



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

INFLUENCIA DE LA HISTAMINA EN LA REGULACIÓN PARACRINA
Y/O AUTOCRINA DEL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE LAS
FUNCIONES TESTICULARES. ESTUDIO DE LOS SISTEMAS
TRANSDUCTORES INVOLUCRADOS.

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

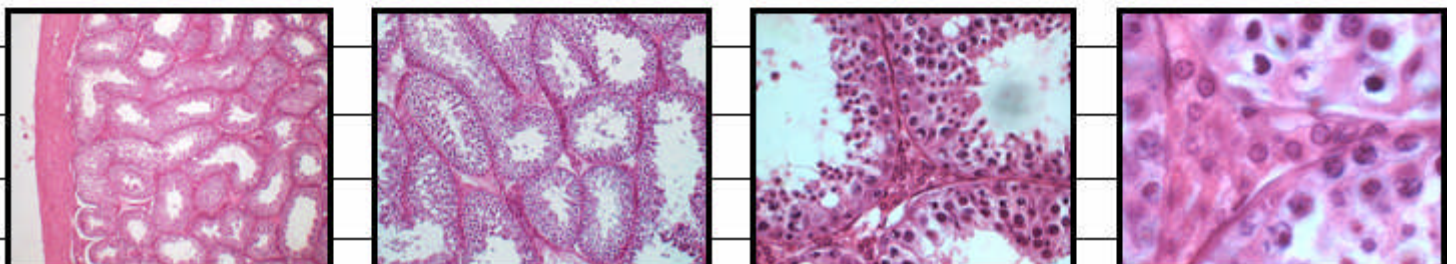
Autor: **Carolina Mondillo**

Director de tesis: **Dr. Omar P. Pignataro**

Consejero de estudios: **Dr. Juan Carlos Calvo**

Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales
Instituto de Biología y Medicina Experimental
CONICET

Buenos Aires, Septiembre de 2005



RESÚMEN

INFLUENCIA DE LA HISTAMINA EN LA REGULACIÓN PARACRINA Y/O AUTOCRINA DEL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE LAS FUNCIONES TESTICULARES. ESTUDIO DE LOS SISTEMAS TRANSDUCTORES INVOLUCRADOS.

Si bien diversos trabajos reportan efectos de histamina (HA) sobre las funciones reproductivas femeninas, existe muy poca bibliografía respecto de un posible papel de la amina como modulador de la fisiología testicular. Los resultados de este trabajo indican que HA ejerce un efecto dual, dependiente de la concentración, sobre la esteroidogénesis en células MA-10 y Leydig de rata. Mientras que HA 1nM es capaz de estimular la síntesis basal de esteroides y potenciar la respuesta de las células a LH/hCG, HA 10 μ M muestra un efecto inhibitorio. Se aporta también evidencia confirmatoria de la existencia de receptores HRH1 y HRH2 en ambos modelos experimentales. Sobre la base de experimentos utilizando agonistas y antagonistas HRH1 y HRH2, los efectos estimulatorios de HA se deberían fundamentalmente a la activación de HRH2, mientras que la activación de HRH1 conduciría a una inhibición de la esteroidogénesis. Con respecto a los sistemas transductores asociados a dichos receptores, los resultados que aquí se presentan sugieren el acoplamiento de HRH2 a la activación de adenilato ciclasa, mientras que HRH1 estaría acoplado a la activación de fosfolipasa C. Además, el óxido nítrico mediaría parte de los efectos inhibitorios de HA sobre la esteroidogénesis. Finalmente, se presenta evidencia de que las células de Leydig podrían sintetizar HA, constituyendo una fuente adicional de la amina en el testículo. HA actuaría entonces como regulador paracrino y/o autocrino de la biosíntesis androgénica. En conjunto, los resultados obtenidos permitirán una mejor comprensión de la importancia de HA en la regulación de las funciones reproductivas masculinas. Además, el nuevo papel de la amina como modulador dual de la esteroidogénesis atraerá

atención hacia los posibles efectos colaterales del uso de antihistamínicos, que podrían conducir a alteraciones en los niveles de andrógenos testiculares.

Palabras clave: histamina, esteroidogénesis, testosterona, células de Leydig, mastocitos, transducción de señales.

ABSTRACT

INFLUENCE OF HISTAMINE ON PARACRINE AND/OR AUTOCRINE REGULATION OF DEVELOPMENT AND MAINTENANCE OF TESTICULAR FUNCTIONS. STUDY OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS INVOLVED.

Although several reports indicate effects of histamine (HA) on female reproductive functions, little literature exists suggesting a physiological role of the amine in the testis. The results of the present study clearly indicate HA exerts a dual concentration-dependent effect on steroidogenesis in MA-10 murine Leydig cells and purified rat Leydig cells. While 1 nM HA can stimulate basal steroid production and significantly increase the response to LH/hCG in these cells, 10 μ M HA has an inhibitory effect. Confirming evidence is also provided for the existence of functional HRH1 and HRH2 receptors in both experimental models. On the basis of experiments using HRH1 and HRH2 agonists and antagonists, HRH2 activation would be largely responsible for stimulation of steroidogenesis, while HRH1 activation would lead to inhibition of steroid synthesis. As regards signal transduction pathways associated with these receptors, results of this study suggest coupling of HRH2 to the adenylate cyclase system, while HRH1 would couple to phospholipase C activation. Moreover, nitric oxide would mediate part of the inhibitory effects of HA on steroidogenesis. Finally, evidence is presented to support Leydig cells may synthesize and secrete HA, constituting an additional source of the amine in the testis. HA might then act as a paracrine and/or autocrine modulator of androgen biosynthesis. Collectively, the data presented herein will help to better understand the importance of HA in the regulation of male reproductive function. Undoubtedly, the novel role of the amine as modulator of testicular steroidogenesis should attract more attention to the unexpected side effects of

antihistamines, which might shift the local balance and in turn alter androgen production.

Key Words: histamine, steroidogenesis, testosterone, Leydig cells, mast cells, signal transduction.

El presente trabajo de Tesis Doctoral se llevó a cabo gracias a la concesión de una beca de Formación de Posgrado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (años 2002 a 2004), y la beca Ramón Carrillo-Arturo Oñativia del Ministerio de Salud de La Nación (2005).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Omar Pignataro, mi director de Tesis, por la confianza que depositó en mí desde el inicio de este trabajo, por su incondicional apoyo y sus consejos, y también por permitirme compaginar la actividad docente con la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Juan Carlos Calvo, por aceptar ser mi consejero de estudios, por su amabilidad, por destinar parte de su tiempo a responder mis preguntas, sin prisas ni interrupciones.

A Zora y Ceci, las mejores compañeras de laboratorio, por los experimentos compartidos, por su solidaridad, por los buenos momentos que pasamos en el "214" y por regalarme su amistad todos los días a lo largo de 5 años.

A Eliana, por sus acertadas sugerencias en relación a las células de Leydig.

A Vanina Medina, Graciela Cricco y Elena Rivera, por compartir su experiencia y conocimiento sobre la histamina.

A Lucas, por la determinación de inositoles fosfato.

A Hargita, por los western de HDC.

A Cynthia, Claudio, Julio, Marie, Marcos, Nati, Vane y Yael, por el maravilloso ambiente de trabajo, por su inagotable colaboración y por ayudarme a cargar las pilas cuando me hizo falta.

A Ceci del "213" y las chicas del "215", Fernanda, Dalhia, Griselda y Marina, por los infinitos préstamos, la buena onda y las largas charlas compartidas entre experimento y experimento.

A Ana María, José Félix e Ignacio, por su ayuda desinteresada, su calidez y su permanente apoyo.

A mis abuelos, porque desde algún lugar siempre me acompañan.

A mi hermano Sebastián, por los aportes informáticos, por su comprensión, su paciencia y sus palabras de aliento.

A mis padres, Carlos y Susana, por su permanente estímulo, por su apoyo incondicional, por el inmenso amor que me brindan, porque sin ellos a mi lado no hubiera logrado jamás llegar a esta instancia.

A Martín, por el diseño de la carátula y los diagramas, por su comprensión durante los años que dediqué a este trabajo de Tesis, por regalarme su amor y su ternura, por acompañarme en éste y tantos otros momentos fundamentales de mi vida.

A todos los que con su aporte científico o humano han colaborado para la realización de esta Tesis Doctoral.

A Franz von Leydig



ABREVIATURAS

AA	ácido araquidónico
AC	adenilato ciclasa
APS	persulfato de amonio
ATP	adenosina 5´-trifosfato
AMPc	adenosina 3´, 5´-monofosfato cíclico
BH₄	tetrahidrobiopterina
8-Br-AMPc	8-Bromo- adenosina 3´, 5´-monofosfato cíclico
B_{max}	capacidad máxima de unión
BSA	albúmina sérica bovina
CaM	calmodulina
CHO	células de ovario de hamster chino
CRE	elemento de respuesta a AMPc
CREB	proteína de unión a CRE
CYP11A	enzima que escinde la cadena lateral del colesterol, dependiente de citocromo P450
CYP17	enzima 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa, dependiente de citocromo P450
DAG	diacilglicerol
DAO	diamina Oxidasa
dbAMPc	dibutiril adenosín 3´, 5´-monofosfato cíclico
DIM	dimaprit
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen- diamino - tetracético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilen-2-glicol-2-etilamino tetracético
EHRF	factor liberador de histamina embrionario
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial

ERK 1/2	proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares
ES	error estándar
F	famotidina
FITC	isocianato de fluoresceína
FMN/FAD	flavina mononucleótido/flavina adenina dinucleótido
FSH	hormona folículo estimulante
FSK	forskolina
G_{αs}	subunidad alfa de la proteína G _s (estimuladora)
G_{αq}	subunidad alfa de la proteína G _q
G_{αi/o}	subunidad alfa de la proteína G _{i/o} (inhibitoria)
GC	guanilato ciclasa
GDP	guanosina difosfato
GMPc	guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico
GnRH	factor liberador de gonadotrofinas
GTP	guanosina 5'-trifosfato
HA	histamina
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HDC	L-histidina descarboxilasa
HDC -/-	Ratones noqueados para el gen de HDC
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico
Hic	receptor histaminérgico de localización intracelular
HNMT	histamina N-metil transferasa
HRH1	receptor histaminérgico subtipo 1
HRH2	receptor histaminérgico subtipo 2
HRH3	receptor histaminérgico subtipo 3
HRH4	receptor histaminérgico subtipo 4
HT	ídem HTMT-dimaleate

HTMT-dimaleate	6-[2-(4-Imidazolil) etilamino]-N-(4-trifluorometilfenil)-heptanocarboxamida
3β-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^4/Δ^5 -isomerasa
17β-HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
IBMX	3-isobutil-1-metil-xantina
IL-1	interleuquina 1
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IP₁	inositol monofosfato
IP₂	inositol difosfato
IP₃	inositol 1, 4, 5-trifosfato
JNK	proteínas quinasas regulada por estrés
K_d	constante de disociación
KO	ratones noqueados genéticamente
LH	hormona luteinizante
LHRH	hormona liberadora de la hormona lueinizante
L-NAME	metil ester de N ^G -nitro-L-arginina
MAO	monoaminooxidasa
MAPK	proteínas quinasas activadas por mitógenos
βNAD	nicotinamida adenina dinucleotido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducida
NSD-1015	3-hidroxibencil-hidracina
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NOSs	óxido nítrico sintasas
P	pirilamina
P₅	pregnenolona
PBS	buffer fosfato salino
PCA	ácido perclórico

PDE	fosfodiesterasa
PEST	secuencia aminoacídica rica Prolina, Ácido Glutámico, Serina y Treonina
PF	piridoxal fosfato
PIP₂	fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLA₂	fosfolipasa A ₂
PLC	fosfolipasa C
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
RIA	radioinmunoanálisis
22R-OH-Col	22R-hidroxi-colesterol
StAR	proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	tetra-metil-etilendiamina
TGF-β	factor de crecimiento transformante tipo β
TGF-α	factor de crecimiento transformante tipo α
TME-AMPc	2'-O-monosucciniladenosina-tirosil metil ester 3', 5'-monofosfato cíclico
U73122	inhibidor específico de fosfolipasa C

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Consideraciones Generales	19
1.2. Envolturas testiculares	20
1.3. Irrigación e inervación del testículo	22
1.4. Testículo propiamente dicho-Constitución anatómica	23
1.4.1. Organización de los túbulos seminíferos	25
1.4.2. Organización del tejido intersticial	27
1.5. Regulación del eje hipotálamo-hipófiso-testicular	30
1.6. Biosíntesis de esteroides en células de Leydig	33
1.6.1. Camino esteroidogénico	33
1.6.2. Regulación de la esteroidogénesis en células de Leydig por la hormona luteinizante	37
1.6.2.1. <i>Respuesta esteroidogénica a LH en función del tiempo</i>	39
<i>Efecto agudo</i>	39
<i>Efectos tardíos</i>	39
1.6.3. Regulación local de la esteroidogénesis testicular	39
1.7. Histamina	42
1.7.1. Biosíntesis y catabolismo de histamina	42
1.7.1.1. <i>Biosíntesis</i>	42
1.7.1.2. <i>Catabolismo</i>	46
• <i>Diamina Oxidasa</i>	46
• <i>Histamina N-metil-transferasa</i>	47
1.7.2. Receptores de histamina	48
1.7.2.1. <i>Receptores HRH1 y mecanismos transductores de señales</i>	48
1.7.2.2. <i>Receptores de HRH2 y mecanismos transductores de señales</i>	51
1.7.2.3. <i>Receptores de HRH3 y mecanismos transductores de señales</i>	53
1.7.2.4. <i>Receptores HRH4</i>	55
1.7.2.5. <i>Receptores Hic</i>	55
1.7.3. Histamina y funciones reproductivas	56
1.7.3.1. <i>Histamina y esteroidogénesis gonadal</i>	57
1.8. Óxido Nítrico	58
1.8.1. Óxido nítrico y esteroidogénesis testicular	60
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	62
3. OBJETIVOS	64

