una única inyección intraperitoneal de EDS (75 mg/kg peso corporal) y se sacrificaron a las 48 horas y 15, 21, 35 y 60 días post-EDS, tiempos equivalentes a los característicos para cada estadio de desarrollo de CL en una rata normal. Los testículos fueron procesados para Western blot de la enzima HDC. Los resultados revelaron la presencia de bandas en la región de los 53-55 kDa en todos los tiempos evaluados (**Figura 26**). La densitometría de las bandas mostró que la expresión de esta proteína fue mayor en los extractos de 48 horas ( $0,73 \pm 0,04$  DO) y 35 y 60 días post-EDS ( $0,75 \pm 0,06$  DO y  $0,79 \pm 0,01$ , respectivamente), mientras que los niveles resultaron significativamente más bajos a los 15 y 21 días post-EDS ( $0,61 \pm 0,01$  DO y  $0,57 \pm 0,01$  DO, respectivamente). El patrón de expresión hallado no coincidió con el observado en las ratas normales sacrificadas a distintas edades, en el cual se observó una disminución de la expresión de HDC a edades más avanzadas (ver sección **2.2.** en este capítulo).



**Figura 26: Expresión de la enzima Histidina Decarboxilasa a distintos tiempos post EDS.**

Se emplearon extractos de testículo de ratas sacrificadas a distintos tiempos post-EDS para detectar la presencia de la enzima HDC por medio de ensayos de Western blot. **a)** Inmunoblot de un experimento representativo. Se observan bandas correspondientes a HDC en el rango de 53-55 kDa. **b)** Densitometría. Los valores representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas a nivel de  $p < 0,05$ .

### 2.3.2. Estudio *in vivo* del efecto de HA sobre el número de CLA

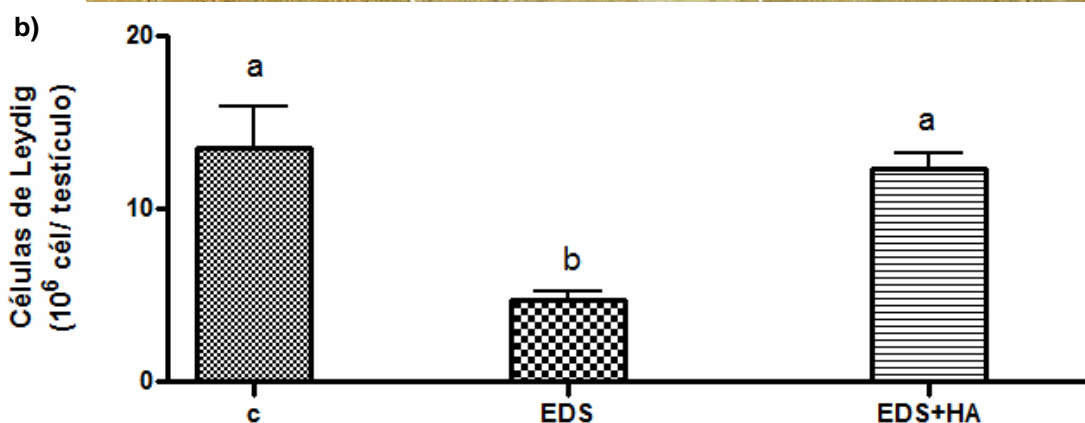
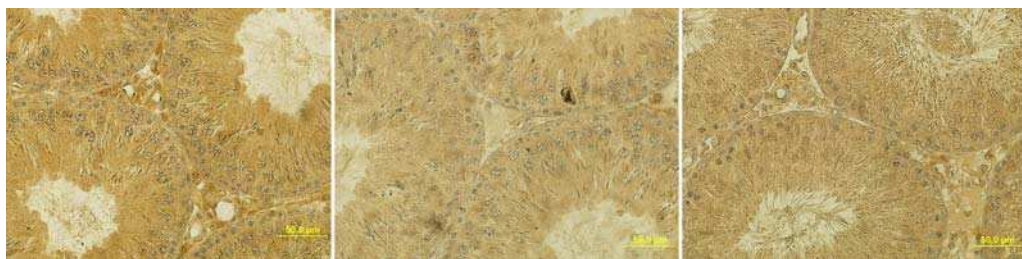
Los animales se sometieron al protocolo de trabajo previamente descrito en Materiales y Métodos (ver sección 2.13.1.). Brevemente, luego de una inyección intraperitoneal de EDS/vehículo entre los días 29-31 los animales recibieron una

inyección diaria intratesticular de HA (10 µg/g testículo) y se sacrificaron al día 32 post-EDS. Los testículos fueron fijados, procesados y preparados para inmunohistoquímica de la enzima P450scc (responsable del primer paso enzimático en la síntesis de esteroides), utilizada como marcador específico para células de Leydig, dado que son el único tipo celular presente en el testículo con capacidad esteroidogénica.

El recuento de CL se realizó en función de la marcación positiva para P450scc y la morfología nuclear ovoide, característica de CL. El número de CL por testículo se calculó en función de la fórmula de Floderus según lo indicado en Materiales y Métodos.

En la **Figura 27** se observan los resultados del recuento de células de Leydig. Los animales tratados con EDS que recibieron inyecciones intratesticulares de HA presentaron un número de células de Leydig significativamente mayor que los que sólo recibieron EDS (en  $10^6$  células de Leydig/ testículo: C =  $13,5 \pm 2,4$ ; EDS =  $4,7 \pm 0,5$ ; EDS+HA =  $12,3 \pm 0,9$ ).

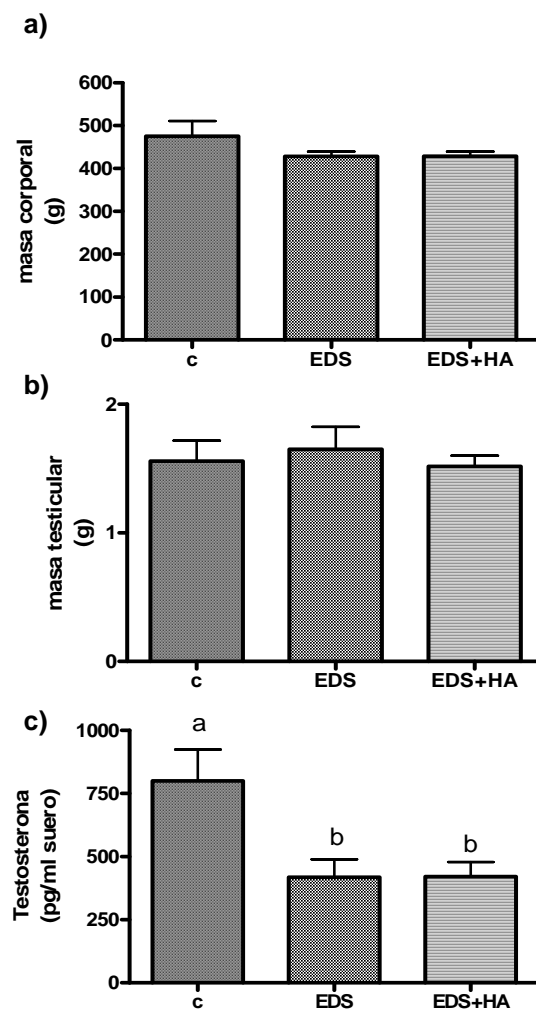
a)



**Figura 27: Recuento de células de Leydig en ensayos *in vivo* con HA.** a) Cortes transversales de testículos de ratas tratadas con vehículo (control), EDS o EDS + HA, de

acuerdo a lo especificado en Materiales y Métodos. Las células de Leydig se reconocieron por la marcación específica para P450sc $\alpha$  por inmunohistoquímica, acompañado de la morfología nuclear. **b)** Recuento de células de Leydig. Los valores representan la media  $\pm$  ES de 6 a 8 animales por tratamiento. Diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas a nivel de  $p < 0,05$ .

En cuanto al peso testicular y corporal no hubo diferencias entre los tratados con EDS y los controles. Los niveles de testosterona plasmática, en cambio, resultaron más bajos en los grupos que recibieron EDS independientemente del tratamiento con HA, en comparación con el control (en pg testosterona/ml suero: C =  $800,7 \pm 123,6$ ; EDS =  $418 \pm 70,6$ ; EDS+HA =  $420 \pm 57,4$ ) (**Figura 28**).