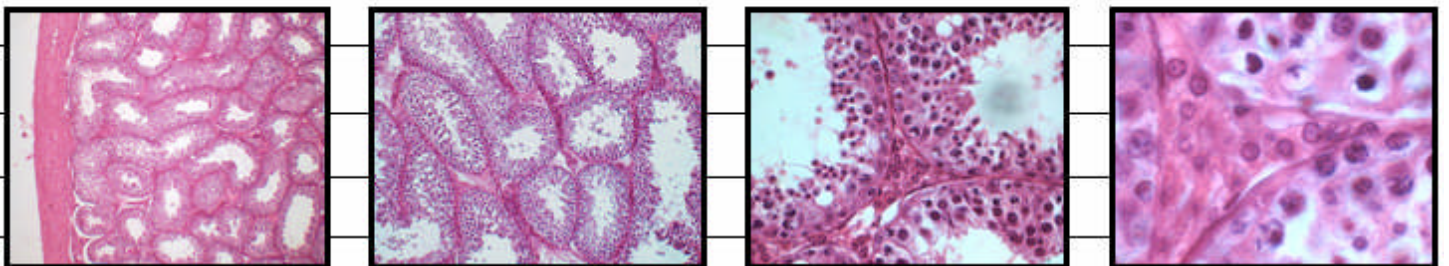
4. MATERIALES Y MÉTODOS	56
4.1. Materiales	56
4.1.1. Reactivos generales	56
4.1.2. Cultivo de células MA-10	67
4.1.2.1. Medios y soluciones	67
4.1.2.2. Material plástico	67
4.1.3. Inhibidores	67
4.1.4. Radiactivos	67
4.1.5. Anticuerpos	68
4.1.6. Reactivos de electroforesis	68
4.1.7. Solventes	69
4.2. Métodos	69
4.2.1. Modelos experimentales	69
4.2.1.1. Línea celular MA-10	69
• Mantenimiento de la línea celular MA-10	71
• Incubación de células MA-10 para los ensayos de respuesta esteroideogénica	73
• Incubación de células MA-10 para la determinación de AMPc intracelular	73
• Incubación de células MA-10 para la determinación de inositoles fosfato	74
• Incubación de células MA-10 para los ensayos de western blot y medición de actividad de las enzimas histidina descarboxilasa (HDC) y óxido nítrico sintasa (NOS)	75
4.2.1.2. Células de Leydig normales de rata	75
• Aislamiento y purificación de células de Leydig de rata	75
• Tinción histoquímica para 3 β -HSD	77
• Incubación de las células de Leydig de rata para los ensayos de respuesta esteroideogénica	77
4.2.2. Ensayos de unión de radioligando para determinar la presencia receptores de HA en células de Leydig	78
4.2.2.1. Ensayos de unión en la línea celular MA-10	79
4.2.2.2. Ensayos de unión en células de Leydig de rata	79
4.2.2.3. Metodología de análisis de los resultados	80
4.2.3. Determinación de esteroides	81
4.2.4. Determinación de AMPc intracelular	82
4.2.5. Medición de inositoles fosfato (IPs)	83
4.2.6. Medición de actividad de óxido nítrico sintasa	83
4.2.6.1. Preparación de extractos celulares	83
4.2.6.2. Determinación de actividad enzimática	84
4.2.7. Ensayos de western blot para evaluar expresión de histidina descarboxilasa	84
4.2.7.1. Preparación de extractos celulares	85
4.2.7.2. Electroforesis en matriz de poliacrilamida	86
4.2.7.3. Revelado de proteínas específicas	87
4.2.8. Ensayo de determinación de actividad de histidina descarboxilasa	87
4.2.8.1. Preparación de extractos celulares	87
4.2.8.2. Determinación de actividad enzimática	87

4.2.9. Inmunocitoquímica para detección de contenido endógeno de HA	88
4.2.10. Determinación de proteínas	89
4.2.11. Determinación de la viabilidad celular mediante exclusión del colorante azul de tripán	89
4.2.11.1. Línea celular MA-10	89
4.2.11.2. Células de Leydig de rata	90
4.2.12. Análisis estadístico	90
5. RESULTADOS	92
5.1. Receptores de histamina en células de leydig	92
5.1.1. Ensayos de unión en la línea celular MA-10	92
5.1.1.1. Ensayos de unión con [³ H]-Pirilamina	92
5.1.1.2. Ensayos de unión con [³ H]-Tiotidina	92
5.1.2. Ensayos de unión en células de Leydig de rata	94
5.1.2.1. Ensayos de unión con [³ H]-Pirilamina	94
5.1.2.2. Ensayos de unión con [³ H]-Tiotidina	94
5.2. Regulación de la esteroidogénesis por histamina en células de Leydig	96
5.2.1. Efecto de HA sobre la esteroidogénesis en la línea celular MA-10	96
5.2.1.1. Efecto de HA sobre la síntesis basal de progesterona	96
5.2.1.2. Efecto de HA sobre la síntesis de progesterona estimulada por hCG	97
5.2.1.3. Efecto de HA sobre la síntesis de progesterona estimulada por un análogo de AMPc	100
5.2.1.4. Recuperación de la respuesta esteroidogénica luego del tratamiento con HA 10 ⁻⁵ M	101
5.2.2. Efecto de HA sobre la esteroidogénesis en células de Leydig de rata	102
5.2.2.1. Efecto de HA sobre la síntesis basal de testosterona	102
5.2.2.2. Efecto de HA sobre la síntesis de testosterona estimulada por hCG	103
5.3. Mecanismo de acción de histamina en células de Leydig	104
5.3.1. Estudio de la posible participación de HRH1 y/o HRH2 en el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis por HA.	104
5.3.1.1. Efecto de agonistas de los subtipos de receptores HRH1 y HRH2 sobre la esteroidogénesis en la línea celular MA-10	104
• Efecto de HT y DIM sobre la síntesis basal de progesterona	105
• Efecto de HT y DIM sobre la síntesis de progesterona estimulada por hCG	106
5.3.1.2. Efecto de agonistas de los subtipos de receptores HRH1 y HRH2 sobre la esteroidogénesis en células de Leydig de rata.	108
• Efecto de HT y DIM sobre la síntesis basal de testosterona	108

• Efecto de HT y DIM sobre la síntesis de testosterona estimulada por hCG	109
5.3.1.3. Efecto de antagonistas de los subtipos de receptores HRH1 y HRH2 sobre las acciones de HA en la línea celular MA-10	110
5.3.2. Estudio de los segundos mensajeros involucrados en el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis por HA.	112
5.3.2.1. Mecanismo de estimulación de la esteroidogénesis: segundos mensajeros asociados a la activación de HRH2.	112
• Dosaje de AMPc intracelular en presencia de DIM 1 μ M	112
• Dosaje de IPs en presencia de DIM 1 μ M	113
5.3.2.2. Mecanismo de inhibición de la esteroidogénesis: segundos mensajeros asociados a la activación de HRH1	115
• Dosaje de IPs en presencia de HT 0,1 μ M	115
• Efecto de U73122, inhibidor de PLC, sobre la regulación de la esteroidogénesis por HT 0,1 μ M	116
• Dosaje de AMPc intracelular en presencia de HT 0,1 μ M	117
5.3.2.3. Segundos mensajeros generados en respuesta a la activación de receptores histaminérgicos por HA.	119
• Dosaje de AMPc intracelular en presencia de HA 10 ⁻⁹ M o HA 10 ⁻⁵ M	119
• Dosaje de IPs intracelular en presencia de HA 10 ⁻⁹ M o HA 10 ⁻⁵ M	120
5.4. El óxido nítrico como mediador de las acciones de HA 10⁻⁵ M sobre las esteroidogénesis en células de Leydig	122
5.4.1. Estudio de la participación de NO en el mecanismo de inhibición de la esteroidogénesis por HA en la línea celular MA-10	122
5.4.1.1. Efecto de L-NAME, inhibidor específico de NOS, sobre las acciones de HA 10 ⁻⁵ M	123
5.4.1.2. Efecto de HA 10 ⁻⁵ M sobre la actividad de NOS.	124
5.4.1.3. Efecto de HA 10 ⁻⁵ M sobre la actividad de las enzimas del camino esteroidogénico	124
5.4.2. Estudio de la participación de NO en el mecanismo de inhibición de la esteroidogénesis por HA en células de Leydig de rata	126
5.4.2.1. Efecto de L-NAME, inhibidor específico de NOS, sobre las acciones de HA 10 ⁻⁵ M	126
5.4.2.2. Efecto de HA 10 ⁻⁵ M sobre la actividad de las enzimas del camino esteroidogénico	127
5.5. Biosíntesis de histamina en células de Leydig	128
5.5.1. Determinación de actividad y expresión de HDC en la línea celular MA-10	129
5.5.2. Detección de contenido endógeno de HA en la línea celular MA-10 y en células de Leydig de rata	130

6. DISCUSIÓN	134
7. CONCLUSIONES GENERALES	143
8. BIBLIOGRAFÍA	146

INTRODUCCIÓN



1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El tracto genital masculino de los mamíferos comprende un conjunto de órganos cuya función principal consiste en la producción de espermatozoides aptos para la fecundación (Figura 1). Dichos órganos se clasifican en tres grupos según su función:

- a) Los testículos, cuya función principal es la producción de espermatozoides y la síntesis de andrógenos, junto con una serie de factores que proveen el medio adecuado para el desarrollo de la espermatogénesis.
- b) Las vías eferentes, constituidas por el epidídimo, el conducto deferente y la uretra. Este sistema está involucrado en el transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides.
- c) Las glándulas sexuales accesorias, que comprenden las vesículas seminales, próstata, glándulas coagulantes y glándulas bulbouretrales, cuyas secreciones constituyen la fracción principal del líquido seminal (Pecci Saavedra y col, 1990).

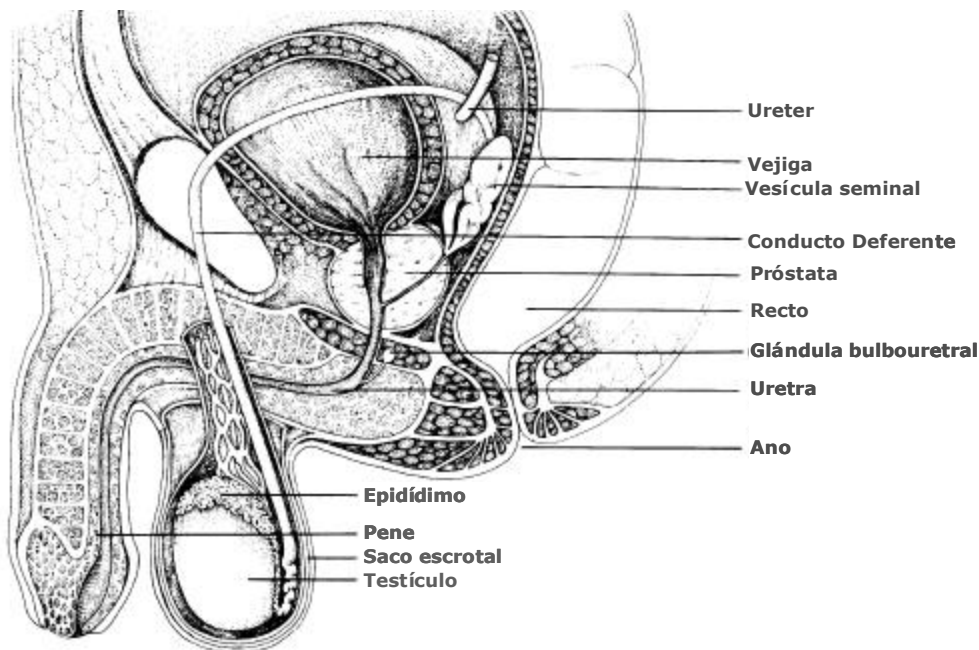


Figura 1: Aparato Reproductor Masculino, vista sagital lateral. Tomado de: Human Anatomy: Organ Systems, Human Male Reproductive System. Pearson Custom Publishing. <http://www.labartlibrary.com/symbiosis/humanatright5.html>

1.2. ENVOLTURAS TESTICULARES

Los testículos de los mamíferos son órganos pares y están ubicados fuera del abdomen, en el saco escrotal, cada uno suspendido por un cordón espermático. El saco escrotal está compuesto de varias capas o túnicas, que constituyen las envolturas testiculares. La capa más superficial es el escroto, una bolsa de piel que es continuación de la pared abdominal y está situada por detrás del pene. La piel escrotal es delgada y está cubierta de pelos. Se adhiere a una capa constituida esencialmente por fibras musculares lisas, denominada túnica dartos, que se extiende como un tabique entre los compartimentos que alojan separadamente a cada testículo (Figura 2).

Bajo la túnica dartos, de cada lado del escroto, se encuentra la fascia espermática externa, cuyas fibras provienen del músculo oblicuo externo del abdomen. Estas fibras son arrastradas por los testículos durante su descenso desde el abdomen hasta los sacos escrotales, al tercer mes de vida intrauterina.

A continuación se encuentra el músculo cremáster, que acompaña al cordón espermático en toda su extensión. Sus fibras provienen del músculo oblicuo interno del abdomen, y son también arrastradas durante el descenso testicular.

Internamente al músculo cremáster se encuentra la fascia espermática interna. La misma tiene la forma de un saco que envuelve al testículo y al cordón espermático. Corresponde a la fascia transversal, procedente del abdomen.

A su vez, la fascia espermática interna recubre la túnica vaginal, una membrana serosa, dentro de la cual se invaginan el testículo y el epidídimo. La túnica vaginal es continuación del peritoneo de la cavidad abdominal, arrastrado por los testículos durante su descenso. Presenta dos hojas: parietal y visceral. La túnica vaginal visceral recubre el testículo directamente (Bouchet y Cuilleret, 1993).

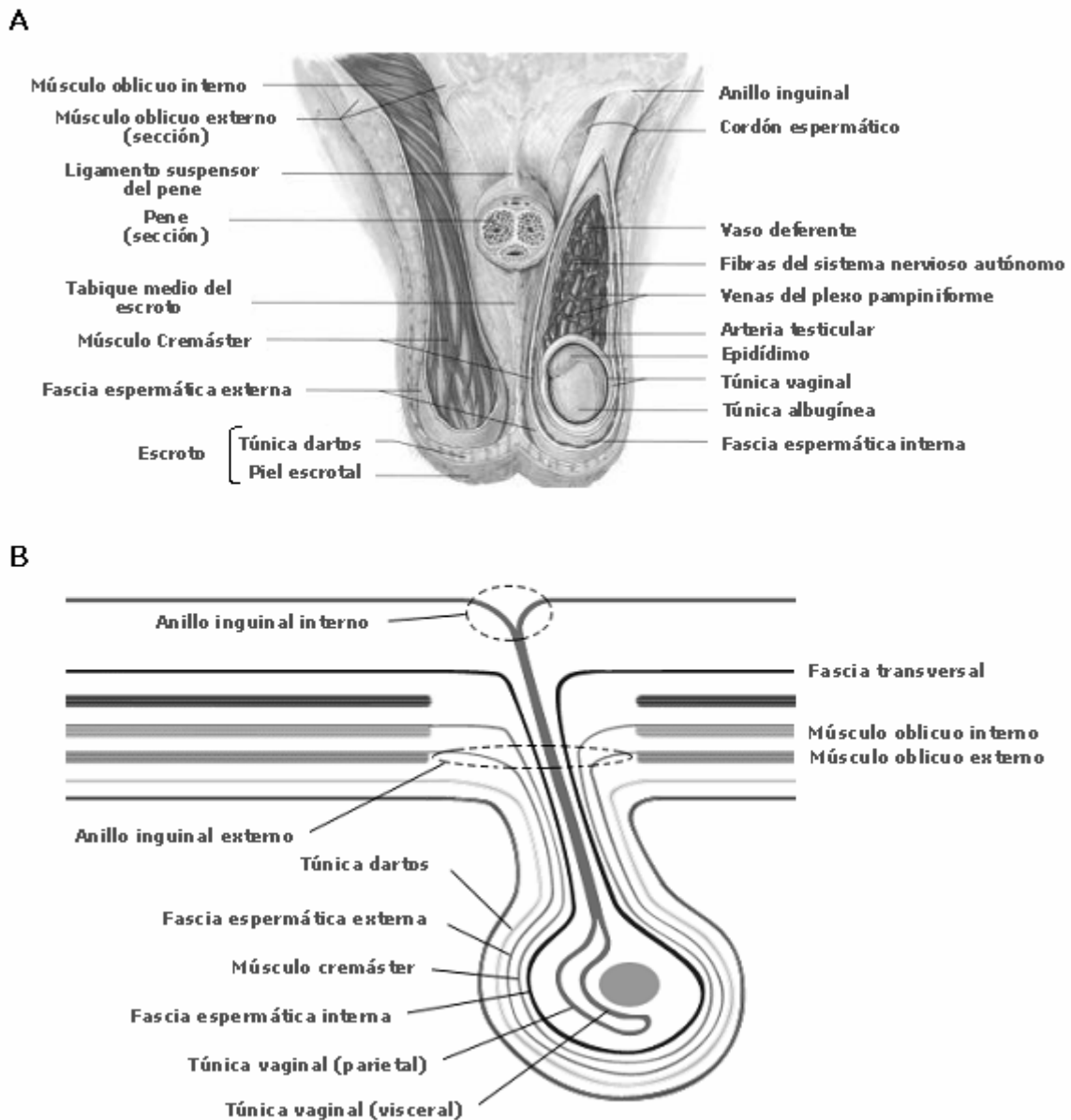


Figura 2: A, Anatomía del testículo y cordón espermático, vista frontal. Tomado de: The male reproductive system. Lecture 22: Anatomy of the male reproductive system. Scrotum and spermatic cord. http://www.pnb.sunysb.edu/hby531/BY32/Lec%2022_00.htm. **B, Descenso del testículo a través del canal inguinal.** La figura muestra el origen de las distintas envolturas testiculares. Tomado de: Descent of Testis in the inguinal canal. Structures in spermatic cord and scrotum. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/meded/grossanatomy/abd/inguinal/text.html>

La túnica dartos y el músculo cremáster se contraen con la exposición a temperaturas bajas, y confieren en esas ocasiones un aspecto más arrugado al escroto. Esta respuesta hace que los testículos se ubiquen más cerca del cuerpo, donde absorben calor corporal y mantienen una temperatura ligeramente inferior a la del abdomen. Cuando aumenta la temperatura, los músculos se relajan, haciendo que los testículos caigan lejos del cuerpo. Así, las envolturas que componen el saco escrotal aseguran a la gónada una temperatura constante, ideal para la producción de espermatozoides (Pecci Saavedra y col, 1990).

1.3. IRRIGACIÓN E INERVACIÓN DEL TESTÍCULO

La irrigación e inervación del testículo llegan a través del cordón espermático (Figura 3). La irrigación procede de la arteria testicular, también llamada arteria espermática interna, que nace de la aorta por debajo de la arteria renal. El drenaje venoso se realiza a través del plexo pampiniforme (Figuras 2 y 3), una red compleja que rodea la muy contorneada arteria testicular. Toda la estructura (red venosa y arteria) es llamada el "cono vascular testicular". En el cono vascular testicular, la sangre arterial es refrigerada a medida que el calor es transferido de la arteria a la vena en un sistema clásico de transferencia de calor contra-corriente (Kastelic y col, 2000). Este mecanismo, sumado al descrito anteriormente para la túnica dartos y el músculo cremáster, contribuye a la regulación de la temperatura testicular.

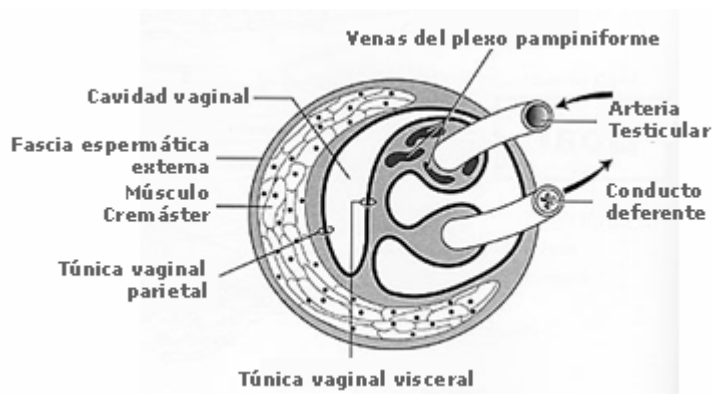


Figura 3: Diagrama del cordón espermático. Tomado de: Male Anatomy. Male reproductive system. Handout 2. Structure and Function of the Reproductive System of the Bull, Boar and Stallion. http://www.wisc.edu/ansci_repro/lec/lec3/lec3diag.html

Los vasos testiculares se acompañan por un plexo de nervios autonómicos que se origina en el plexo periaórtico (plexo espermático) y vasos linfáticos que terminan en ganglios linfáticos aórticos.

1.4. TESTÍCULO PROPIAMENTE DICHO-CONSTITUCIÓN ANATÓMICA

La túnica albugínea o cápsula testicular, cubierta propia del testículo, es una membrana fibrosa y firme de tejido conectivo denso. Las capas más superficiales están formadas por haces apretados de fibras colágenas, que se van haciendo algo menos densos hacia la profundidad. A este nivel, el tejido conectivo de la cápsula se convierte en tejido conectivo laxo, por donde circulan vasos sanguíneos (túnica vascular).

En la cápsula del testículo humano se encuentran también fibras musculares lisas, que ofrecen una razonable explicación anatómica para la demostrada capacidad de contracción de la albugínea. Estas contracciones, que tienen un carácter rítmico, proveen una acción de bombeo, posiblemente para el transporte de los espermatozoides dentro del testículo donde no han adquirido aún movilidad propia. Ello recién ocurrirá en el epidídimo.

En el borde posterior del testículo, la túnica albugínea presenta un engrosamiento denominado cuerpo de Highmore (o mediastino testicular), en cuyo espesor se encuentra una red de conductillos espermáticos denominada red testicular. Del vértice del cuerpo de Highmore parten en dirección radial tabiques conectivos más o menos incompletos, que dividen al órgano en lobulillos. Estos tabiques interlobulillares llevan elementos vasculares y nerviosos (Figura 4).

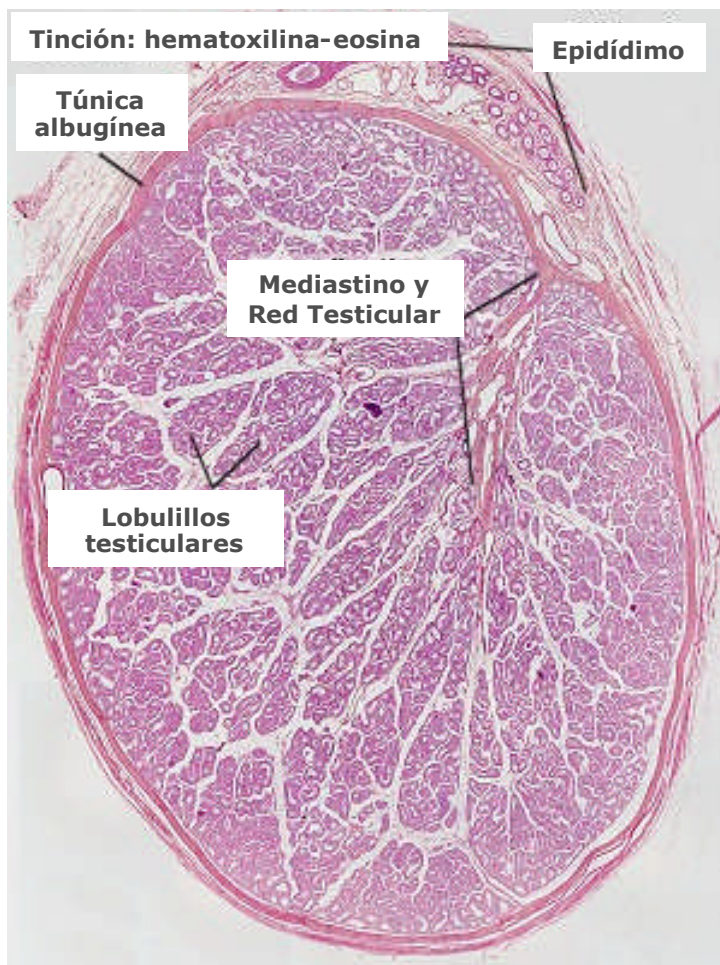


Figura 4: Corte histológico de testículo, vista general. Tomado de: Blue Histology - Male Reproductive System. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/MaleRepro/malerepro.html>

En el interior de los lobulillos se encuentra el parénquima testicular, constituido por dos compartimentos: uno no vascularizado, compuesto por una serie de túbulos seminíferos a lo largo de cuyas paredes se forman los espermatozoides, y un compartimento intersticial, altamente vascularizado, donde se producen los andrógenos (Pecci Saavedra y col, 1990).

1.4.1. ORGANIZACIÓN DE LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

Entre un 70 y 80 por ciento del volumen del testículo está compuesto por los túbulos seminíferos. Éstos están formados por una pared externa o pared tubular que está recubierta interiormente por un epitelio seminífero, estratificado y complejo, que se dispone en varias capas (Figura 5). Dos estirpes celulares, de diferente origen embriológico, componen este epitelio: las células germinales y las células de Sertoli.

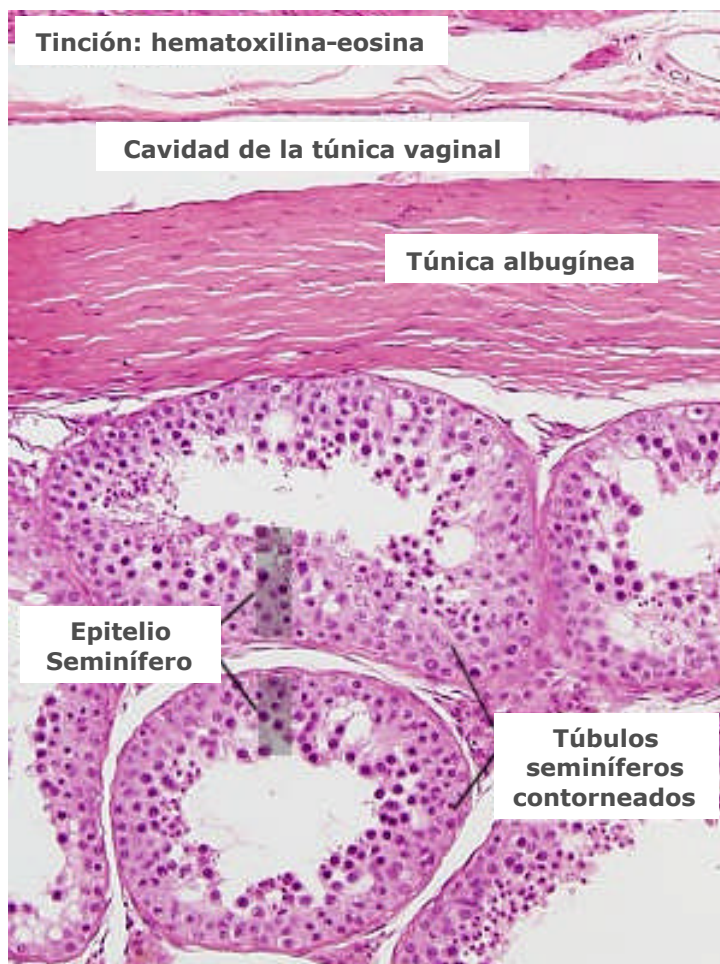


Figura 5: Corte histológico de testículo mostrando los túbulos seminíferos. Tomado de: Blue Histology - Male Reproductive System. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/MaleRepro/malerepro.html>

Las células de Sertoli son grandes elementos columnares que descansan sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, y extienden sus ramificaciones citoplasmáticas filamentosas hacia la luz de los mismos (Figura 6). Entre células de Sertoli vecinas existen especializaciones de sus membranas que constituyen zonas de unión densa. La existencia de estas uniones estrechas, sumada a la presencia de una capa de células musculares lisas o mioideas, constituye la llamada barrera hemato-testicular. Ésta limita el transporte de fluido y determinadas moléculas del espacio intersticial al lumen tubular, creando un medio característico dentro del túbulo. Así, el líquido en la luz de los túbulos seminíferos es diferente del plasma sanguíneo y del líquido intersticial en su composición, lo cual es necesario para el óptimo desarrollo de la espermatogénesis.

Las células germinales se disponen entre las proyecciones de las células de Sertoli: las espermatogonias indiferenciadas se hallan cerca de la membrana basal, mientras los espermatocitos y las espermátides avanzadas se disponen en los niveles más altos, cerca de la luz tubular. Esta organización sitúa a las espermatogonias y espermatocitos jóvenes por fuera de la barrera hematotesticular, en el compartimiento basal, mientras que los espermatocitos maduros y espermátides se encuentran en el compartimiento periluminal. Así, la barrera no sólo actúa limitando el pasaje de sustancias al lumen tubular, sino que también aísla a la gameta masculina haploide que no es reconocida como propia por el sistema inmune.

Otras funciones han sido atribuidas a las células de Sertoli. Se ha demostrado que dichas células son capaces de sintetizar una proteína ligadora de andrógenos, que permitiría a los túbulos acumular estas sustancias y obtener localmente altas concentraciones de las mismas, requeridas para llevar a cabo la espermatogénesis. Además, las células de Sertoli son capaces de reabsorber y transformar a los cuerpos residuales, a algunas espermátides y a la mayor parte de los elementos del epitelio en degeneración, por lo que se considera que estas células realizan un verdadero proceso de fagocitosis.

Así, las células de Sertoli cumplen funciones tróficas, de sostén y de regulación o sincronización de la espermatogénesis (Pecci Saavedra y col, 1990).

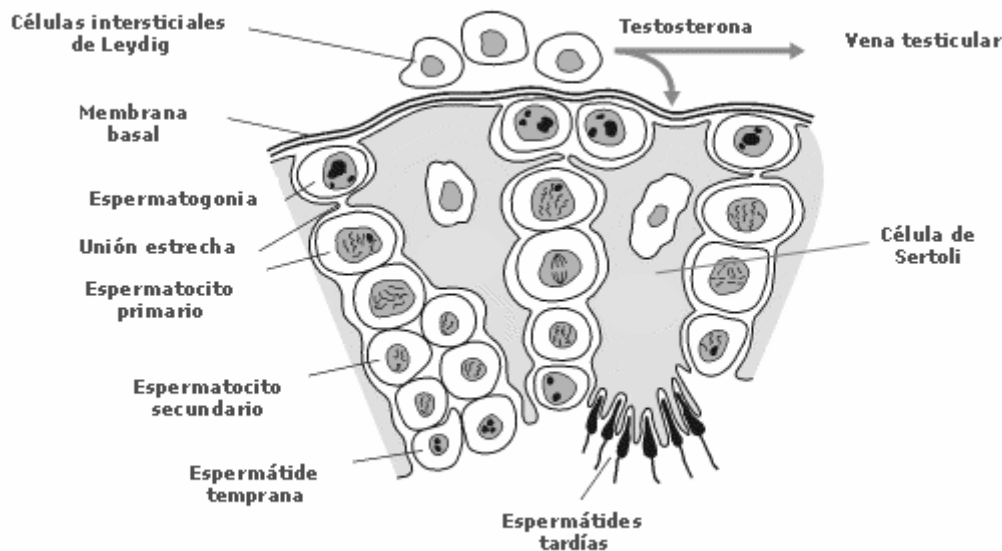


Figura 6: Diagrama de la organización estructural de los túbulos seminíferos en el hombre. Tomado de: The Gonad, Testicular Function. Endocrinology: An Integrated Approach. Nussey, S.S. and Whitehead, S.A. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, LTD; 2001.

1.4.2. ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO INTERSTICIAL

El compartimiento intersticial está constituido por una malla irregular de tejido conectivo laxo, que llena los espacios entre los túbulos seminíferos y contiene numerosos vasos sanguíneos y linfáticos, y los nervios del testículo. Alberga también a las células de Leydig, además de otros tipos celulares a los que se hace referencia más adelante.