**Figura 28: Evaluación de otros parámetros testiculares en los ensayos *in vivo* con HA.**

Los parámetros **a)** masa corporal, **b)** masa testicular, **c)** niveles de testosterona sérica fueron medidos en ratas tratadas con vehículo (control), EDS y EDS+HA, de acuerdo al protocolo ya descripto. Sólo se hallaron diferencias significativas en los niveles de testosterona sérica entre control y tratados con EDS. Los valores representan la media  $\pm$  ES de 8 animales por tratamiento. Diferentes letras sobre las barras representan diferencias significativas a nivel de  $p < 0,05$ .

**2.4. Estudio del efecto directo de HA sobre la proliferación de células de Leydig**

Se ha demostrado que distintos tipos celulares presentes en el testículo expresan uno o más subtipos de receptores para HA y son capaces de responder a ella (Albrecht y col 2005), dificultando el estudio *in vivo* de la acción directa de HA sobre un tipo celular en particular.

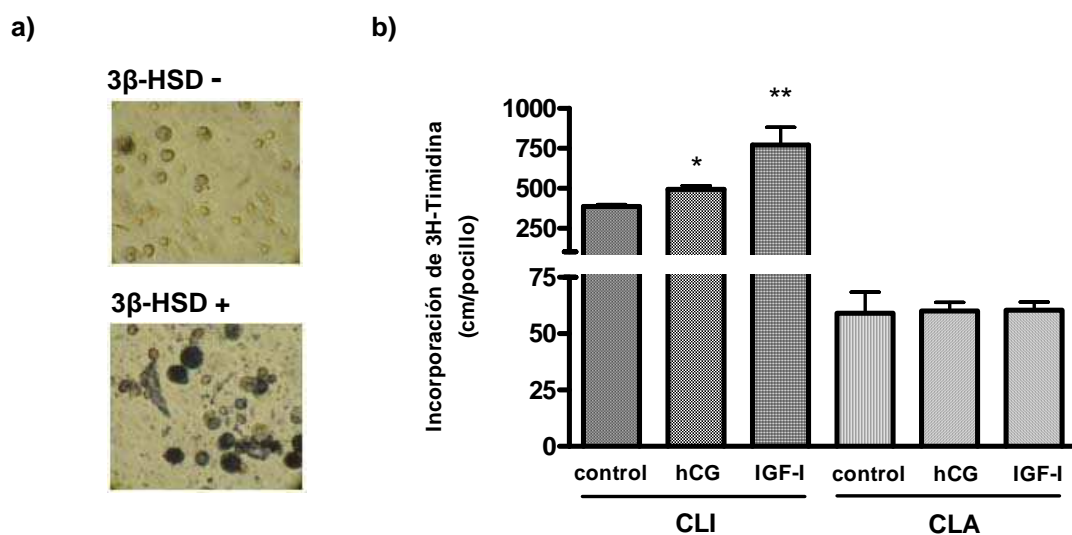
Es por ello que para evaluar un posible efecto directo de HA sobre las células de Leydig se realizaron ensayos *in vitro*, empleando cultivos primarios de células de Leydig purificadas a partir de testículos de rata. El grado de pureza de la preparación se evaluó con la reacción específica para la enzima  $3\beta$ -HSD, siendo el porcentaje de pureza obtenido en todos los ensayos alrededor del 91 % (**Figura 29 a**).

Dado que se ha reportado que las CLA poseen una tasa muy baja o nula de proliferación (Benton y col, 1995), para los ensayos de incorporación de [3H]-Timidina se utilizaron células de Leydig inmaduras (CLI), que aún mantienen su capacidad proliferativa y que fueron obtenidas a partir de testículos de ratas de 30-35 días de edad.

A modo comparativo y para confirmar los reportes previos, se realizaron ensayos de incorporación de [3H]-Timidina tanto en CLA (obtenidas a partir de ratas de 90 días) como en CLI purificadas en presencia de dos conocidos inductores de la proliferación de células de Leydig: hCG e IGF-1.

Como se muestra en la **Figura 29 b**, la capacidad proliferativa basal de las CLA fue baja comparada con las CLI y no se observó un incremento significativo de la incorporación de [3H]-Timidina en presencia de hCG o IGF-1, confirmando reportes previos de otros autores.

En lo que respecta a las CLI, tanto hCG como IGF-1 indujeron un incremento significativo en la proliferación. En particular IGF-1 produjo un aumento de alrededor de dos veces el nivel proliferativo basal (en cpm/pocillo: control =  $414,7 \pm 22,3$ ; hCG 100 ng/ml =  $493,3 \pm 20,1$ ; IGF-1 100ng/ml =  $732,6 \pm 86,2$ ).

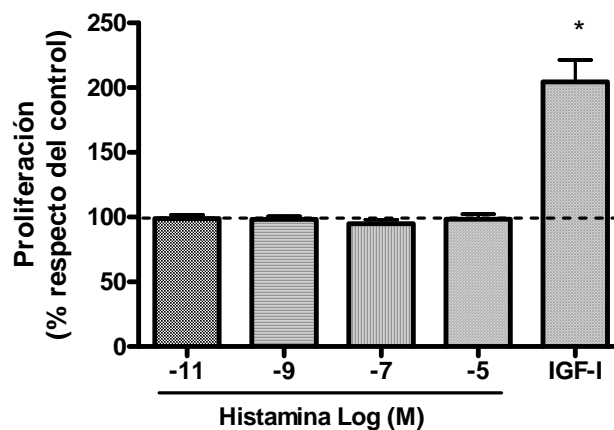


**Figura 29: Evaluación de la capacidad proliferativa de células de Leydig adultas (CLA) e inmaduras (CLI).** a) Identificación de CL por reacción de tinción para la enzima 3 $\beta$ -HSD. La pureza de las CL aisladas se calculó en un 91 % (aumento 400 X). b) Ensayos de incorporación de [3H]-Timidina a partir de CL aisladas de ratas de 30-35 días (CLI) y 90 días (CLA). Luego de 24 horas de incubación en presencia de hCG e IGF-1 las células fueron filtradas y la radiactividad incorporada fue cuantificada. Los valores representan la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 12 réplicas por tratamiento. Los símbolos \* y \*\* representan diferencias significativas respecto del correspondiente control a nivel de  $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ , respectivamente.

### 2.4.1. Evaluación del efecto directo de HA sobre la proliferación de células de Leydig inmaduras.

Para evaluar un posible efecto directo de la HA sobre el desarrollo de CL, se realizaron ensayos de incorporación de [3H]-Timidina en CLI purificadas. Las células fueron sembradas e incubadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de HA ( $10^{-11}$  M a  $10^{-5}$  M), utilizándose como control positivo IGF-1 (100ng/ml).

Los resultados muestran que la capacidad proliferativa de las CLI no se vió afectada por el tratamiento con HA, en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 30).

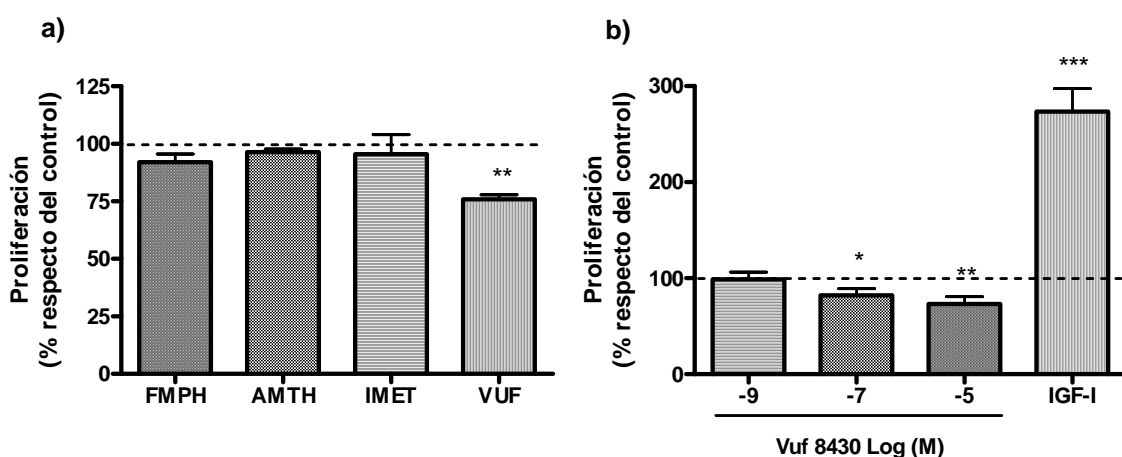


**Figura 30: Efecto de la HA sobre la proliferación de Células de Leydig Inmaduras.** CLI purificadas a partir de testículos de ratas de 35 días fueron utilizadas en ensayos de incorporación de [3H]-Timidina a 24 horas en presencia de concentraciones crecientes de HA. IGF-I (100 ng/ml) fue utilizado como control positivo de la técnica. Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes respecto del control de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 12 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100 % del control (sin tratamiento). El símbolo \* sobre la barra representa diferencias respecto del control con un nivel de significación de  $p < 0,001$

#### 2.4.2. Efecto de los agonistas específicos para cada subtipo de receptor de HA sobre la proliferación de células de Leydig inmaduras

Como ya se mencionó antes, hasta el momento se han descrito cuatro subtipos de receptores para HA, cada uno de ellos asociado a una vía de transducción diferente. A su vez, una misma célula puede expresar más de un subtipo de receptor por lo que la activación conjunta de los mismos podría redundar en acciones opuestas. A fin de poner en evidencia posibles efectos que pudiesen haber sido enmascarados en las CLI por la activación conjunta de los distintos receptores para HA se repitieron los ensayos de incorporación de [3H]-Timidina en presencia de concentraciones máximas no tóxicas ( $10^{-5}$  M) de agonistas específicos para cada subtipo de receptor. El 2-[(3-trifluorometil)fenil] histamina (FMPH) se empleó como agonista H1, la amtamina (AMTH) como agonista H2, el imetit (IMET) como agonista H3 y el Vuf 8430 (VUF) como agonista H4.

Como se observa en la **Figura 31**, el tratamiento con el agonista H4 Vuf 8430 redujo significativamente la proliferación de las CLI. Experimentos posteriores utilizando distintas concentraciones de este agonista mostraron que el efecto inhibitorio sobre la proliferación de CLI es dependiente de la concentración y alcanza su máximo efecto a concentraciones de  $10^{-5}$  M.

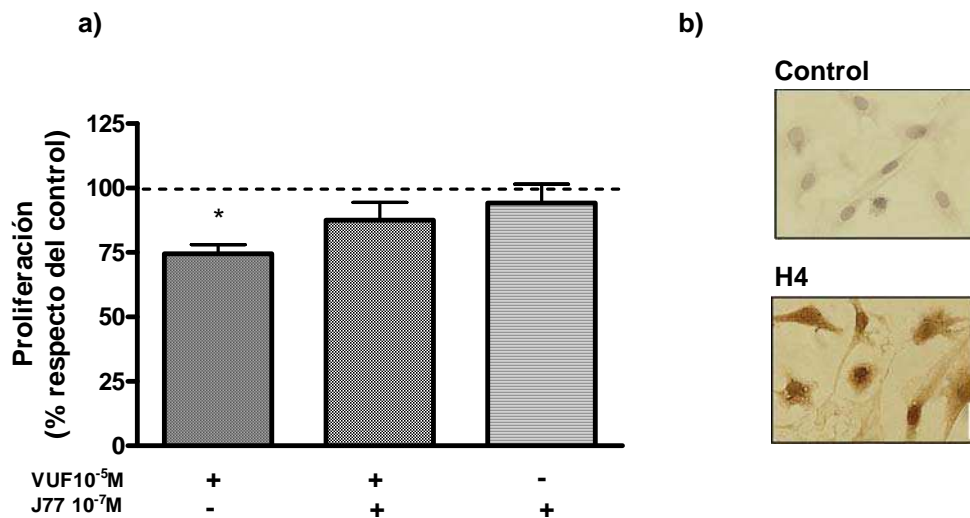


**Figura 31: Efecto de los agonistas específicos para cada subtipo de receptor de HA sobre la proliferación de células de Leydig inmaduras.** CLI purificadas a partir de testículos de ratas de 30-35 días fueron utilizadas en ensayos de incorporación de [3H]-Timidina a 24 horas **a)** en presencia de agonistas específicos para cada subtipo de receptor de HA: FMPH (H1), AMTH (H2), IMET (H3) y VUF (H4), todos usados en una concentración  $10^{-5}$  M. **b)** en presencia de concentraciones crecientes del agonista H4 (VUF). Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes respecto del control de al menos tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 12 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100 % del control (sin tratamiento). Los símbolos sobre las barras representan diferencias respecto del control con un nivel de significación de \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$  y \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Para confirmar la participación del receptor H4 en el efecto inhibitorio sobre la proliferación de las CLI, se realizaron ensayos de proliferación utilizando el antagonista específico H4, JNJ-7777120 (J77). Las células fueron sembradas y al día siguiente preincubadas durante 30 minutos con el antagonista específico H4 en una concentración final de  $10^{-7}$  M. Transcurridos los 30 minutos se le agregó al medio el agonista H4, Vuf 8430 (VUF), en la concentración que producía un efecto inhibitorio máximo ( $10^{-5}$  M) y la incubación continuó hasta finalizar las 24 horas.

Los resultados de la **Figura 32 a** indican que la presencia del antagonista J77 revirtió la inhibición de la proliferación observada con el agonista específico H4, sin afectar por sí mismo la proliferación (en cpm/pocillo: control =  $485 \pm 20$ ; VUF =  $352 \pm 10$ ; VUF + J77 =  $420 \pm 24$ ; J77 =  $463 \pm 26$ ).

Para evaluar la presencia del receptor H4 en CLI se llevó a cabo una inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo primario específico anti-H4. Como se observa en la **Figura 32 b** dicho receptor está presente en las células de Leydig en el estadio de desarrollo estudiado.

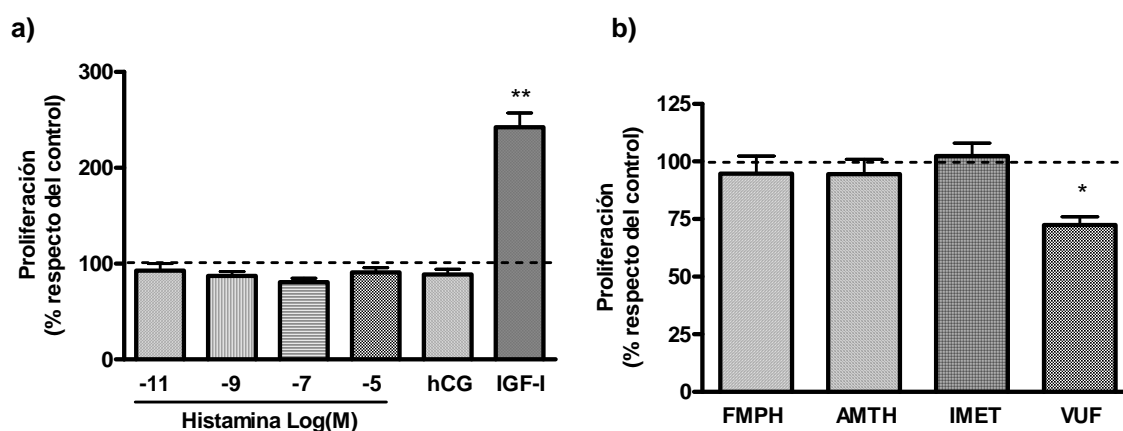


**Figura 32: Efectos del antagonista específico H4 (JNJ-7777120) sobre la inhibición de la proliferación mediada por HA en CLI.** **a)** CLI purificadas a partir de testículos de ratas de 30-35 días fueron utilizadas para ensayos de incorporación de [3H]-Timidina a 24 horas. Fueron preincubadas 30 minutos con el antagonista específico H4 JNJ-7777120 (J77) en una concentración  $10^{-7}$  M. Luego se agregó el agonista H4 Vuf 8430 (VUF) en una concentración  $10^{-5}$  M. Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes respecto del control de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 12 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100% del control (sin tratamientos). Los símbolos sobre las barras representan diferencias respecto del control con un nivel de significación de \* =  $p < 0,01$ . **b)** Inmunocitoquímica para el receptor H4 en CLI. Se empleó un anticuerpo primario específico para el receptor H4 y se reveló con un anticuerpo secundario biotinilado utilizando DAB como cromógeno. La barra representa 25  $\mu$ m.

#### 2.4.3. Efecto de HA y de agonistas específicos sobre la proliferación de células de Leydig progenitoras

Si bien las células de Leydig inmaduras pueden proliferar, su tasa de división es relativamente baja comparada con estadios de desarrollo más tempranos, estimándose en 1 único evento de duplicación (Benton y col, 1995). Como

consecuencia de ello, es posible que su respuesta a factores moduladores de la proliferación, en nuestro caso a HA, pudiera ser subestimada. Para evaluar los efectos de HA y sus agonistas en un estadio de desarrollo con mayor actividad mitótica, se realizaron cultivos primarios de células de Leydig progenitoras, utilizando ratas de 18 a 20 días de edad. Las células fueron sembradas e incubadas con concentraciones crecientes de HA y los agonistas para los receptores H1, H2, H3 y H4 antes mencionados, todos ellos utilizados en una concentración  $10^{-5}$  M.