Las células de Leydig constituyen una población celular de importancia en este compartimiento. Son responsables de la producción de andrógenos, necesarios para el normal desarrollo de la espermatogénesis, el trofismo de todo el tracto reproductor masculino, y el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios en el hombre adulto. Se encuentran generalmente agrupadas en forma de cúmulos (Figura 7) rodeando los vasos sanguíneos (de

Kretser y Kerr, 1994). Esta organización histológica es consistente con su función endocrina, ya que la asociación cercana entre las células de Leydig y los vasos en un tejido altamente irrigado facilita el pasaje de los esteroides sintetizados a la circulación.

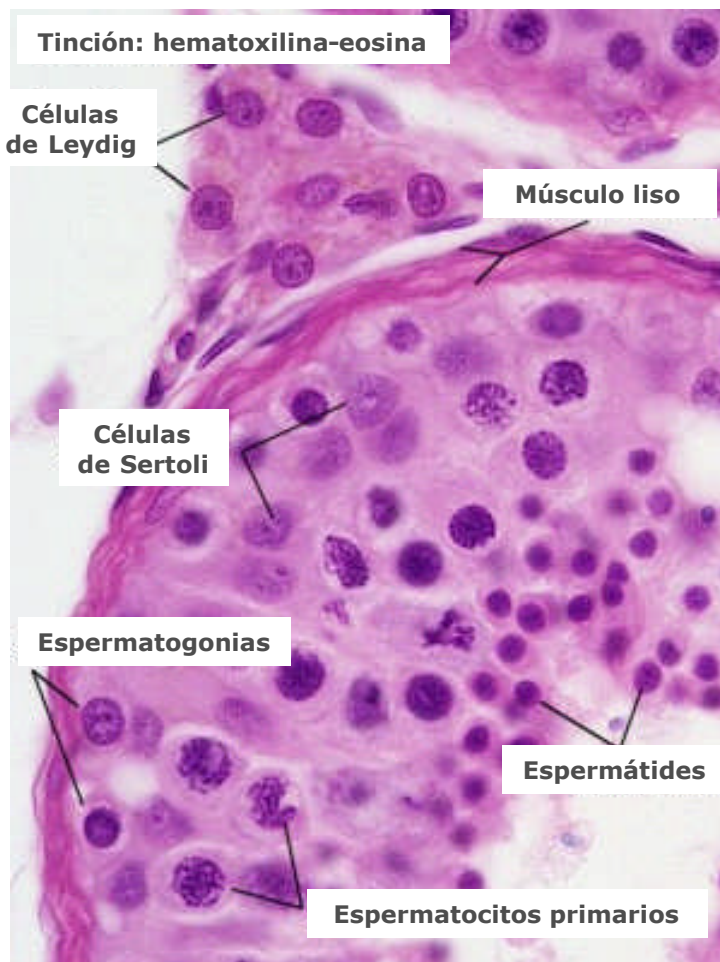


Figura 7: Corte histológico de testículo mostrando el epitelio seminífero y las células de Leydig intersticiales. Tomado de: Blue Histology - Male Reproductive System. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/MaleRepro/malerepro.html>

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 paracrinos del desarrollo y mantenimiento de las funciones testiculares.

Con respecto a los mastocitos, la presencia de este tipo celular en el tracto reproductivo masculino sigue una distribución específica de especie (de Kretser y Kerr, 1994). En hámsters, primates superiores y humanos, el número de mastocitos testiculares aumenta durante la pubertad, y se mantiene en la adultez (Frungeri y col, 2000; Nistal y col, 1984;). En la rata, la concentración de histamina (HA) testicular, eventualmente proveniente de los mastocitos, es considerablemente más elevada en las gónadas de ratas prepúberes que en las gónadas de animales adultos (Zieher y col, 1971; Gaytan y col, 1992). En cualquier caso, los mastocitos se localizan generalmente rodeando los vasos sanguíneos, por lo que se ha sugerido que podrían cumplir un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo al testículo (Gaytan y col, 1990). Más aún, se ha reportado la existencia de proximidad anatómica entre mastocitos y fibras catecolaminérgicas en testículo de primates superiores, por lo que también se ha propuesto que los mastocitos podrían ser blanco de acción de señales neuronales y así regular la función y desarrollo testicular (Frungeri y col 2000).

Como se indicó previamente, la concentración de HA testicular es considerablemente más elevada en las gónadas de ratas prepúberes, donde predominan células de Leydig inmaduras, que en las gónadas de animales adultos. Esto último es consistente con la presencia de factores inhibitorios de la proliferación de mastocitos en el intersticio de ratas adultas, pero no de ratas prepúberes. Al respecto, se ha reportado que dichos factores podrían ser producidos por las células de Leydig, una vez que éstas han completado su diferenciación (Gaytan y col, 1990).

En ausencia de células de Leydig diferenciadas, se ha observado proliferación y diferenciación de precursores de mastocitos y precursores de células de Leydig en testículo de rata, sugiriendo que podrían existir factores regulatorios comunes para ambos tipos celulares (Gaytan y col, 1992). En este sentido, se ha reportado aumento del número de mastocitos testiculares

durante la recuperación de la función gonadal después de un daño extensivo (de Kretser y Kerr, 1983).

En conjunto, las evidencias sugieren que los mastocitos presentes en el testículo podrían cumplir una función importante en la regulación de la fisiología del órgano.

Los mastocitos testiculares han sido también asociados a diversas condiciones patológicas. Se ha reportado aumento en el número de mastocitos en pacientes infértiles con azoospermia idiopática, azoospermia obstructiva y varicocele (Yamanaka y col, 2000). También se ha observado un incremento en el número de mastocitos y en la degranulación de los mismos en el intersticio testicular de ratas adultas bajo condiciones de estrés (Tuncel y col, 1996).

A pesar de lo expuesto, el papel preciso de los mastocitos testiculares en condiciones fisiológicas y/o patológicas no ha sido aún dilucidado.

1.5. REGULACIÓN DEL EJE HIPOTALÁMO-HIPÓFISO-TESTICULAR

La función testicular está regulada fundamentalmente por dos hormonas de la hipófisis anterior, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Figura 8). LH es secretada a la circulación general en forma pulsátil, al igual que FSH, si bien los pulsos de esta última son de menor intensidad. La pulsatilidad de ambas depende a su vez de otra hormona que llega de la eminencia media por la circulación portal-hipofisaria: la hormona liberadora de gonadotrofinas (Gn-RH). Gn-RH es un decapeptido producido en las neuronas hipotalámicas, que se une a receptores específicos calcio-dependientes en sus células blanco y estimula la secreción de LH y FSH. Las neuronas hipotalámicas productoras del péptido están reguladas a su vez por numerosos neurotransmisores, como catecolamina, serotonina, aminoácidos y

neuropéptidos opioides. Todos ellos son intermediarios de centros cerebrales superiores, del sistema límbico, o la corteza cerebral. El hipotálamo actúa en consecuencia, como lugar de integración, intermediación, y /o amplificación de estímulos hormonales entre centros superiores que regulan la función testicular inferior.

LH se une a los receptores específicos en la membrana de las células de Leydig, estimulando la esteroidogénesis. Por su parte, FSH se une a receptores específicos en las células de Sertoli y estimula, junto con la testosterona sintetizada por las células de Leydig, la producción de la proteína ligadora de andrógenos. Como se describió previamente, esta proteína permite la acción los andrógenos sobre el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis. Además, las células de Sertoli producen otros factores dependientes de FSH que actúan regulando el proceso espermatogénico y/o la funcionalidad de las células de Leydig.

El testículo ejerce a su vez un control de retroalimentación negativa sobre la secreción de LH, FSH y GnRH, que se mantiene por acción de sustancias esteroideas y no esteroideas (Figura 8). Entre las primeras se incluye principalmente la testosterona. Entre las sustancias no esteroideas se considera básicamente la inhibina, glicoproteína sintetizada por las células de Sertoli. Testosterona actúa sobre la hipófisis y el hipotálamo, mientras que inhibina actúa selectivamente a nivel hipofisario, regulando la producción de FSH (Pecci Saavedra y col, 1990).

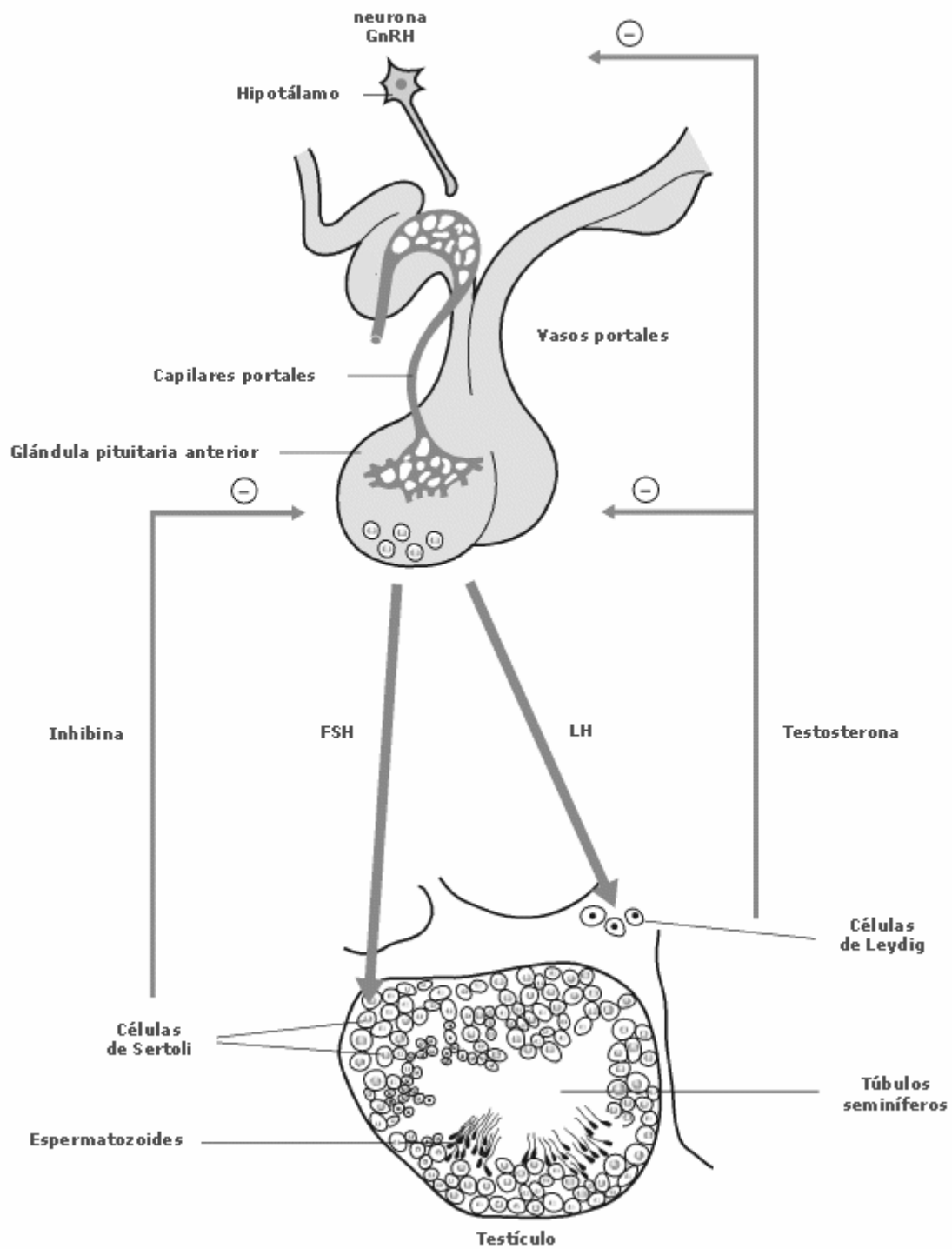


Figura 8: Diagrama de la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-testicular. LH: hormona luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante, GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas. Tomado de: The Gonad, Control of testicular function. Endocrinology: An Integrated Approach. Nussey, S.S. and Whitehead, S.A. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, LTD; 2001.

1.6. BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES EN CÉLULAS DE LEYDIG

Como se describió previamente, la función principal de las células de Leydig es la secreción de andrógenos en forma regulada, siendo el más importante la testosterona. La síntesis de andrógenos involucra la conversión de colesterol, precursor obligado de todas las hormonas esteroideas, en testosterona, mediante una serie de pasos enzimáticos que se describen más adelante.

El colesterol utilizado proviene principalmente de depósitos citoplasmáticos (gotas lipídicas), que son depletados durante períodos de activa esteroidogénesis (Christensen, 1975). El colesterol puede provenir de lipoproteínas plasmáticas, de la síntesis *de novo*, y de las reservas de colesterol intracelular, en forma de ésteres, que mantienen los niveles de colesterol libre (sin esterificar) en valores aceptables para la célula (Hall, 1994). La importancia relativa de estas fuentes como precursores esteroidogénicos varía según el tejido, la especie y el grado de estimulación de la producción de esteroides. Por ejemplo, en las células adrenales la proporción de colesterol derivado de lipoproteínas plasmáticas es mucho mayor respecto de las células de Leydig (Vahouny y col, 1985; Bartke, 1971), así como también lo es la proporción de colesterol en forma esterificada.

1.6.1. CAMINO ESTEROIDOGÉNICO

La figura 9 muestra los pasos enzimáticos involucrados en la síntesis de testosterona en células de Leydig. El primer paso del camino (etapa limitante) consiste en la conversión de colesterol (C27) a pregnenolona (C21) y aldehído-isocaproico. La reacción está catalizada por la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol, dependiente de citocromo P450 (P450_{scc}, denominación actual: CYP11A). CYP11A se localiza en la membrana interna mitocondrial,

orientada hacia la matriz (Shikita y Hall, 1973). El grupo hemo de CYP11A está involucrado en el mecanismo catalítico de la enzima, que consiste en el reemplazo de un hidrógeno del sustrato por un grupo hidroxilo, y el clivaje del esteroide en tres reacciones consecutivas, que demandan tres moléculas de oxígeno y tres moléculas de NADPH. La primera reacción es una hidroxilación en C22, seguida de una hidroxilación en C20 para producir 20,22R-hidroxicolesterol, que es luego clivado entre C22 y C20 para formar pregnenolona. Las tres reacciones son catalizadas por la misma enzima en un único sitio activo, que requiere un sistema de transferencia de electrones mitocondrial, adrenoxina y adrenoxina reductasa, para transportar electrones desde el NADPH a CYP11A y al oxígeno molecular (Porter y Coon, 1991; Payne y Hales, 2004).

La pregnenolona formada abandona rápidamente la mitocondria debido a la adquisición del grupo hidroxilo, que produce fuerzas de repulsión muy fuertes con el sitio activo hidrofóbico de la enzima. Así, las reacciones subsiguientes involucradas en la formación de testosterona tienen lugar en el citoplasma, catalizadas por enzimas microsomales. La formación de testosterona puede ocurrir a través de la vía Δ^4 o Δ^5 (según el esteroide tenga un doble enlace en la posición 4 o 5, respectivamente). La vía preponderante depende de la especie y del período de desarrollo. Así, la vía Δ^5 predomina en conejos, cerdos, humanos y primates superiores, mientras que la Δ^4 es predominante en ratas y ratones (Saez, 1994).

La conversión de los 3β -hidroxi- Δ^5 -esteroides de la vía Δ^5 en 3 -ceto- Δ^4 -esteroides de la vía Δ^4 ocurre por un mecanismo de deshidrogenación del grupo 3β -hidroxilo, seguido por la isomerización de los dobles enlaces entre los carbonos 5 y 6, a los carbonos 4 y 5. Esta reacción requiere de NAD^+ como cofactor (Payne y Hales, 2004), y es catalizada por la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^4/Δ^5 -isomerasa (3β -HSD). Dado que 17α -

hidroxipregnenolona no es un intermediario liberado al medio, es probable que la conversión de Δ^5 a Δ^4 ocurra predominantemente a nivel de pregnenolona o dehidroepiandrosterona (Saez, 1994).