**Figura 33: Efecto de la HA y de agonistas específicos sobre la proliferación de células de Leydig progenitoras.** CLP purificadas a partir de testículos de ratas de 18-20 días fueron incubadas durante 24 horas en ensayos de incorporación de  $[3H]$ -Timidina con **a)** concentraciones crecientes de HA; **b)** agonistas específicos para cada receptor de HA: FMPH (H1), AMTH (H2), IMET (H3) y VUF (H4), todos usados en una concentración  $10^{-5}$  M. Los valores representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes respecto del control de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado con 12 réplicas por tratamiento. La línea punteada representa el 100% del control (sin tratamiento). Los símbolos sobre las barras representan diferencias respecto del control con un nivel de significación de \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$ .

Como se observa en la **Figura 33**, la respuesta de las CLP a los tratamientos antes mencionados fue similar a la observada para las CLI. La capacidad proliferativa de las CLP no se vio afectada por la presencia de HA, en ninguna de las concentraciones evaluadas y sólo el agonista H4 Vuf 8430 redujo significativamente su

proliferación a un porcentaje similar al reportado para las CLI (en cpm/pocillo:  $C = 343 \pm 3$ ;  $VUF = 248 \pm 12$ ).



### **3. DISCUSIÓN**

Como se mencionó previamente, las células de Leydig adultas (CLA) originadas postnatalmente deben atravesar tres estadios diferentes antes de alcanzar su completa madurez: células de Leydig progenitoras, inmaduras y adultas (Benton y col, 1995). La transición entre estos estados involucra procesos de diferenciación y proliferación finamente regulados por diversos factores presentes en el ambiente testicular, entre ellos, LH, IGF-1, TGF- $\alpha$  y  $\beta$  (Hu y col, 2010; Wu y col, 2007).

En este trabajo se mostró que en ratas Sprague Dawley, tanto el contenido testicular de HA como la expresión de la enzima HDC, varían a lo largo del desarrollo de las CLA, siendo más altos en los primeros estadios. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por Zieher y colaboradores (1974) y sugieren la participación de HA en el desarrollo de las células de Leydig. De particular interés, en los cortes de 7 días se observó una marcación intensa para HA en nidos celulares correspondientes a células de Leydig fetales remanentes. Hasta el momento no se conocen estudios sobre el posible efecto directo de HA en células de Leydig fetales, sin embargo, trabajos llevados a cabo en ratones HDC-/- describieron alteraciones en el tamaño testicular y en la síntesis de esteroides sexuales independientes del eje hipofisario-gonadal, que sugieren un origen durante la embriogénesis, subrayando la importancia de la HA periférica como regulador del desarrollo gonadal (Mondillo y col, 2007; Pap y col, 2002)

Un resultado llamativo fue el obtenido en cuanto a la expresión de HDC en extractos de testículo de ratas tratadas con EDS a distintos tiempos. Si bien se esperaba que los niveles de HDC reprodujeran los hallados durante el desarrollo post-natal en ratas normales, el patrón fue diferente. Los niveles de HDC disminuyeron significativamente entre la segunda y la tercera semana post-EDS, para recuperar los valores iniciales posteriormente. Esta dinámica temporal coincide con el destino de la espermatogénesis luego del tratamiento con EDS. La disminución de los niveles de testosterona provocada

por la ausencia de CLA, produce la desaparición de espermátidas y espermatoцитos que es máxima el día 14 post-EDS y comienzan a recuperarse a partir del día 21, conforme se regenera la nueva población de células de Leydig adultas y los niveles de testosterona retornan a valores normales (Bakalska y col, 2001).

Esto sugiere que un porcentaje mayoritario del contenido de HDC testicular provendría de las células germinales presentes en los túbulos seminíferos. Estos resultados concuerdan con los de Safina y colaboradores (2002), quienes reportaron la presencia de la enzima HDC en el acrosoma de espermátidas y espermatozoides de ratón.

Los mastocitos testiculares, localizados en la túnica albugínea en las ratas (Gaytan y col, 1990) y en el intersticio testicular en los humanos (Albretch y col, 2005), constituyen otra fuente importante de HA y varios estudios proponen su participación en el desarrollo de células de Leydig. Al respecto, Gaytan y colaboradores (1992) reportaron proliferación y diferenciación simultánea de precursores de mastocitos y precursores de células de Leydig en el intersticio testicular de rata. Asimismo, se ha descrito un incremento progresivo en el número de mastocitos testiculares durante la etapa peripuberal en mono, hámster y humano (Frungeri y col, 1999; 2000). Estas evidencias que sugieren la influencia de los mastocitos en el desarrollo de CL, apoyarían la hipótesis de HA como uno de los mediadores químicos responsable de dicho evento.

Por otra parte, la detección de la proteína HDC en extractos de células de Leydig inmaduras demostró que estas células son capaces de sintetizar HA, sugiriendo que dicha amina biógena podría actuar autócrinamente, como se ha descrito en otros sistemas (Davenas y col, 2008; Kidd y col, 1996; Rivera y col, 2000).

Los ensayos *in vivo* llevados a cabo en este trabajo demostraron que la administración intratesticular de HA a ratas tratadas con EDS, produjo un incremento significativo en el número de células de Leydig con morfología madura. Sin embargo los niveles de testosterona plasmática no se vieron modificados. Esto podría deberse al

efecto inhibitorio que las concentraciones de HA empleadas ejercen sobre la síntesis de esteroides, como se demostró previamente en nuestro laboratorio (Mondillo y col, 2009). De todas maneras, no se puede descartar que existan diferencias en la producción de otros intermediarios esteroideos, más aún considerando que al momento de la evaluación (32 días post-EDS, estadio inmaduro) la producción de testosterona aún es baja (Benton y col, 1995).

Por otra parte, en los cultivos de células de Leydig purificadas, el uso de agonistas específicos para cada subtipo de receptor reveló un claro efecto inhibitorio mediado por el receptor H4 sobre la proliferación en los estadios de células inmaduras y progenitoras.

Si bien estos resultados podrían parecer en un principio contradictorios, existe una explicación conciliatoria que sugiere que el incremento en el número de CL observado en los animales tratados con HA sería consecuencia de una aceleración del proceso madurativo de células de Leydig más indiferenciadas (progenitoras) aún presentes en el intersticio testicular y no necesariamente a un aumento en la proliferación de CLI.

De esta forma, la inhibición de la proliferación observada con el agonista H4 prepararía a las células de Leydig para responder a otros factores testiculares responsables de inducir su diferenciación a estadios más avanzados. El empleo de técnicas para la detección *in vivo* de células proliferantes, como la administración del compuesto Brdu y su posterior inmunodetección, sería una herramienta apropiada para complementar estos estudios. Sin embargo, más allá de sus limitaciones, los resultados expuestos apoyan la hipótesis de un rol de HA en el proceso de desarrollo de células de Leydig adultas.

Una función similar se ha descripto para los andrógenos. Estudios *in vitro* han confirmado que la presencia conjunta de andrógenos y LH es necesaria para promover la transición de células de Leydig progenitoras a inmaduras (Hardy y col, 1990). Una de las hipótesis propuestas para explicar su mecanismo de acción, supone que los andrógenos regularían

negativamente la proliferación de células progenitoras, mientras que LH induciría la diferenciación a formas inmaduras y mantendría el estado diferenciado (Benton y col, 1995).

A su vez, esta hipótesis también daría sustento a un efecto indirecto de HA sobre el desarrollo de CL. Altos niveles de HA podrían estar inhibiendo la síntesis de esteroides, manteniendo bajos los niveles de andrógenos, lo que induciría un arresto celular y daría paso al proceso de diferenciación. Por el contrario, los bajos niveles de HA y HDC hallados en ratas maduras, serían consistentes con la culminación del proceso de desarrollo y los altos niveles de testosterona producidos por las células de Leydig adultas.