En ambas vías, los esteroides C_{21} son metabolizados a esteroides C_{19} por acción de la enzima 17α -hidroxilasa/ 17 - 20 liasa, dependiente de citocromo P450 (P450c17, denominación actual: CYP17). Pregnenolona es convertida en dehidroepiandrosterona en la vía Δ^5 , mientras que en la vía Δ^4 , progesterona es convertida en androstenodiona. El proceso de formación de estos esteroides C_{19} involucra dos reacciones: 17α -hidroxilación y ruptura del enlace C_{17} - C_{20} , ambas catalizadas por CYP17 en el retículo endoplasmático liso, con requerimiento de NADPH, oxígeno molecular y un sistema de transferencia de electrones microsomal (Payne y O'Shaughnessy, 1996).

Finalmente, la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) cataliza la conversión de androstenodiona (esteroide inactivo) en testosterona (esteroide activo), en una reacción de reducción que requiere NADPH como cofactor. La reacción es reversible, y son las concentraciones de sustrato y producto las que regulan su dirección (Payne y Hales, 2004).

En la mayoría de las especies, la testosterona es el andrógeno producido en mayor cantidad. Sin embargo existen vías de metabolización de esta hormona: 17β -HSD cataliza la conversión de testosterona en androstenodiona, 5α -reductasa cataliza la formación de dehidrotestosterona, y P450-aromatasa cataliza la aromatización de los andrógenos androstenodiona y testosterona, a estrona y estradiol, respectivamente (Saez, 1994).

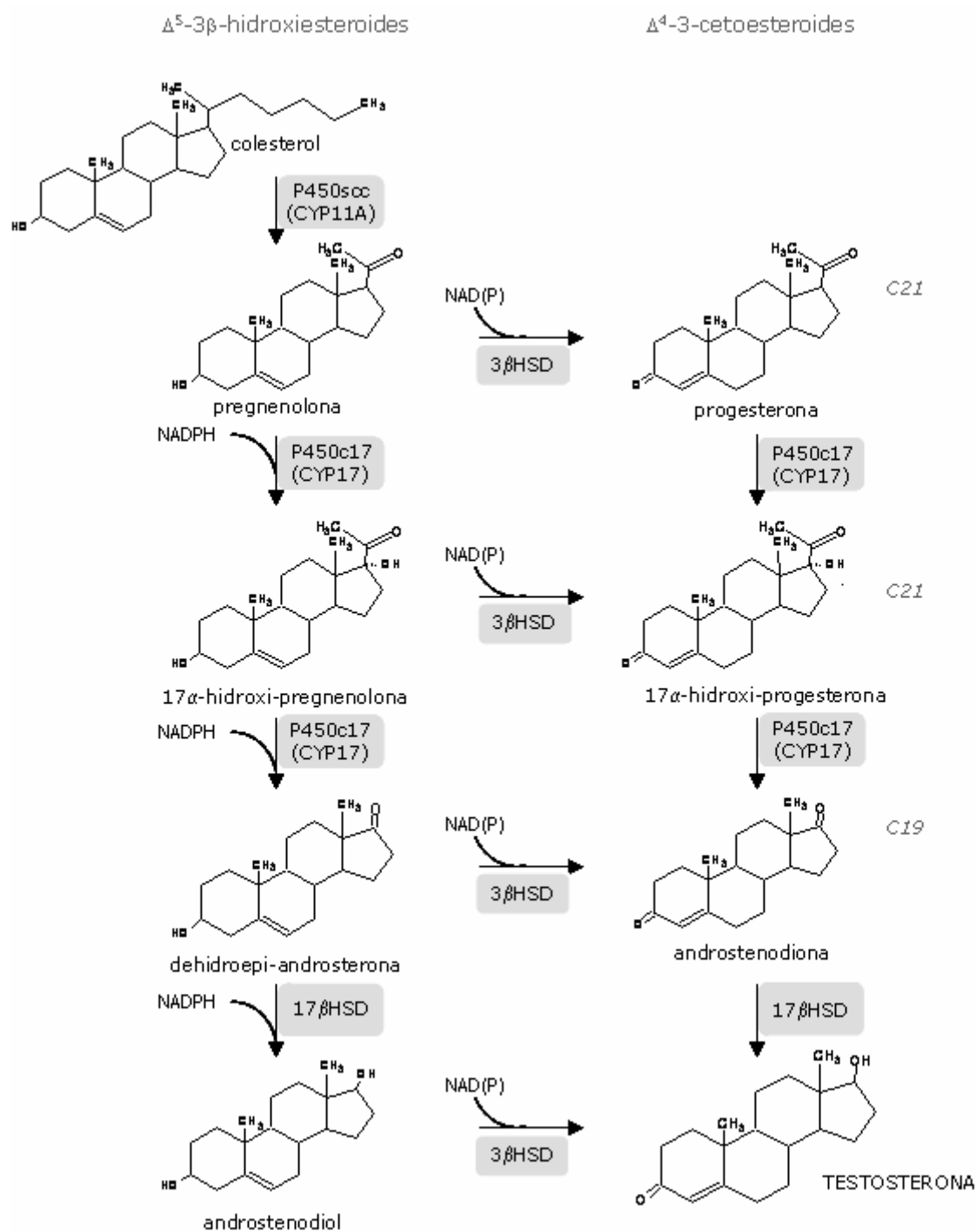


Figura 9: Biosíntesis de Testosterona en células de Leydig. **P450scc (CYP11A):** enzima que escinde la cadena lateral de colesterol, dependiente de citocromo P450, **3 β HSD:** 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^5/Δ^4 isomerasa, **P450c17 (CYP17):** 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa, dependiente de citocromo P450, **17 β HSD:** 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

1.6.2. REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS DE LEYDIG POR LA HORMONA LUTEINIZANTE

LH, secretada por la hipófisis anterior en respuesta a LHRH hipotalámica, llega a través del torrente sanguíneo al intersticio del testículo y se une a receptores específicos en la membrana de las células de Leydig. El receptor de LH pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, que presentan siete dominios transmembrana y una región citoplasmática rica en aminoácidos serina y treonina, susceptibles de ser fosforilados (Ascoli y Segaloff, 1989). El receptor de LH también reconoce con alta afinidad a la gonadotropina coriónica humana (hCG), secretada por la placenta.

Las proteínas G constan de tres subunidades denominadas α , β y γ , cuya conformación y funcionalidad cambian de acuerdo a la naturaleza del nucleótido de guanina (GDP o GTP) unido. La proteína conocida como G estimuladora (G_s) es la responsable del acoplamiento del receptor de LH/hCG a la enzima adenilato ciclasa (AC). En el estado inactivo, la subunidad α de esta proteína está unida a GDP, y asociada al dímero $\beta\gamma$. Cuando LH/hCG se une a su receptor, la proteína G se activa al intercambiar el nucleótido GDP por GTP, lo cual provoca un cambio conformacional en la proteína y el heterotrímero se disocia. Así, la subunidad α unida a GTP interactúa con AC, produciéndose un aumento en los niveles de AMPc a partir de ATP (Figura 10). A su vez, la proteína G se autorregula, ya que tiene actividad GTP-asa. Al hidrolizar el GTP unido, pierde afinidad por AC y se separa de ella, dejándola inactiva (Marinissen y Gutkind, 2000).

El AMPc producido actúa como segundo mensajero en respuesta a la estimulación hormonal: una vez liberado, se une a las subunidades regulatorias de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), liberándose a su vez las subunidades catalíticas. Así, se activa la función catalítica de PKA, que fosforila

proteínas celulares específicas (Podestá y col, 1976). La fosforilación de estas proteínas conduce directa o indirectamente a un aumento en la síntesis de andrógenos (Hipkin y col, 1991; Hansson y col, 2000). Este mecanismo se detiene al degradarse el AMPc por acción de diversas fosfodiesterasas (Soderling y Beavo, 2000) (Figura 10).

Además de AMPc, se ha propuesto la participación de otros segundos mensajeros en la respuesta de las células de Leydig a gonadotrofinas (Cooke, 1996; Stocco y col, 2005).

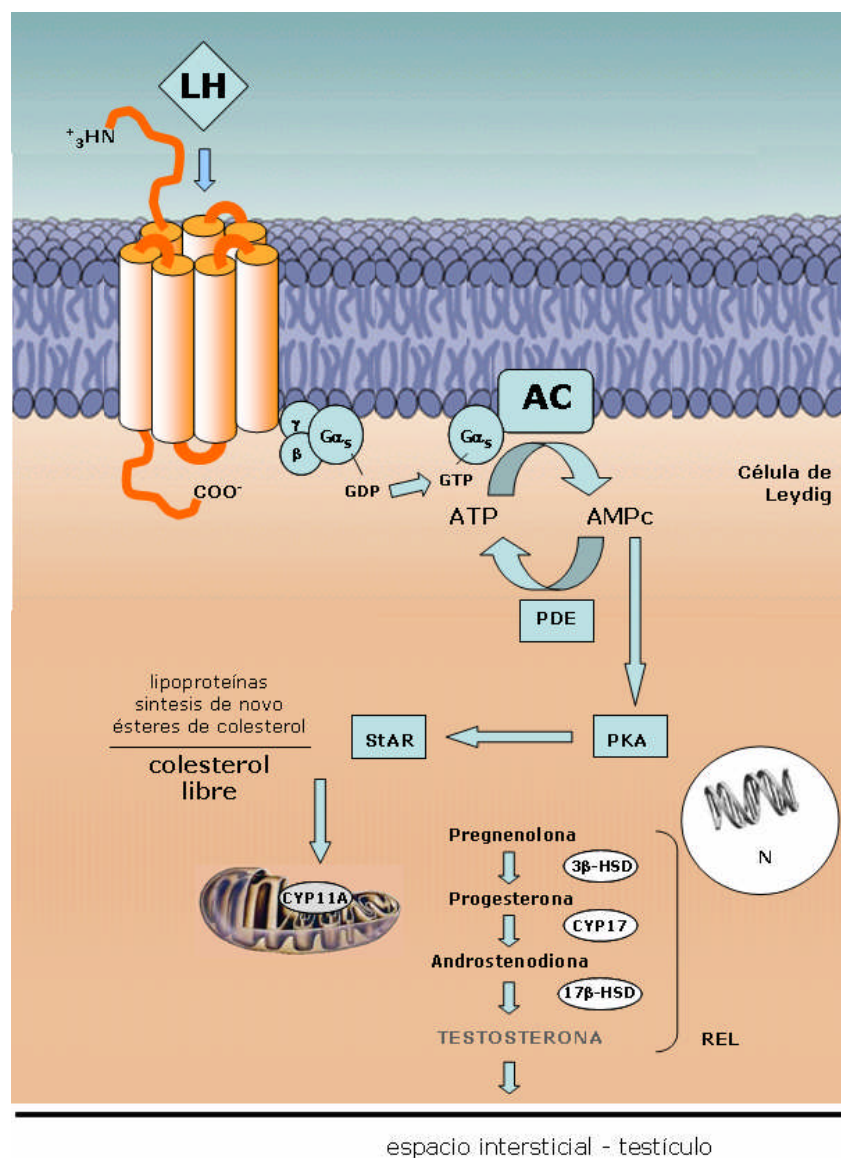


Figura 10: Mecanismo de transducción de la señal de la hormona luteinizante en células de Leydig. **LH:** hormona luteinizante, **AC:** adenilato ciclasa, **G α_s :** subunidad alfa de la proteína G estimuladora, **PKA:** proteína quinasa dependiente de AMPc, **StAR:** proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, **PDE:** fosfodiesterasa, **CYP11A:** enzima que escinde la cadena lateral del colesterol, dependiente de citocromo P450, **3 β HSD:** 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^5/Δ^4 isomerasa, **CYP17:** 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa, dependiente de citocromo P450, **17 β HSD:** 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, **N:** núcleo, **REL:** retículo endoplasmático liso.

1.6.2.1. Respuesta esteroidogénica a LH en función del tiempo

Pueden distinguirse dos tipos de respuesta de las células de Leydig a LH/hCG en función del tiempo:

- a) un efecto agudo, que ocurre desde los primeros minutos de exposición a la hormona.
- b) efectos tardíos, diferentes al efecto agudo, que se observan horas después de la activación.

Efecto agudo

El principal efecto agudo de todas las hormonas esteroidogénicas (durante por lo menos las primeras 4 horas) consiste en una estimulación de los mecanismos de transporte de colesterol hacia la mitocondria, donde se encuentra la enzima CYP11A (Figura 10) (Privalle y col, 1983). Al respecto, se ha demostrado que LH/hCG estimula la síntesis de proteínas involucradas directa o indirectamente en dicho transporte, como la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). En este sentido, StAR cumple una función indispensable para la biosíntesis de esteroides (Stocco y Clark, 1996; Stocco, 1997; Stocco, 2001).

Por otra parte, el tratamiento agudo con LH/hCG no modifica la actividad de las enzimas del camino esteroidogénico (Hall, 1994).

Efectos tardíos

A tiempos más largos, la LH/hCG aumenta la síntesis *de novo* de al menos algunas de las enzimas del camino esteroidogénico. La principal enzima que ha demostrado responder a este tipo de regulación es CYP11A (Anderson y Mendelson, 1985; Anakwe y Payne, 1987). También se ha descrito en la

mayoría de las especies estudiadas que LH/hCG aumenta la expresión de los genes que codifican para las enzimas 3β -HSD y CYP17 (Keeney y Mason, 1992; Payne y Sha, 1991).

1.6.3. REGULACIÓN LOCAL DE LA ESTEROIDOGÉNESIS TESTICULAR

Como se indicó previamente, el factor trófico fundamental para la esteroidogénesis en las células de Leydig es la LH hipofisaria. Sin embargo, existen evidencias que indican que las diversas poblaciones celulares del testículo pueden ejercer una sutil regulación (regulación fina) sobre la síntesis de esteroides testiculares (Lejeune y col, 1996).

La población de macrófagos testiculares alcanza el 20 % de las células intersticiales. Estas células secretan factor de necrosis tumoral de tipo α (TNF- α), interleuquina-1 (IL-1) y óxido nítrico (NO), todos ellos capaces de modular negativamente la esteroidogénesis (Del Punta y col, 1996; Bornstein y col, 2004). Por otra parte, los macrófagos serían también capaces de estimular la producción de andrógenos, mediante la secreción de un factor lipofílico que actuaría por un camino distinto al de LH/hCG (Lukyanenko, 1998). Más aún, se ha reportado que la presencia de macrófagos es esencial para el normal desarrollo de la esteroidogénesis *in vivo* (Hales, 2002).

Por su parte, factores secretados por las células de Sertoli, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante tipo α (TGF- α), la inhibina, la activina y el factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β) entre otros, también modularían la respuesta de las células de Leydig a LH (Saez, 1994).

Con respecto a los mastocitos, éstos serían fuente generadora de HA, pero se ha reportado que también pueden sintetizar NO y $TNF\alpha$ (Gordon y Galli, 1990; Bidri y col, 1997).

Finalmente, no puede descartarse que algunos de estos factores puedan ser producidos por las mismas células de Leydig, ejerciendo una regulación de tipo autocrina sobre la síntesis de esteroides.

Sin duda, la existencia de estas interacciones celulares locales, capaces de modular la acción gonadotrófica, provee un eficiente mecanismo para regular la fisiología testicular, evitando la generación de respuestas de tipo todo o nada y permitiendo a la glándula responder en forma fina y ajustada a los distintos estímulos.

1.7. HISTAMINA

HA es una de las biomoléculas más pequeñas, con un peso molecular de 111 Dalton. Sin embargo, es de los compuestos más estudiados, dada su enorme importancia en biología y medicina. Hasta el momento, se han identificado al menos 23 funciones fisiológicas de HA. Dichas funciones comprenden procesos tan diversos como la contracción muscular, la secreción gástrica, la neurotransmisión, la inmunomodulación o la proliferación celular. Llamativamente, todas las reacciones biológicas inducidas por la amina dejan la estructura química de la misma totalmente inalterada. Así, la versatilidad de la molécula radica en su capacidad de establecer interacciones débiles, pero altamente específicas, que no generan ruptura de los enlaces covalentes entre los átomos que la componen (Noszál y col, 2004).

1.7.1. BIOSÍNTESIS Y CATABOLISMO DE HISTAMINA

1.7.1.1. Biosíntesis

HA es una molécula hidrofílica compuesta por un anillo imidazólico y un grupo amino, unidos por dos grupos metileno. La formación de HA en el organismo ocurre en un solo paso: el aminoácido L-histidina sufre descarboxilación, en una reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC) (Schayer y Reilly, 1975) (Figura 11).

HDC de mamíferos es dependiente de piridoxal fosfato (PF). Se trata de una proteína de 662 aminoácidos en el humano y ratón, y de 665 aminoácidos en la rata. El porcentaje de homología entre las tres secuencias aminoacídicas es elevado: 92% en la región amino-terminal, y 70% en la región carboxilo-terminal. Asimismo, el peso molecular estimado de las tres enzimas es similar (74 KDa), y todas sufren modificación post-traducciona para formar

subunidades maduras menores (53-54 kDa). Estas últimas actúan como homodímeros en la mayoría de las células. El dominio de unión a PF incluye un residuo de lisina en la posición 305 o 307, que está conservado en las tres HDC de mamíferos.

Se han llevado a cabo numerosos experimentos para comparar la actividad, formación y localización de las proteínas de 74 kDa y 53-55 kDa en el humano, ratón y rata. Utilizando un sistema de expresión *in vitro*, pudo detectarse expresión de las dos formas de HDC recombinante humana, cada una con diferente localización subcelular. Para ambas formas, la actividad fue similar a la de las proteínas nativas purificadas. Se observaron resultados semejantes para HDC recombinante murina utilizando el mismo sistema de expresión, pero en este caso la forma de 74 kDa mostró menor actividad enzimática que la de 53 kDa. Por el contrario, estudios en macrófagos murinos (línea celular RAW 264.7) indicaron que la única forma activa es la de mayor peso molecular, con actividad basal e inducible. En la rata, ambas proteínas poseen actividad enzimática. La forma de 74 kDa se localiza en el citosol, mientras que la forma procesada, de menor peso molecular, se localiza en el lumen del retículo endoplasmático (RE). Se asume que la forma de 74 kDa se sintetiza en el citosol y se trasloca al lumen del RE, donde es convertida en la forma de 53 kDa.

Sobre la base de estas evidencias, la regulación del procesamiento de HDC y de la actividad de las formas de 74 kDa y 53 kDa sería célula y tejido-específica. A esto se suma la compleja regulación de la expresión del gen de HDC a nivel transcripcional.

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 **P**rolina, **Á**cido Glutámico, **S**erina y **T**reonina) en los extremos carboxilo y amino terminal, pero sólo la región del extremo amino terminal estaría involucrada en el proceso de degradación proteolítica dependiente de ATP. También se ha demostrado la existencia de otro mecanismo de degradación de la enzima, independiente de ATP, que involucra la cisteín-proteasa m-calpaína. Esta última ha sido implicada en la proteólisis de diversas proteínas del citoesqueleto. 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).

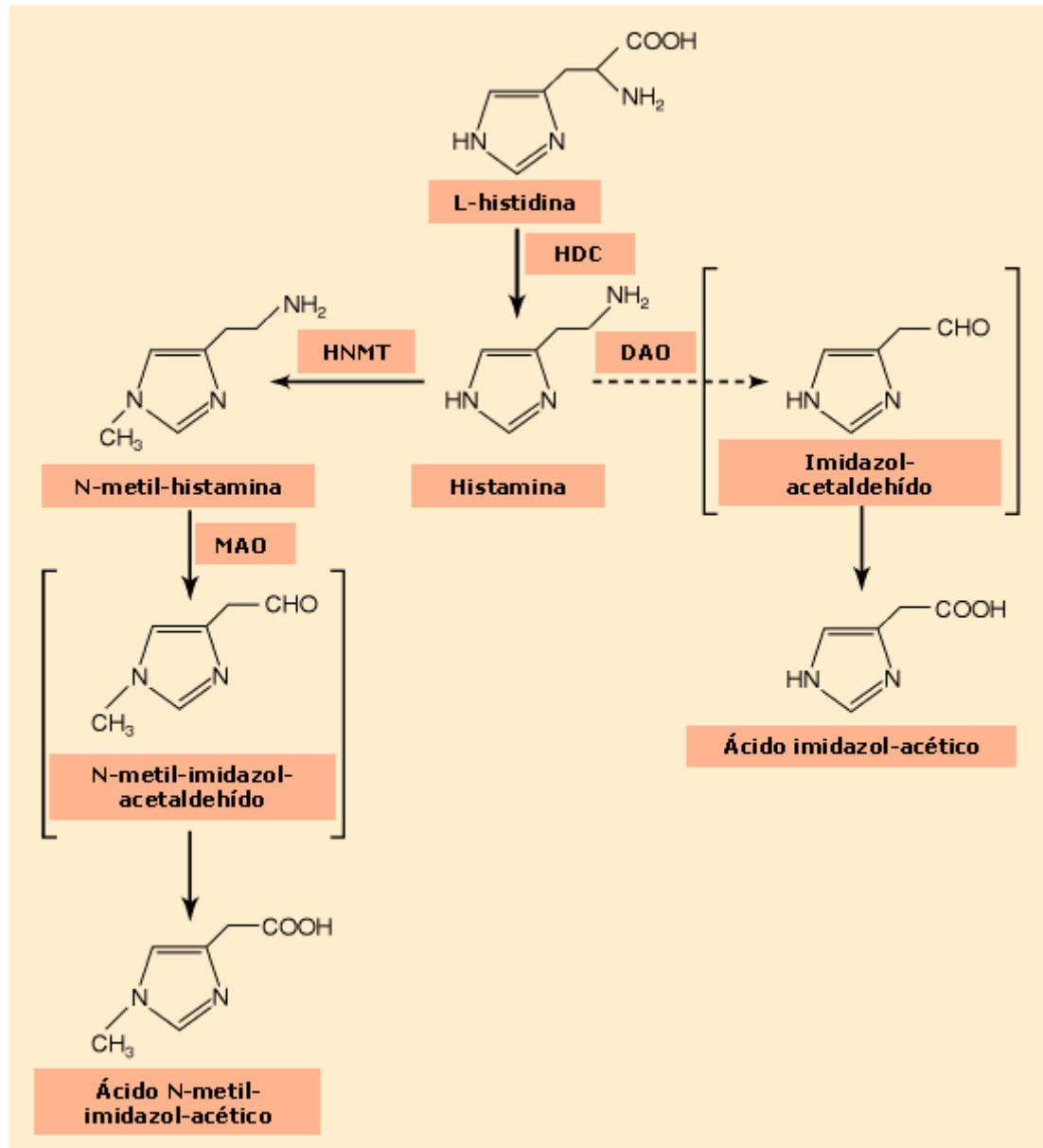


Figura 11: Biosíntesis y catabolismo de HA. **HDC:** L-histidina descarboxilasa, **HNMT:** histamina N-metil transferasa, **DAO:** diamina oxidasa, **MAO:** monoamina oxidasa. Tomado de: **Histamine: A Messenger Molecule Within and Outside of the Nervous System.** En: Siegel GJ, Agranoff BW, Fisher SK, Wayne AR, Uhler MD (eds.) Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. Sexta edición. Filadelfia. Lippincott, Williams and Wilkins, 1999.

1.7.1.2. Catabolismo

Diamina Oxidasa

Una de las mayores vías de catabolización HA es la desaminación oxidativa directa, realizada predominantemente por la enzima diamina oxidasa (DAO), conduciendo al ácido imidazol acético (Figura 11).

Si bien DAO tiene altísima afinidad por HA, la enzima también cataliza la desaminación oxidativa de otras diaminas, como 1,4-diaminobutano (putrescina), 1,5-diaminopentano (cadaverina) y 1,6-diaminohexano. Espermidina, una poliamina, es también sustrato de DAO.

DAO es miembro de una clase de enzimas agrupadas bajo el nombre de cobre-amino-oxidasas. Estas enzimas son proteínas compuestas por subunidades homodiméricas, con pesos moleculares comprendidos entre 70 y 125 KDa. Además de Cu^{++} , su estructura contiene un cofactor unido al sitio activo (2, 4, 5-trihidroxifenilalanina quinona o topa quinona).

La expresión de DAO está restringida a ciertas células o tejidos. Se han encontrado niveles elevados de DAO en intestino y placenta de todas las especies estudiadas hasta el momento. También se ha reportado importante expresión de DAO en riñón de diversas especies, incluyendo el hombre, cerdo, caballo, perro y gato.

Hasta el momento, la función más importante que se atribuye a DAO es la detoxificación de la HA ingerida en la dieta, proceso que ocurre en el tracto intestinal. Si la ingestión de HA u otras aminas biogénicas es muy elevada, la enzima se satura, dando lugar a enfermedades como histaminosis o intolerancia alimentaria (Schwelberger, 2004).

Histamina N-metil transferasa

Otra importante vía de catabolismo de HA consiste en la metilación del nitrógeno pirrólico, por acción de la enzima histamina-N-metil transferasa (HNMT) (Figura 11). A diferencia de DAO, HNMT es una enzima altamente específica constituida por dos dominios, entre los cuales se forma una hendidura que constituye el bolsillo de unión de HA.

Se ha reportado actividad y expresión de HNMT en numerosos tejidos de mamíferos. En el hombre, se han encontrado niveles elevados de expresión de HNMT en hígado y riñón. Además, se ha detectado expresión de la enzima en bazo, próstata, ovario, intestino, y médula espinal. Así, mientras que DAO presenta un patrón de expresión restringido, HNMT es una enzima de distribución ubicua.

Estudios bioquímicos y estructurales indican que HNMT es una proteína citosólica, responsable de la inactivación de HA a nivel intracelular. La expresión ubicua de HNMT sugiere que la metilación de HA representa una ruta catabólica importante en los múltiples tipos celulares que deben lidiar con la amina. En contraste, DAO es producida y secretada por un número limitado de tipos celulares en tejidos específicos, y funcionaría como un removedor de HA y otras diaminas a nivel extracelular. 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).

1.7.2. RECEPTORES DE HISTAMINA

HA ejerce sus efectos a través de receptores específicos en la membrana de células blanco, designados HRH1, HRH2, HRH3 y HRH4. Los tres primeros han sido ampliamente caracterizados, mientras que el significado fisiológico de HRH4 no ha sido aún dilucidado. También se ha propuesto la existencia de un quinto receptor de HA, de localización intracelular (Hic) (Igaz y Hegyesi, 2004).

1.7.2.1. Receptores HRH1 y mecanismos transductores de señales

HRH1 fue el primer receptor de HA en ser caracterizado. Las respuestas más relevantes mediadas por este receptor incluyen la contracción muscular, la vasodilatación y el aumento en la permeabilidad vascular. HRH1 está íntimamente ligado a procesos inflamatorios y alérgicos. Ha sido identificado en una amplia variedad de tejidos y órganos, incluyendo cerebro, pulmón, tracto gastrointestinal, sistema genitourinario, sistema cardiovascular, médula adrenal, endotelio y varios tipos celulares del sistema inmunológico.

Recientemente, se han desarrollado ratones noqueados (KO) para el gen de HRH1. Estos ratones son viables y fértiles, pero presentan alteraciones en sus respuestas inmunológicas y algunos aspectos de su conducta, además de motricidad reducida. Estos resultados permiten afirmar que HRH1 estaría involucrado en múltiples acciones de HA.

HRH1 pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Es una proteína de 491 aminoácidos, y presenta siete pasos transmembrana. Mediante mutagénesis dirigida pudo demostrarse que el tercer y quinto dominio transmembrana serían responsables de la unión del ligando. A su vez, se identificó la región involucrada en el acople a la proteína G. La misma corresponde al tercer rulo intracelular (Figura 12). Esta región está altamente

conservada entre los distintos receptores acoplados a proteínas G, incluyendo HRH2 (Igaz y Hegyesi, 2004).

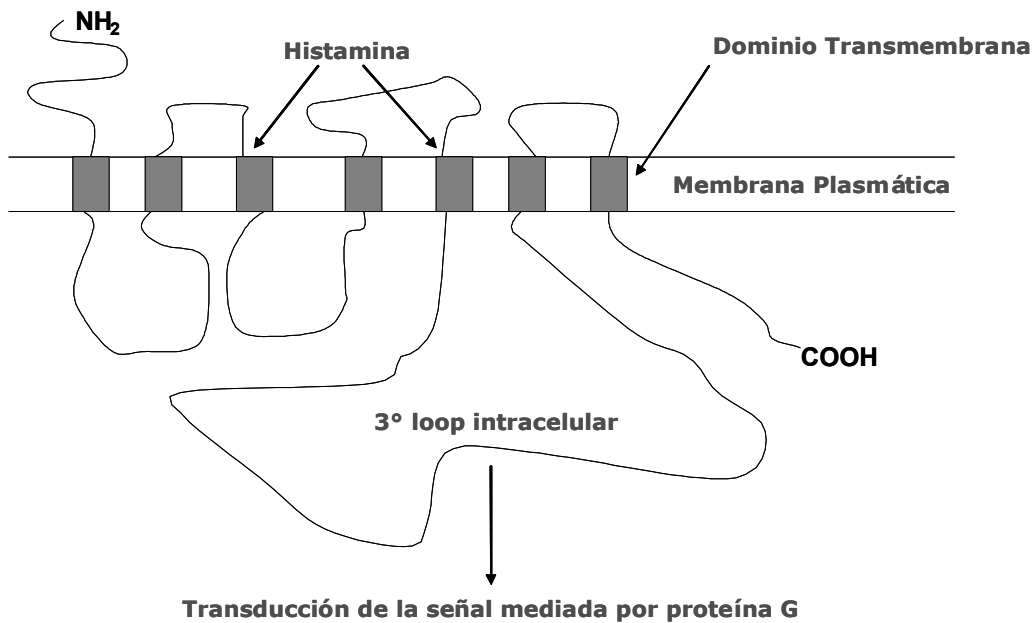


Figura 12: Representación esquemática de los receptores histaminérgicos de membrana. Tomado de: **Histamine receptors: H1, H2, H3, H4, and the putative "Hic" (intracellular) receptor. Coding genes and gene products, "in silico" and experimental data.** En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), *Histamine: Biological and Medical aspects.* SpringMed publishing Ltd; 2004: 71.