Otro factor clave en el desarrollo de células de Leydig es el factor de crecimiento similar-insulina 1 (IGF-1), involucrado en la transición de células de Leydig inmaduras a maduras (Huy col, 2010). Se ha descrito que HA es capaz de modular los niveles plasmáticos de IGF-1 en ratas (Liao y col, 1999) y aumentar los niveles de ARNm de IGF-1 e IGF-2 en gliomas humanos (Van der Ven y col, 1997) promoviendo el crecimiento tumoral. Un efecto similar sobre la expresión de IGF-1 en el testículo en desarrollo podría explicar el aumento en el número de células de Leydig inducido por el tratamiento con HA.

Una explicación alternativa que contempla las diferencias observadas en los tratamientos *in vivo* vs *in vitro* supone que *in vivo*, uno o más factores intratesticulares podrían estar modulando la expresión de los subtipos de receptores histaminérgicos en las células de Leydig, determinando el efecto final de HA sobre estas células. Al respecto, se ha reportado en ratones que la estimulación de células de Leydig con hCG induce un incremento en el nivel de ARNm para los receptores H1 y H2 (Mondillo y col, 2007).

En cuanto a la acción directa de la amina sobre la proliferación de células de Leydig, el tratamiento con HA no produjo modificaciones significativas mientras que el agonista H4 indujo una clara inhibición. Como se ha demostrado en otros sistemas, e incluso en

las propias células de Leydig con los receptores H1 y H2, una misma célula puede expresar más de un subtipo de receptor. En algunos casos la activación conjunta de dichos receptores puede conducir a vías antagónicas (Hill y col, 1991), entrecruzamientos de señales (Davio y col, 1995; Fitzsimonsy col, 1997) e internalización de receptores (Horio y col, 1990; Smit y col, 1995) enmascarando efectos individuales. Considerando la presencia de varios subtipos de receptores en las CLI, HA podría haber desencadenado fenómenos similares, enmascarando la acción inhibitoria del receptor H4 sobre la proliferación, revelada con el uso del agonista específico VUF8430.

Como se mencionó en la introducción, el receptor subtipo H4 fue el último de los receptores para HA en ser descrito; desde entonces, los estudios llevados a cabo han localizado su expresión principalmente en células de la médula ósea y, por lo tanto, se sugiere que sus funciones estarían asociadas a la respuesta inmune (Zampeli y Tiligada, 2009). En lo que respecta al testículo, en el trabajo original en el que se describió por primera vez este receptor, los autores reportaron la presencia de ARNm para el receptor H4 en testículo de rata (Nguyen y col, 2001). Este trabajo de Tesis permitió complementar y profundizar dicha observación a través de ensayos funcionales y de inmunocitoquímica, que demostraron por primera vez la presencia funcional del receptor H4 en células de Leydig inmaduras de rata. La participación del receptor H4 en la inhibición de la proliferación de células de Leydig inmaduras fue confirmada con el empleo del antagonista específico JNJ7777120 que en presencia de Vuf 8430 fue capaz de revertir el efecto. En células progenitoras hematopoyéticas la activación del receptor H4 inhibe la proliferación inducida por factores de crecimiento promoviendo un arresto celular en la fase G0/G1, a través de un mecanismo de señalización que involucra una proteína Gi/o y la disminución de los niveles de AMPc (Petit Bertron y col, 2009). Un mecanismo similar podría tener lugar en las células de Leydig progenitoras e inmaduras, a través del cual el receptor H4 promovería un arresto celular temporal que permitiría la acción de factores inductores de la diferenciación.

El testículo se caracteriza por poseer un ambiente inmunológico privilegiado que posibilita el desarrollo de células germinales después del establecimiento de la tolerancia inmunológica propia del organismo (Fijak y Meinhardt, 2006). La perturbación de este ambiente privilegiado por procesos inflamatorios y/o autoinmunes afecta seriamente la fertilidad humana (Schuppe y Meinhardt, 2005; Tung y Teuscher, 1995). En particular, existen evidencias que sugieren un rol fundamental de los mastocitos en la génesis de diversos tipos de infertilidad masculina (Haidl y col, 2011; Nagai y col, 1992; Roaiah y col, 2007). Estos datos sumados a la participación del receptor H4 en procesos inmunológicos e inflamatorios (Zampeli y Tiligada, 2009), a la existencia de este receptor en los propios mastocitos y otras células del sistema inmune (Gibbs y Levi-Schaffer, 2012), y en particular, a los resultados presentados en esta Tesis que incluyen la presencia del receptor H4 en CL y la respuesta antiproliferativa frente a su agonista específico, sugieren una posible participación de dicho receptor en patologías reproductivas de origen inmune o inflamatorio y resaltan la necesidad de continuar los estudios en esa dirección.

**CONCLUSIONES  
GENERALES**

Sobre la base de los resultados obtenidos se puede concluir que:

**En las células córticoadrenales Y1 y H295R:**

- La esteroidogénesis no se vió modificada por HA, lo que supone que el efecto modulador reportado en CL no sería extrapolable a todos los sistemas esteroidogénicos.
- La respuesta proliferativa de las células al tratamiento con HA difirió entre las líneas celulares. Estas diferencias podrían ser consecuencia del distinto contenido de HA y HDC presente en cada tipo celular.
- En las células H295R el tratamiento con HA inhibió la proliferación a 24h, provocando un arresto de las células en la fase G2/M. Este mecanismo involucraría la activación del receptor H1 y la formación de IP3 y DAG como segundos mensajeros.

Se identificó un nuevo rol de HA sobre la modulación de la proliferación de células tumorales córticoadrenales humanas que podría contribuir a una mejor comprensión de la patología tumoral y al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

**En el desarrollo de células de Leydig:**

- Se detectó HA en el testículo de ratas Sprague Dawley a diferentes edades, al igual que la enzima responsable de su síntesis, la proteína HDC. Ambas presentaron niveles más altos en etapas tempranas del desarrollo de CLA, sugiriendo que concentraciones elevadas de HA tendrían una función fisiológica en el testículo inmaduro.
- Se reportó por primera vez la presencia del receptor H4 en células de Leydig inmaduras a través de estudios funcionales e inmunocitoquímica.
- Los estudios *in vitro* del efecto de HA sobre la proliferación de CLI purificadas sugieren que esta amina contribuiría al desarrollo de CLA modulando negativamente la proliferación a través del receptor H4.
- Los ensayos en ratas adultas tratadas con EDS constituyeron un primer acercamiento al estudio *in vivo* de los efectos de HA en el desarrollo de CL y mostraron que el tratamiento con HA es capaz de inducir un aumento en el número de CL con características maduras.



Estos resultados apoyan una nueva hipótesis en la que HA inhibiría la proliferación de células de Leydig a través del receptor subtipo H4, preparando a la célula para la subsiguiente diferenciación. A su vez, esta amina podría contribuir en forma indirecta a la regulación de factores testiculares clave para el desarrollo de las células de Leydig.

Por otra parte, la participación del receptor H4 en procesos inmunológicos sumado a su localización y su efecto en células de Leydig inmaduras, reportados en este trabajo, ponen en evidencia la necesidad de continuar los estudios sobre la posible participación de este subtipo de receptor en patologías reproductivas asociadas a procesos inflamatorios o alteraciones inmunológicas.

## **REFERENCIAS**

- Adams WJ, Lawson JA, Morris DL. Cimetidine inhibits in vivo growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated in vitro and in vivo growth. *Gut* 1994; 35: 1632-1636.
- Ai W, Takaishi S, Wang TC, Fleming JV. Regulation of L-histidine decarboxylase and its role in carcinogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2006; 81: 231-270
- Aikawa T, Hirose T, Matsumoto I, Suzuki T. Direct stimulatory effect of histamine on aldosterone secretion of the perfused dog adrenal gland. *Jpn J Physiol* 1981; 31: 457-463.
- Aikawa T, Matsumoto I, Hirose T, Morikawa T, Tsujimoto Y. H1 action of histamine on aldosterone and cortisol secretion by perfused dog adrenal. *Am J Physiol* 1986; 250: E523-529.
- Albrecht M, Frungieri MB, Gonzalez-Calvar S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A. Evidence for a histaminergic system in the human testis. *Fertil Steril* 2005; 83: 1060-1063.
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 1983; 302: 832-837.
- Artuc M, Guhl S, Babina M, Unger T, Steckelings UM, Zuberbier T. Mast cell-derived TNF-alpha and histamine modify IL-6 and IL-8 expression and release from cutaneous tumor cells. *Exp Dermatol* 2011; 20: 1020-1022.
- Ascoli M, Pignataro OP, Segaloff D The inositol phosphate/diacylglycerol pathway in MA-10 Leydig tumor cells. Activation by arginine vasopressin and lack of effect of epidermal growth factor and human choriogonadotropin. *J Biol Chem* 1989; 264: 6674-6681.
- Bakalska M, Atanassova N, Angelova P, Koeva I, Nikolov B, Davidoff M. Degeneration and restoration of spermatogenesis in relation to the changes in Leydig cell population following ethane dimethanesulfonate treatment in adult rats. *Endocr Regul* 2001; 35: 209-215.
- Benton L, Shan LX, Hardy MP. Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 61-68.
- Bisgaier CL, Chanderbhan R, Hinds RW, Vahouny GV. Adrenal cholesterol esters as substrate source for steroidogenesis. *J Steroid Biochem* 1985; 23: 967-974.
- Bland ML, Desclozeaux M, Ingraham HA. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 995: 59-72.
- Bongers G, de Esch I, Leurs R. Molecular Pharmacology of the Four Histamine Receptors. En: Thurmond RL (ed), *Histamine in Inflammation*. 2010 Landes Bioscience y Springer Science+Business Media, LLC; 2010: 11-19.
- Borges R. Histamine H1 receptor activation mediates the preferential release of adrenaline in the rat adrenal gland. *Life Sci* 1994; 54: 631-640.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z Rheumatol* 2000; 59 Suppl 2: II/12-17.

- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 135-141.
- Bugajski J. Central metabolic and pituitary-adrenocortical stimulatory action of histamine and clonidine. *Pol J Pharmacol Pharm* 1984; 36: 159-176.
- Bunn SJ, Boyd TL. Characterization of histamine-induced catecholamine secretion from bovine adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* 1992; 58: 1602-1610.
- Casale TB, Rodbard D, Kaliner M. Characterization of histamine H-1 receptors on human peripheral lung. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 3285-3292.
- Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Misiti S, Raza G, De Paula U, Marchese R, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation. *Int J Oncol* 2010; 37: 493-501.
- Chang RS, Tran VT, Snyder SH. Characteristics of histamine H1-receptors in peripheral tissues labeled with [3H]mepyramine. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 209: 437-442.
- Charreau EH, Calvo JC, Nozu K, Pignataro O, Catt KJ, Dufau ML. Hormonal modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in gonadotropin-stimulated and -desensitized testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 1981; 256: 12719-12724.
- Chen G, Kashiwagi H, Omura N, Aoki T. Effect of a histamine H1 receptor antagonist on gastric endocrine cell proliferation induced by chronic acid suppression in rats. *J Gastroenterol* 2000; 35: 742-747.
- Chen H, Ge RS, Zirkin BR. Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 306: 9-16.
- Conti P, Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tete S, Mastrangelo F, Perrella A, De Lutis MA, Tagen M, Theoharides TC. Role of mast cells in tumor growth. *Ann Clin Lab Sci* 2007; 37: 315-322.
- Cowden JM, Zhang M, Dunford PJ, Thurmond RL. The histamine H4 receptor mediates inflammation and pruritus in Th2-dependent dermal inflammation. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1023-1033.
- Cricco G, Nunez M, Medina V, Garbarino G, Mohamad N, Gutierrez A, Cocca C, Bergoc R, Rivera E, Martin G. Histamine modulates cellular events involved in tumour invasiveness in pancreatic carcinoma cells. *Inflamm Res* 2006; 55 Suppl 1: S83-84.
- Darvas Z, Falus A. Histidine decarboxylase (HDC) enzyme and gene. En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects*. SpringerMed publishing Ltd; 2004: 31-42.
- Davenas E, Rouleau A, Morisset S, Arrang JM. Autoregulation of McA-RH7777 hepatoma cell proliferation by histamine H3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: 406-413.

- Davio CA, Cricco GP, Bergoc RM, Rivera ES. H1 and H2 histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 91-96.
- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1996; 137: 5337-5343.
- Del Valle J, Gantz I. Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol* 1997; 273: G987-996.
- Demorrow S, Francis H, Alpini G. Biogenic amine actions on cholangiocyte function. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 1005-1013.
- Dimaline R, Baxendale AJ. Control of histidine decarboxylase gene expression in enterochromaffin-like cells. *Yale J Biol Med* 1998; 71: 195-205.
- Driver AG, Mustafa SJ. Correlation of histamine H1 receptor function and [3H]mepyramine binding in porcine tracheal tissue. *Eur J Pharmacol* 1987; 139: 287-295.
- Dy M, Schneider E. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 393-410.
- Ehrhart-Bornstein M, Haidan A, Alesci S, Bornstein SR. Neurotransmitters and neuropeptides in the differential regulation of steroidogenesis in adrenocortical-chromaffin co-cultures. *Endocr Res* 2000; 26: 833-842.
- Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocrine Reviews* 1998; 19(2): 101-143.
- Esbenshade TA, Browman KE, Bitner RS, Strakhova M, Cowart MD, Brioni JD. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 1166-1181.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420(6916):629-35.
- Falus A, Pos Z, Darvas Z. Histamine in normal and malignant cell proliferation. *Adv Exp Med Biol* 2011; 709: 109-123.
- Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev*. 2006; 213:66-81.
- Fitzsimons C, Molinari B, Duran H, Palmieri M, Davio C, Cricco G, Bergoc R, Rivera E. Atypical association of H1 and H2 histamine receptors with signal transduction pathways during multistage mouse skin carcinogenesis. *Inflamm Res* 1997; 46: 292-298.
- Floderus S. Untersuchungen den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Path Microbiol Scand (Suppl)* 1944; 53:1-276
- Fluck CE, Miller WL. P450 oxidoreductase deficiency: a new form of congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Pediatr* 2006; 18: 435-441.

- Foster RH. Reciprocal influences between the signalling pathways regulating proliferation and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Mol Endocrinol* 2004; 32: 893-902.
- Fottner C, Hoeflich A, Wolf E, Weber MM. Role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical growth control and carcinogenesis. *Horm Metab Res* 2004; 36: 397-405.
- Francis H, Glaser S, Demorrow S, Gaudio E, Ueno Y, Venter J, Dostal D, Onori P, Franchitto A, Marzioni M, Vaculin S, Vaculin B, Katki K, Stutes M, Savage J, Alpini G. Small mouse cholangiocytes proliferate in response to H1 histamine receptor stimulation by activation of the IP3/CaMK I/CREB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C499-513.
- Francis H, Onori P, Gaudio E, Franchitto A, DeMorrow S, Venter J, Kopriva S, Carpino G, Mancinelli R, White M, Meng F, Vetusch A, Sferra R, Alpini G. H3 histamine receptor-mediated activation of protein kinase Calpha inhibits the growth of cholangiocarcinoma in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1704-1713.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L, Calandra RS. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology* 1999; 69: 299-308.
- Frungieri MB, Urbanski HF, Hohne-Zell B, Mayerhofer A. Neuronal elements in the testis of the rhesus monkey: ontogeny, characterization and relationship to testicular cells. *Neuroendocrinology* 2000; 71: 43-50.
- Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, Libe R, Chokri I, Audebourg A, Royer B, Sbiera S, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Bertagna X, Allolio B, Bertherat J, Tissier F. beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 328-336.
- Gaytan F, Aceitero J, Lucena C, Aguilar E, Pinilla L, Garnelo P, Bellido C. Simultaneous proliferation and differentiation of mast cells and Leydig cells in the rat testis. Are common regulatory factors involved? *J Androl* 1992; 13: 387-397.
- Gaytan F, Bellido C, Aceitero J, Aguilar E, Sanchez-Criado JE. Leydig cell involvement in the paracrine regulation of mast cells in the testicular interstitium of the rat. *Biol Reprod* 1990; 43: 665-671.
- Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, van Rooijen N. Selective depletion of testicular macrophages and prevention of Leydig cell repopulation after treatment with ethylene dimethane sulfonate in rats. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 175-182.
- Ge R y Hardy M. Regulation of Leydig Cell during Pubertal Development. En: Payne A y Hardy M (eds.), *Leydig Cell in Health and Disease*. Human Press Inc. 2007: 55-69.
- Gibbs BF, Levi-Schaffer F. H4 receptors in mast cells and basophils: a new therapeutic target for allergy? *Front Biosci*. 2012; 17:430-7.