En la mayoría de los tejidos estudiados, la unión de HA a HRH1 activa la enzima fosfolipasa C (PLC), a través de una proteína G insensible a toxina pertussis de la familia de las proteínas $G_{q/11}$. PLC luego hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) en dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), y el diacilglicerol (DAG). IP_3 media rápidamente la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, y como evento secundario, aumenta el ingreso de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Esto último tiene un efecto de retroalimentación positiva sobre PLC, e induce una segunda fase de degradación de fosfoinosítidos, generándose más IP_3 . DAG activa una

serina/treonina kinasa, la proteína quinasa C (PKC), que puede a su vez fosforilar y activar otros factores y proteínas celulares.

Además de la vía de señalización antes descrita, la unión de HA a HRH1 puede conducir a la activación de caminos de transducción secundarios adicionales, en la mayoría de los casos como consecuencia del aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Al respecto, HA puede activar la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) mediante un mecanismo dependiente del complejo Ca^{2+} /calmodulina (Ca^{2+} /CaM). El incremento en los niveles de óxido nítrico conduce a la activación de la enzima guanilato ciclasa (GC) en varios tipos celulares, con la consecuente formación de guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Lázár-Molnár, 2004).

Otro camino de señalización intracelular activado por HA a través de HRH1 involucra la formación de metabolitos de ácido araquidónico (AA) fisiológicamente activos, como consecuencia de la activación de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂). En particular, se ha reportado incremento en los niveles de prostaglandina E₂, prostaciclina y/o tromboxano A₂ en respuesta a la activación de HRH1 en células endoteliales humanas en cultivo (Bull y col, 1991; Bull y col, 1992; Resink y col, 1987), como también en fibroblastos (Niisato N y col, 1996) y plaquetas (Murayama y col, 1990).

La activación de HRH1 también puede conducir a un incremento en los niveles intracelulares de AMPc. En la mayoría de los tejidos HRH1 no activa directamente a AC, sino que potencia la respuesta generada por otros factores (HA actuando a través de HRH2, adenosina ó péptido intestinal vasoactivo). PKC y Ca^{2+} intracelular han sido implicados en este tipo de respuesta. Por otra parte, en otros casos HRH1 estimula directamente la formación del segundo mensajero. Al respecto, en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con cDNA de HRH1 bovino o de cobayo, la estimulación del

receptor no sólo potenció la respuesta de las células a forskolina (FSK), sino que también aumentó los niveles basales de AMPc (Lázár-Molnár, 2004).

También se ha reportado que la activación de HRH1 puede conducir a una disminución en los niveles de AMPc. Al respecto, en la línea de astrocitoma humano 1321N1, agonistas HRH1 atenuaron la producción de AMPc inducida por isoprenalina. Este mecanismo no involucraría acople del receptor a una proteína G_i , inhibidora de la actividad AC. Más bien, la movilización de Ca^{2+} intracelular generada en respuesta a la activación de HRH1 conduciría a la activación de una fosfodiesterasa dependiente del complejo Ca^{2+}/CaM (Hill y col, 1997).

Recientemente se han identificado otros elementos involucrados en la transducción de la señal a través de HRH1, como el factor nuclear Kappa B ($NF-\kappa B$), importante factor de transcripción en la regulación de la respuesta inmune, procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes (Bakker y col, 2001). Además, se ha reportado que HA activa la cascada de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) en células CHO transfectadas con cDNA de HRH1 bovino, ejerciendo un efecto estimulador sobre la expresión de genes tempranos como *c-fos* (Megson y col, 2001).

1.7.2.2. Receptores HRH2 y mecanismos transductores de señales

La existencia de un único receptor de HA no permitía explicar los efectos de la amina sobre músculo cardíaco y secreción gástrica. Por lo tanto se propuso la existencia de un nuevo subtipo de receptor, designado HRH2.

HRH2 pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, y presenta siete dominios hidrofóbicos transmembrana. Es una proteína de 359 aminoácidos en perro y humano, y 358 aminoácidos en la rata (Igaz y Hegyesi, 2004).

Numerosos trabajos reportan el acople de HRH2 a AC, a través de una proteína G_s . Así, la activación de HRH2 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) y células CHO transfectadas con cDNA de HRH2 humano, canino o de rata (Lázár-Molnár, 2004). El AMPc actúa como segundo mensajero activando PKA, que fosforila proteínas celulares específicas.

Además de estimular la producción de AMPc, la activación de HRH2 en células parietales gástricas indujo movilización de Ca^{2+} e incremento en los niveles de IP_3 , debidos probablemente a la activación de PLC. Se observaron efectos similares en células de leucemia promielocítica humana (HL-60) y en células de hepatoma (HEPA) transfectadas con cDNA de HRH2 canino. 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 HRH2. Así, se ha sugerido que HRH2 activaría AC a través de una proteína G_s , y PLC a través de otra proteína G, posiblemente de la familia G_q , que aún no ha sido caracterizada. El significado fisiológico de este fenómeno es hasta el momento desconocido. Por otro lado, en células CHO transfectadas con cDNA de HRH2 humano, agonistas HRH2 no tuvieron efecto sobre la producción de inositoles fosfato o la movilización de Ca^{2+} , argumentándose que el acople de HRH2 a dicha vía de transducción sería célula y/o tejido específico.

La activación de HRH2 ha estado también asociada a otros eventos de señalización intracelular. En células CHO transfectadas con cDNA de HRH2 de rata, la activación de HRH2 conduce a la inhibición de PLA2, y la consecuente disminución de la liberación de AA, independientemente de los niveles intracelulares de AMPc y Ca²⁺. Esto último se contrapone al efecto de HRH1 sobre la liberación de AA, y podría explicar, al menos en parte, las respuestas fisiológicas opuestas inducidas por HRH1 y HRH2 en muchos tejidos (Lázár-Molnár, 2004).

Recientemente, se ha reportado que HA regula la vía de MAPK a través de HRH2 en la línea celular de carcinoma pancreático humano (PANC-1) (Cricco y col, 2004). En concordancia con estos resultados, en células embrionarias de riñón humano (HEK-293) transfectadas con cDNA de HRH2 humano, HA estimula la transcripción de los genes *c-fos* y *c-jun*, mediante un mecanismo que involucra la activación de PKC y las MAPK ERK1/ERK2 en el primer caso, y ERK1/ERK2 y JNK en el segundo. Así, la activación de HRH2 en dichas células conduce a un aumento de la proliferación celular (Wang y col, 2000).

1.7.2.3. Receptores HRH3 y mecanismos transductores de señales

La idea de la existencia de receptores HRH3 surgió con el objetivo de explicar las propiedades farmacológicas atípicas que presentaba el receptor responsable de controlar la liberación de HA a nivel del sistema nervioso central. HRH3 modula también la liberación de otros neurotransmisores, como acetilcolina, dopamina, glutamato, norepinefrina y serotonina, tanto en el sistema nervioso central como periférico.

Los mecanismos moleculares que siguen a la activación de HRH3 no han sido totalmente caracterizados aún. Numerosas evidencias indican que HRH3 pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, la mayoría de las cuales indican acople a $G_{i/o}$. Al respecto, se ha demostrado que la activación de HRH3 inhibe la estimulación de AC inducida por FSK. En preparaciones de cerebro de rata, HA a través de HRH3 regula su propia síntesis, mediante un mecanismo que involucra la vía AC/PKA.

Resultados obtenidos a partir de ensayos de unión de radioligando y ensayos funcionales han provisto evidencia de la existencia de subtipos HRH3, identificados hasta el momento en humano y rata. Se han encontrado al menos tres isoformas de HRH3 (HRH3A, HRH3B, HRH3C) de rata, diferencialmente acopladas a la inhibición de AC dependiente de G_i , o a la estimulación de ERK1/ERK2. Al respecto, la activación de HRH3A tendría un efecto menos pronunciado sobre la inhibición de la producción de AMPc que la activación de HRH3B o HRH3C, mientras que se observa lo opuesto sobre la estimulación de MAPK. La distribución heterogénea de las isoformas y sus propiedades de señalización intracelular específicas indica que la regulación de la expresión de dichas isoformas puede ser importante para las funciones sensoriales, endocrinas y cognitivas del cerebro.

La presencia de HRH3 no está restringida al sistema nervioso central. Mediante ensayos de unión de radioligando, se han identificado sitios de unión a HRH3 en otras células y tejidos periféricos, aunque son cuantitativamente menos abundantes que los sitios de unión a HRH1 y HRH2. En el tracto gastrointestinal, HRH3 media la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios (acetilcolina) o inhibitorios (norpinefrina, 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).

1.7.2.4. Receptores HRH4

El cuarto receptor de HA, HRH4, ha sido descubierto recientemente utilizando estrategias moleculares. Se trata de un receptor acoplado a proteína G, estrechamente relacionado con HRH3, tanto desde el punto de vista estructural (85% de homología de secuencia en la región transmembrana) como farmacológico.

Diversos trabajos indican que HRH4 pertenece a la familia de receptores acoplados a G_i . Sin embargo, en ensayos con distintas líneas celulares transfectadas con cDNA de HRH4, HA no moduló los niveles intracelulares de AMPc, incluso bajo condiciones en las que otros receptores acoplados a G_i mostraron actividad. Esto sugiere que se requieren investigaciones adicionales para identificar en forma precisa las proteínas G que interactúan con HRH4. Por otra parte, no puede descartarse la existencia de isoformas de HRH4 con acople diferencial a distintos caminos de transducción, a pesar de que no existen evidencias a favor de ello aún.

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).

1.7.2.5. Receptores Hic

En 1985, Brandes y colaboradores propusieron la existencia de sitios de unión a HA de localización intracelular (Brandes y col, 1985). Estos sitios recibieron el nombre de receptores Hic. Más aún, dada la capacidad de los mismos de unir tamoxifeno, así como otro antiestrogéno, el N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi] etanamina (DPPE), Brandes y colaboradores sugirieron que

DPPE podría actuar como antagonista de la unión de HA a Hic (Brandes y col, 1985). En 1993, se propuso que HA sintetizada *de novo* podría ejercer algunos de sus efectos, como la estimulación de la proliferación celular, actuando a través de estos receptores (Brandes y LaBella, 1993). En este sentido, los mismos fueron identificados en núcleo y cromatina de hepatocitos de rata, como así también en fracción microsomal (Brandes y col, 1998).

A pesar de lo expuesto, la existencia de receptores Hic no ha sido ampliamente aceptada, dado que los numerosos intentos de clonado no han tenido éxito hasta el momento (Igaz y Hegyesi, 2004).

1.7.3. HISTAMINA Y FUNCIONES REPRODUCTIVAS

En los últimos años, diversos trabajos han descripto la participación de HA en funciones reproductivas.

Con respecto al ciclo menstrual, HA jugaría un papel importante en la dinámica del desarrollo folicular y el proceso de ovulación. Al respecto, se ha reportado que HA induce vasodilatación de la arteria ovárica justo antes de la expulsión del óvulo (Schmidt y col, 1990). En ovinos, HA de origen uterino actuaría localmente modulando la secreción de prostaglandinas, importantes para la ocurrencia del proceso luteolítico (Salamonsen y Findlay, 1990).

A su vez, HA cumpliría múltiples funciones durante etapas específicas de la preñez, siendo necesaria para la implantación del blastocisto y la regulación del flujo sanguíneo placentario. Al respecto, se ha propuesto que HA de origen uterino activaría receptores HRH2 en el embrión temprano para iniciar el proceso de implantación (Zhao y col, 2000). A su vez, el embrión estimularía la secreción de HA por parte del útero materno mediante la síntesis de un factor llamado factor liberador de HA embrionario (EHRF) (Cocchiara y col, 1992).

Respecto de las funciones reproductivas masculinas, experimentos en cuerpo cavernoso humano han permitido demostrar que HA es capaz de inducir erección peneana (Cara y col, 1995). A su vez, la amina tendría influencia sobre la conducta sexual, actuando a nivel del sistema nervioso central (Pap, 2004).

También se ha sugerido que HA podría cumplir un papel importante en la maduración del testículo. Al respecto, Pap y colaboradores reportaron que ratones KO para el gen de HDC (HDC^{-/-}) adultos y prepúberes presentan testículos más pequeños que los ratones de genotipo salvaje (Pap y col, 2002).

Finalmente, no se descarta un posible papel de HA como modulador del proceso espermatogénico, dadas las evidencias que sugieren que los espermatozoides podrían sintetizar la amina (Safina y col, 2002).

1.7.3.1 Histamina y esteroidogénesis gonadal

Existe escasa bibliografía acerca de una posible función de HA como modulador local de la esteroidogénesis gonadal.

Se ha reportado que HA estimula la síntesis de estradiol en células de granulosa humanas en cultivo, de manera dependiente de la concentración. Dicho efecto estaría mediado por receptores HRH1 (Bodis y col, 1993). A su vez, HA estimuló la producción de progesterona en folículos preovulatorios de rata, actuando a través de HRH2 (Schmidt y col, 1987).

Por su parte, Mayerhofer y colaboradores demostraron que HA es capaz de estimular la producción de testosterona y progesterona en parénquima testicular de hámster inmaduro, presumiblemente actuando a través de receptores HRH1 (Mayerhofer y col, 1989). También se ha reportado alteración

de la esteroidogénesis en ratones HDC^{-/-}, aunque estas observaciones constituyen sólo evidencias indirectas de un posible efecto de HA sobre la síntesis de esteroides testiculares (Pap y col, 2002).

1.8. ÓXIDO NÍTRICO

NO es un radical libre inorgánico, gas a temperatura ambiente, capaz de difundir libremente a través de las membranas biológicas. Las funciones biológicas más estudiadas en las cuales interviene el NO incluyen la regulación del tono vascular (Ignarro y col, 1987), la transmisión neuronal (Bredt y Snyder, 1989; Dawson y Snyderl, 1994) y la respuesta inmune (Bogdan, 2001; Moncada y col, 1991). Sin embargo, en los últimos años se ha detectado la presencia de NO en casi todos los tipos celulares estudiados y sus acciones se han extendido ampliamente, abarcando la regulación de las funciones renal (Pallone y Mattson, 2002), ósea (Van 't Hof y Ralston, 2001), gastrointestinal (Jaiswal y col, 2001), uterina (Cameron y Campbell, 1998), y del espermatozoide (Herrero y Gagnon, 2001), entre otras.

La síntesis de NO es catalizada por una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOSs), constituida hasta el momento por tres isoformas ampliamente caracterizadas: la NOS neuronal (nNOS o NOS I), la endotelial (eNOS o NOS III), y la inducible (iNOS o NOS II). Las distintas isoformas son codificadas por genes localizados en diferentes cromosomas, y presentan diferencias respecto a su localización, regulación y propiedades catalíticas.

nNOS fue identificada por primera vez en neuronas (Bredt y Snyder, 1990). La enzima se expresa constitutivamente en dichas células, y se localiza tanto en citosol como asociada a membranas. Su actividad es dependiente de Ca²⁺/CaM. eNOS se identificó por primera vez en células endoteliales, y está

asociada a membranas. La expresión de eNOS es constitutiva, y su actividad también es dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Pollock y col, 1991). Por su parte, iNOS es una enzima citosólica, identificada inicialmente en macrófagos como una isoforma inducible por citoquinas y lipolisacáridos (Stuehr y col, 1991). Posee un dominio similar a CaM, y su actividad es independiente de Ca^{2+} .