- Haidl G, Duan YG, Chen SJ, Kohn FM, Schuppe HC, Allam JP. The role of mast cells in male infertility. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7(5):627-34.
- Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR, Ewing LL. Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* 1990; 127: 488-490.
- Hedger MP, Eddy EM. The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on Percoll density gradients: an immunological, cytochemical, and functional analysis. *Endocrinology* 1987; 121: 1824-1838.
- Hill SJ. Histamine receptors and interactions between second messenger transduction systems. *Agents Actions Suppl* 1991; 33: 145-159.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 253-278.
- Hirose T, Matsumoto I, Aikawa T, Suzuki T. Effect of histamine on the adrenal secretion of cortisol and corticosterone in hypophysectomized dogs. *J Endocrinol* 1977; 73: 539-540.
- Hishinuma S, Komazaki H, Fukui H, Shoji M. Ubiquitin/proteasome-dependent down-regulation following clathrin-mediated internalization of histamine H1-receptors in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 2010; 113: 990-1001.
- Ho MM, Vinson GP. Peptide growth factors and the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 1997; 36: 558-568.
- Horio S, Nakamura S, Ishida Y. Alterations in histamine receptors of guinea-pig ileal smooth muscle produced during agonist-induced desensitization. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 587-590.
- Horio S, Ogawa M, Kawakami N, Fujimoto K, Fukui H. Identification of amino acid residues responsible for agonist-induced down-regulation of histamine H(1) receptors. *J Pharmacol Sci.* 2004; 94(4):410-9.
- Hu GX, Lin H, Chen GR, Chen BB, Lian QQ, Hardy DO, Zirkin BR, Ge RS. Deletion of the Igf1 gene: suppressive effects on adult Leydig cell development. *J Androl* 2010; 31: 379-387.
- Igaz P, Hegyesi H. Histamine receptors: H1, H2, H3, H4, and the putative "Hic" (intracellular) receptor. Coding genes and gene products, "in silico" and experimental data. En: Falus A (ed.);Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects.* SpringMed publishing Ltd; 2004: 69-77.
- Ikawa Y, Yonekawa T, Ohkuni Y, Kuribayashi M, Fukino K, Ueno K. A comparative study of histamine activities on differentiation of osteoblasts and osteoclasts. *J Toxicol Sci* 2007; 32: 555-564.
- Inoue I, Yanai K, Kitamura D, Taniuchi I, Kobayashi T, Niimura K, Watanabe T. Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13316-13320.

- Jackson CM, Jackson H. Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. *J Reprod Fertil* 1984; 71: 393-401.
- Jones BL, Kearns GL. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89: 189-197.
- Karlstedt K, Nissinen M, Michelsen KA, Panula P. Multiple sites of L-histidine decarboxylase expression in mouse suggest novel developmental functions for histamine. *Dev Dyn* 2001; 221: 81-91.
- Khan UW, Rai U. Differential effects of histamine on Leydig cell and testicular macrophage activities in wall lizards: precise role of H1/H2 receptor subtypes. *J Endocrinol* 2007; 194: 441-448.
- Kidd M, Tang LH, Miu K, Lawton GP, Sandor A, Modlin IM. Autoregulation of enterochromaffin-like cell histamine secretion via the histamine 3 receptor subtype. *Yale J Biol Med* 1996; 69: 9-19.
- Kim JM, Luo L, Zirkin BR. Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology* 2000; 141: 1846-1853.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Lázár-Molnár E. Signal transduction pathways of histamine receptors. En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects*. SpringMed publishing Ltd; 2004: 89-96.
- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 1995; 66: 413-463.
- Liao W, Rudling M, Moller C, Angelin B. Endogenous histamine reduces plasma insulin-like growth factor I via H1 receptor-mediated pathway in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999; 374: 471-476.
- Lin JS, Sergeeva OA, Haas HL. Histamine H3 receptors and sleep-wake regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 17-23.
- Lotfi CF, Todorovic Z, Armelin HA, Schimmer BP. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 29886-29891.
- Maluf DF, de Oliveira BH, Lalli E. Therapy of adrenocortical cancer: present and future. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 222-232.
- Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 321-333.
- Marley PD. Mechanisms in histamine-mediated secretion from adrenal chromaffin cells. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 1-34.



- Matsumoto I, Hirose T, Aikawa T. Direct effect of histamine on the production of adrenocortical hormone by guinea-pig adrenal cells. *Jpn J Physiol* 1981; 31: 605-608.
- Mayerhofer A, Bartke A, Amador AG, Began T. Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. *Endocrinology* 1989; 125: 2212-2214.
- Mayerhofer A, Lahr G, Seidl K, Eusterschulte B, Christoph A, Gratzl M. The neural cell adhesion molecule (NCAM) provides clues to the development of testicular Leydig cells. *J Androl* 1996; 17: 223-230.
- Medina VA, Brenzoni PG, Lamas DJ, Massari N, Mondillo C, Nunez MA, Pignataro O, Rivera ES. Role of histamine H4 receptor in breast cancer cell proliferation. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011; 3: 1042-1060.
- Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 755-767.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 2001; 65: 660-671.
- Meng F, Han Y, Staloch D, Francis T, Stokes A, Francis H. The H4 histamine receptor agonist, clobenpropit, suppresses human cholangiocarcinoma progression by disruption of epithelial mesenchymal transition and tumor metastasis. *Hepatology* 2011; 54: 1718-1728.
- Miller WL. Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev* 2008; 13: 1-18.
- Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res* 2011; 52: 2111-2135.
- Miyoshi K, Das AK, Fujimoto K, Horio S, Fukui H. Recent advances in the molecular pharmacology of the histamine systems: regulation of H1 receptor signaling by changing its expression level. *JPharmacol Sci*. 2006; 101(1): 3-6
- Mizuguchi H, Fukui H, Yabumoto M, Wada H. Synaptic and extra-synaptic distribution of histamine H1-receptors in rat and guinea pig brains. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 1043-1047.
- Modlin IM, Zhu Z, Tang LH, Kidd M, Lawton GP, Miu K, Powers RE, Goldenring JR, Pasikhov D, Soroka CJ. Evidence for a regulatory role for histamine in gastric enterochromaffin-like cell proliferation induced by hypergastrinemia. *Digestion* 1996; 57: 310-321.
- Molenaar R, de Rooij DG, Rommerts FF, Reuvers PJ, van der Molen HJ. Specific destruction of Leydig cells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. *Biol Reprod* 1985; 33: 1213-1222.
- Molina-Hernandez A, Velasco I. Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors. *J Neurochem* 2008; 106: 706-717.
- Mondillo C, Falus A, Pignataro O, Pap E. Prolonged histamine deficiency in histidine decarboxylase gene knockout mice affects Leydig cell function. *J Androl* 2007; 28: 86-91.

- Mondillo C, Pagotto RM, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, Pignataro OP. Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats. *Biol Reprod* 2009; 80: 144-152.
- Mondillo C, Patrignani Z, Reche C, Rivera E, Pignataro O. Dual role of histamine in modulation of Leydig cell steroidogenesis via HRH1 and HRH2 receptor subtypes. *Biol Reprod* 2005; 73: 899-907.
- Mori H, Christensen AK. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* 1980; 84: 340-354.
- Morini G, Grandi D, Schunack W. Ligands for histamine H(3) receptors modulate cell proliferation and migration in rat oxyntic mucosa. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 237-244.
- Motulsky H. *The GraphPad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data*. GraphPad Software, Copyright © 1995 – 2001.
- Nagai T, Takaba H, Miyake K, Hirabayashi Y, Yamada K. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. *Fertil Steril*. 1992 Jun;57(6):1331-6.
- Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 427-433.
- Nistal M, Santamaria L, Paniagua R. Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat (Basel)* 1984; 119: 155-160.
- Noszál B, Kraszni M, Rácz A. Histamine: fundamentals of biological chemistry. En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects*. SpringerMed publishing Ltd; 2004: 15-28.
- Notcovich C, Diez F, Tubio MR, Baldi A, Kazanietz MG, Davio C, Shayo C. Histamine acting on H1 receptor promotes inhibition of proliferation via PLC, RAC, and JNK-dependent pathways. *Exp Cell Res* 2010; 316: 401-411.
- Nozaki K, Weis V, Wang TC, Falus A, Goldenring JR. Altered gastric chief cell lineage differentiation in histamine-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1211-1220.
- Ohtsu H. Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice. *Adv Exp Med Biol* 2010; 709: 21-31.
- Orso E, Szalay KS, Feher T. Interaction of histamine with adrenocorticotrophic hormone: a local modulatory role for adrenocortical androgen synthesis? *Inflamm Res* 1997; 46 Suppl 1: S57-58.
- Pap E, Racz K, Kovacs JK, Varga I, Buzas E, Madarasz B, Foldes C, Szalai C, Watanabe T, Ohtsu H, Ichikawa A, Nagy A, Falus A. Histidine decarboxylase deficiency in gene knockout mice elevates male sex steroid production. *J Endocrinol* 2002; 175: 193-199.

- Passani MB, Blandina P, Torrealba F. The histamine H3 receptor and eating behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(1):24-9
- Payne AH, Wong KL, Vega MM. Differential effects of single and repeated administrations of gonadotropins on luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells. *J Biol Chem* 1980; 255: 7118-7122.
- Pecci Saavedra J, Vilar O, Pellegrino de Iraldi A. Aparato Genital Masculino. *Histología Médica.* López Libreros Editores, 3ra edición; 1990: 351-375.
- Petit-Bertron AF, Machavoine F, Defresne MP, Gillard M, Chatelain P, Mistry P, Schneider E, Dy M. H4 histamine receptors mediate cell cycle arrest in growth factor-induced murine and human hematopoietic progenitor cells. *PLoS One* 2009; 4: e6504.
- Pignataro OP, Radicella JP, Calvo JC, Charreau EH. Mitochondrial biosynthesis of cholesterol in Leydig cells from rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 33: 53-67.
- Pós, Z, Hegyest H, Rivera ES. Histamine and cell proliferation. En: Falus A (ed.);Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects.* SpringMed publishing Ltd; 2004: 199-217.
- Ragazzon B, Assie G, Bertherat J. Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18: R15-27.
- Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 228: 23-38.
- Reynolds JL, Akhter J, Morris DL. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1996; 6: 95-99.
- Rivera ES, Cricco GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martin GA, Bergoc RM. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 15-23.
- Roaiah MM, Khatab H, Mostafa T. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia.* 2007; 39(5):185-9.
- Safina F, Tanaka S, Inagaki M, Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Expression of L-histidine decarboxylase in mouse male germ cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 14211-14215.
- Samandari E, Kempna P, Nuoffer JM, Hofer G, Mullis PE, Fluck CE. Human adrenal corticocarcinoma NCI-H295R cells produce more androgens than NCI-H295A cells and differ in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17,20 lyase activities. *J Endocrinol* 2007; 195: 459-472.
- Schinner S, Bornstein SR. Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol* 2005; 16: 91-98.
- Schneider E, Bertron AF, Dy M. Modulation of hematopoiesis through histamine receptor signaling. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3: 467-473.

- Schuppe HC, Meinhardt A. Immune privilege and inflammation of the testis. *Hem Immunol Allergy*. 2005; 88:1-14.
- Schwelberger H. Diamine oxidase (DAO) enzyme and gene. En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects*. SpringMed publishing Ltd; 2004: 43-52.
- Schwelberger H. Histamine N-methyltransferasa (HNMT) enzyme and gene. En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects*. SpringMed publishing Ltd; 2004: 53-59.
- Shiraishi K, Ascoli M. Lutropin/choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary cultures of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the extracellularly regulated kinase 1/2 cascade. *Endocrinology* 2007; 148: 3214-3225.
- Smit MJ, Timmerman H, Alewijnse AE, Punin M, van den Nieuwenhof I, Blauw J, van Minnen J, Leurs R. Visualization of agonist-induced internalization of histamine H2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 1138-1145.
- Smits VA, Medema RH. Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1519(1-2):1-12.
- Soule BP, Simone NL, DeGraff WG, Choudhuri R, Cook JA, Mitchell JB. Loratadine dysregulates cell cycle progression and enhances the effect of radiation in human tumor cell lines. *Radiat Oncol* 2011; 5: 8.
- Sriraman V, Sairam MR, Rao AJ. Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of Leydig cells using an ethane 1,2-dimethylsulfonate-treated adult rat model. *J Endocrinol* 2003; 176: 151-161.
- Steiner AL, Kipnis DM, Utiger R, Parker C. Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64: 367-373.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2647-2659.
- Stratakis CA. New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300: 152-157.
- Suescun MO, Calandra RS, Lustig L. Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats. *J Androl* 1994; 15: 442-448.
- Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colon E, Svechnikova I, Soder O. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* 2010; 73: 93-101.
- Szabo PM, Wiener Z, Tombol Z, Kovacs A, Pocza P, Horanyi J, Kulka J, Riesz P, Toth M, Patocs A, Gaillard RC, Falus A, Racz K, Igaz P. Differences in the expression of histamine-related genes and proteins in normal human adrenal cortex and adrenocortical tumors. *Virchows Arch* 2009; 455: 133-142.

- Tacon LJ, Prichard RS, Soon PS, Robinson BG, Clifton-Bligh RJ, Sidhu SB. Current and emerging therapies for advanced adrenocortical carcinoma. *Oncologist* 2011; 16: 36-48.
- Teerds K y Rijntjes E. Dynamics of Leydig Cell Regeneration after EDS: A Model for Postnatal Leydig Cell Development. En: Payne A y Hardy M (eds.), *Leydig Cell in Health and Disease*. Human Press Inc.; 2007: 91-115.
- Teerds KJ, de Rooij DG, de Jong FH, van Haaster LH. Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biol Reprod* 1998; 59: 344-350.
- Teerds KJ, Rijntjes E, Veldhuizen-Tsoerkan MB, Rommerts FF, de Boer-Brouwer M. The development of rat Leydig cell progenitors in vitro: how essential is luteinising hormone? *J Endocrinol* 2007; 194: 579-593.
- Thakkar MM. Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep Med Rev* 2011; 15: 65-74.
- Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 41-53.
- Tiligada E, Zampeli E, Sander K, Stark H. Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18: 1519-1531.
- Togias A. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: S60-68.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354.
- Tsujimoto S, Okumura Y, Kamei C, Tasaka K. Effects of intracerebroventricular injection of histamine and related compounds on corticosterone release in rats. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 807-813.
- Tung KS, Teuscher C. Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. *Hum Reprod Update*. 1995; 1(1):35-50.
- Vahouny GV, Chanderbhan R, Stewart P, Tombes R, Keyeyune-Nyombi E, Fiskum G, Scallen TJ. Phospholipids, sterol carrier protein2 and adrenal steroidogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1985; 834: 324-330.
- Valencia S, Hernandez-Angeles A, Soria-Jasso LE, Arias-Montano JA. Histamine H(1) receptor activation inhibits the proliferation of human prostatic adenocarcinoma DU-145 cells. *Prostate* 2001; 48: 179-187.
- Van der Ven LT, Van Buul-Offers SC, Gloudemans T, Roholl PJ, Sussenbach JS, Den Otter W. Histamine-stimulated expression of insulin-like growth factors in human glioma cells. *Br J Cancer* 1997; 75: 1091-1097.
- van Ditzhuijsen CI, van de Weijer R, Haak HR. Adrenocortical carcinoma. *Neth J Med* 2007; 65: 55-60.

- Vinson GP. Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 227-239.
- Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol* 2008; 199: 351-365.
- Wang LD, Hoeltzel M, Gantz I, Hunter R, Del Valle J. Characterization of the histamine H2 receptor structural components involved in dual signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 573-578.
- Wang G, Hardy MP. Development of leydig cells in the insulin-like growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol Reprod* 2004; 70: 632-639.
- Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis J. The stress activated protein kinase pathway. *Cancer Surv.* 1996; 27:127-38.
- Wu X, Wan S, Lee MM. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol* 2007; 213: 429-433.
- Yamashita M, Ito S, Sugama K, Fukui H, Smith B, Nakanishi K, Wada H. Biochemical characterization of histamine H1 receptors in bovine adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 1233-1239.
- Yao H, Barsoum I. Fetal Leydig Cell: Origin, Regulation and Functions. En: Payne A y Hardy M (eds.), *Leydig Cell in Health and Disease*. Human Press Inc.; 2007: 47-53.
- Yoshida T, Mashimo S, Mio M, Kamei C. Histamine-induced cortisol secretion from bovine adrenocortical cells: co-incubated with bovine adrenal medullary cells. *Jpn J Pharmacol* 1997; 75: 115-121.
- Yu S, Stahl E, Li Q, Ouyang A. Antigen inhalation induces mast cells and eosinophils infiltration in the guinea pig esophageal epithelium involving histamine-mediated pathway. *Life Sci* 2008; 82: 324-330.
- Zampeli E, Tiligada E. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 24-33.
- Zhang M, Thurmond RL, Dunford PJ. The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 594-606.
- Zieher LM, Debeljuk L, Iturriza F, Mancini RE. Biogenic amine concentration in testes of rats at different ages. *Endocrinology* 1971; 88: 351-354.