Recientemente se ha identificado un nuevo miembro de la familia NOSs en mitocondrias de hígado de rata. En base a su localización, esta nueva isoforma de 130 kDa ha sido llamada NOS mitocondrial (mtNOS). mtNOS es reconocida por anticuerpos anti-iNOS, pero a diferencia de esta última, su actividad es dependiente de Ca^{2+} (Giulivi y col, 1998; Tatoyan y Giulivi, 1998). También se ha reportado la expresión de una variante del ARNm de nNOS en testículo humano (TnNOS) (Wang y col, 1997; Wang y col, 2002).

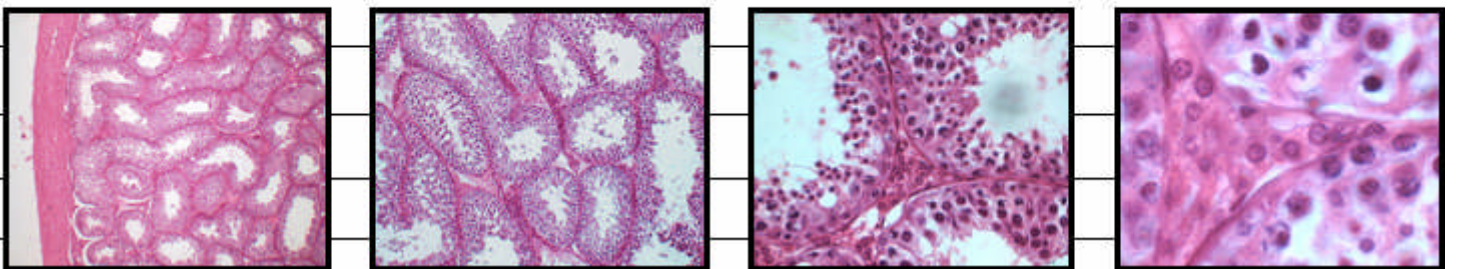
La suposición inicial acerca de una expresión tejido-específica de las distintas isoformas de NOS ha quedado totalmente descartada en la actualidad, ya que se ha demostrado la localización de más de una isoforma en un mismo tejido, e incluso en un mismo tipo celular (Alderton y col, 2001).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, formándose citrulina como coproducto (Nathan, 1992). La reacción involucra dos pasos separados de mono-oxigenación. En el primero se forma la especie intermediaria N° -hidroxiarginina, con requerimiento de O_2 , NADPH y el cofactor tetrahydrobiopterina (BH_4). En el segundo se produce la oxidación de la especie intermediaria, para formar L-citrulina y NO. Este paso requiere O_2 , NADPH y la coenzima flavina (FMN/FAD) como transportador de electrones (Knowles y Moncada, 1994).

1.8.1. OXIDO NÍTRICO Y ESTEROIDOGÉNESIS TESTICULAR

Existen diversos trabajos que describen al NO como modulador de la esteroidogénesis testicular. NO es capaz de inhibir la síntesis de esteroides en células de Leydig MA-10 (Del Punta y col, 1996). A su vez, se ha detectado la presencia de isoformas de NOS en células de Leydig humanas y de rata mediante técnicas inmunohistoquímicas (Davidoff y col, 1995; Tatsumi y col, 1997; O'Bryan y col, 2000; Zini y col, 1996). También se ha demostrado que macrófagos activados producen NO, que actuaría directamente sobre las células de Leydig, alterando la producción de andrógenos (Pomerantz y Pitelka, 1998). Sumado a estas evidencias, inhibidores de la actividad de NOS aumentan los niveles de testosterona en células de Leydig (Welch y col, 1995).

HIPÓTESIS DE
TRABAJO



2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

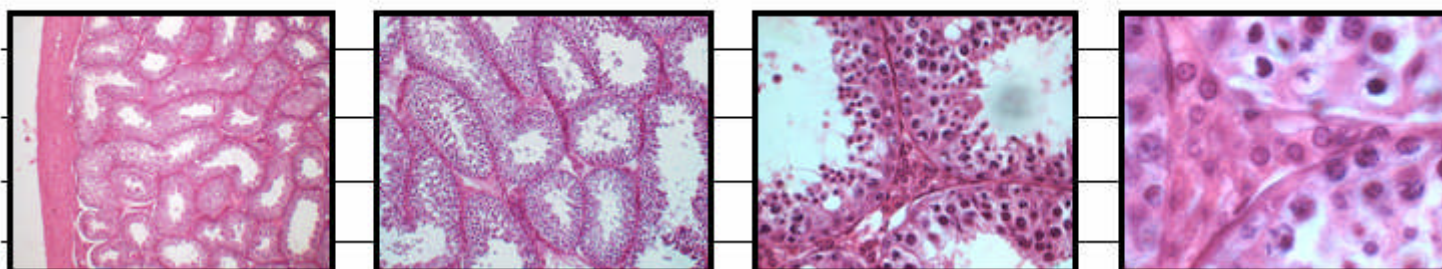
Como se indicó en la Introducción, se ha reportado la presencia de mastocitos en el intersticio testicular de distintas especies. Asimismo, se ha determinado experimentalmente la concentración intratesticular de HA en algunas de ellas. Sin embargo, las eventuales acciones de dichos mastocitos o HA sobre la síntesis de andrógenos han sido poco exploradas.

La hipótesis de trabajo de esta Tesis Doctoral plantea que los mastocitos testiculares sintetizan y liberan HA, la que probablemente actúe en forma paracrina sobre las células de Leydig para modular el proceso esteroidogénico. En este sentido, es posible que las células de Leydig expresen uno o más subtipos de receptores específicos, acoplados a sistemas de transducción de la señal.

En los últimos años, se ha estudiado en el laboratorio el efecto del NO sobre la esteroidogénesis, demostrándose que dicho factor es capaz de inhibir la síntesis de esteroides estimulada por gonadotrofinas en células de Leydig. Dado que NO y HA pueden ser producidos en el testículo, es razonable esperar que exista una correlación entre las acciones del primero y los posibles efectos de HA sobre la esteroidogénesis.

Si bien HA secretada por los mastocitos testiculares actuaría como modulador paracrino de la esteroidogénesis en la gónada masculina, no se descarta que la amina sea producida por las propias células de Leydig, presentándose de esta manera como un regulador autocrino de la biosíntesis androgénica.

OBJETIVOS



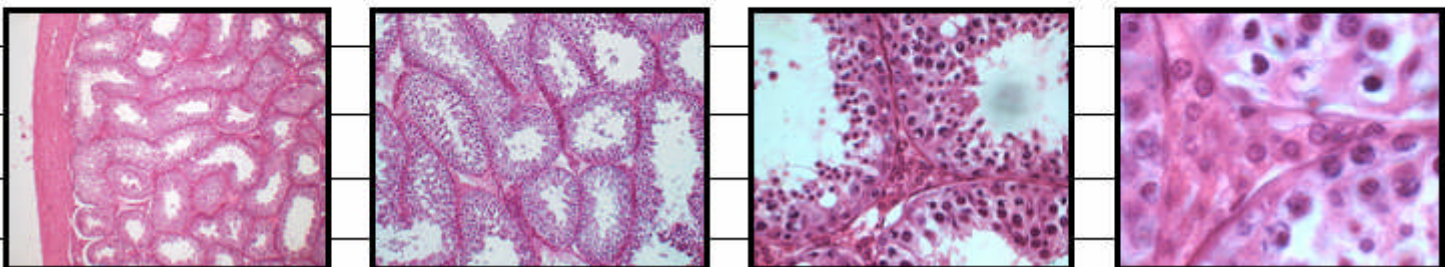
3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue el estudio de la posible interrelación entre las células de Leydig y los mastocitos para modular las acciones de la hormona luteinizante, investigando en particular los efectos de HA sobre la regulación autocrina y/o paracrina del proceso esteroidogénico.

Para ello, se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Investigar la presencia de receptores de HA en células de Leydig.
2. Estudiar la regulación de la esteroidogénesis por HA en células de Leydig.
3. Estudiar el mecanismo de acción de HA en células de Leydig.
4. Investigar la participación de óxido nítrico en el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis por HA.
5. Evaluar la capacidad de las células de Leydig de sintetizar HA.

MATERIALES Y
MÉTODOS



4.1. MATERIALES

4.1.1. 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). La pregnenolona, progesterona, testosterona, 22R-hidroxicolesterol, dehidroepiandrosterona, dibutilil AMPc (dbAMPc), 2'-O-monosucciniladenosina-tirosil metil ester 3', 5'-monofosfato cíclico (TME-cAMP), histamina, famotidina (antagonista HRH2), L-histidina, piridoxal-5'-fosfato, mio-inositol, HEPES, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), Percoll, metil ester de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), ortovanadato de sodio, carbón activado, anhídrido acético, Tris hidroximetil aminoetano (Trizma base), albúmina sérica bovina grado inmunoanálisis (BSA), fluoruro de sodio, azida sódica, ácido etilen-2-glicol-2-etilaminotetracético (EGTA), ácido etilen- diamino - tetracético (EDTA), ácido tricloro acético (TCA), azul de tripán y Ponceau S fueron comprados a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). Pirilamina (mepiramina, antagonista HRH1), dimaprit (agonista HRH2) y 6-[2-(4-Imidazolil) etilamino]-N-(4-trifluorometilfenil) heptanocarboxamida (HTMT dimaleate, agonista HRH1) fueron de Tocris Cookson Inc (Ellisville, Missouri, 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 cedida gentilmente por el Dr Carlos Libertun (IBYME, CONICET), en tanto que aquella utilizada para la medición de actividad de NOS (AG 50W-X8 forma hidrógeno) 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).

4.1.2. CULTIVO DE CÉLULAS MA-10

4.1.2.1. Medios y Soluciones

El medio Waymouth's MB 752/1 fue comprado a Sigma-Aldrich Chemical Co. El Medio 199, el suero de caballo, la gentamicina (10 mg/ml) y la solución de tripsina/EDTA (0,25%/1 mM) fueron de Gibco Laboratories (Grand Island, NY, EEUU).

4.1.2.2. Material plástico

El material de cultivo utilizado fue de Corning, TPP o Falcon. Para la preparación de los medios, se utilizaron unidades de filtración de acetato de celulosa (0,22 μm) de Corning.

4.1.3. INHIBIDORES

3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) fue comprado a Sigma-Aldrich Chemical Co. El inhibidor de fosfolipasa C (U73122) y el inhibidor de descarboxilasas de aminoácidos (NSD-1015) fueron cedidos gentilmente por la Dra. Elena Rivera (Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA).

4.1.4. RADIATIVOS

Los ligandos radiactivos específicos para los subtipos de receptores HRH1 ([Piridinil-5- ^3H]-Pirilamina, actividad específica: 24,8 Ci/mmol) y HRH2 ([Metil- ^3H]-Tiotidina, actividad específica: 75 Ci/mmol) fueron obtenidos de Dupont-New England Nuclear (NEN, Boston, MA, EEUU), como así también el Na^{125}I (utilizado para la marcación de AMPc, actividad específica: 600 Ci/mmol).

[2,3,4,5-³H]-L-arginina (49 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 (actividad específica: 25 Ci/mmol) fue obtenido de PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, EEUU).

4.1.5. ANTICUERPOS

Los anticuerpos anti-progesterona y anti-testosterona fueron donación del Dr GD Niswender (Animal Reproduction, Biotechnology Lab, Colorado State University, Fort Collins, CO, EEUU). El anticuerpo anti-Ig de conejo acoplado a peroxidasa fue de Amersham Biosciences UK Limited, Reino Unido). El anticuerpo anti-AMPC fue cedido por el Dr AF Parlow (NIDDK's National Hormone and Pituitary Program; Torrance, CA, 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 fue donado por la Dra Hargita Hegyesi (Department of Genetics, Cell and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungría).

4.1.6. REACTIVOS DE ELECTROFORESIS

Acilamida, bisacrilamida, β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sodio (SDS), tetra-metil-etilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (APS), Tween 20 (solución al 10%) y marcadores de peso molecular fueron de Bio-Rad Laboratories, Buenos Aires, Argentina).

4.1.7. SOLVENTES

Todos los solventes fueron comprados a Sintorgan S.A o Merck.

Otros reactivos utilizados fueron del mejor grado disponible, obtenidos de los proveedores habituales.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. MODELOS EXPERIMENTALES

Se trabajó en paralelo con dos modelos experimentales:

- Células de Leydig tumorales MA-10 (línea clonal murina), cuyo origen y manipulación han sido descriptos (Ascoli, 1981).

- Células de Leydig normales de rata, aisladas y purificadas a partir de ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley (Pignataro y col, 1983).

4.2.1.1. Línea Celular MA-10

La línea celular MA-10 fue provista por el Dr. Mario Ascoli (Depto de Farmacología, Universidad de Iowa, EEUU). Como su contraparte normal, las células MA-10 tienen la capacidad de convertir colesterol en hormonas esteroideas, y de responder a LH/hCG con un aumento en la biosíntesis de esteroides. La unión de LH/hCG a su receptor está mediada por la activación de la vía AC / AMPc / PKA (Ascoli, 1985). Además, tanto la afinidad (ED_{50} de unión a $37^{\circ} C \cong 1 \times 10^{-10} M$) como el número de receptores de LH/hCG son similares entre las células MA-10 y las células de Leydig normales.

Sin embargo, existen dos diferencias principales -además del origen maligno- entre las células MA-10 y las células de Leydig normales. En primer lugar, debido a una disminución en la actividad de la enzima P450 17α -hidroxilasa/17-20 liasa (P450 C17, denominación actual: CYP17), el principal esteroide producido es progesterona en lugar de testosterona (Ascoli y Puett, 1978). La segunda diferencia importante reside en el grado de acoplamiento existente entre la unión de hCG y la respuesta esteroideogénica. Mientras que en las células de Leydig normales de rata la máxima estimulación de la esteroideogénesis se alcanza con sólo un 1% de los receptores de LH/hCG ocupados (5 a 20 veces sobre los valores basales; Mendelson y col, 1975), en las células MA-10 la estimulación máxima de la síntesis de progesterona ocurre cuando se ocupa un 60-70% de los receptores (100 a 200 veces). Así, las células MA-10 ofrecen la ventaja experimental de que la activación de la esteroideogénesis por LH/hCG o análogos de AMPc es mucho más pronunciada que en las células de Leydig normales.

A pesar de las diferencias existentes entre la línea MA-10 y las células de Leydig normales, la principal característica funcional diferencial de una célula de Leydig -la presencia de receptores de LH/hCG que están acoplados al camino esteroideogénico- permanece conservada en las células MA-10. Por lo tanto, las características descritas y las ventajas asociadas a trabajar con una línea clonal permanente hacen de las células MA-10 un modelo experimental muy útil para estudiar distintos aspectos de la funcionalidad de las células de Leydig.

Mantenimiento de la línea celular MA-10

Preparación del Medio de Cultivo

Para el cultivo de las células, se utilizó medio Waymouth MB752/1, conteniendo NaHCO_3 1,1 g/l, HEPES 20 mM, gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ y suero de caballo al 15% (medio de crecimiento). El pH se ajustó a 7,4 con NaOH 1N, y el medio se esterilizó por filtración y se guardó a una temperatura de 4° C.

Aumento de la Población Celular

La expansión de la población celular se llevó a cabo sembrando las células en frascos T-25 conteniendo 10 ml de medio de crecimiento o en frascos T-75 conteniendo 20 ml del mismo medio. El seguimiento del cultivo se llevó a cabo mediante la evaluación del cambio de color del medio (como indicativo de la ocurrencia de procesos metabólicos) y la observación de los frascos al microscopio óptico. Los mismos se mantuvieron a 37° C, en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO_2 hasta la confluencia celular (Pignataro y Ascoli, 1990a).

Tripsinización de células

Las células fueron separadas de la superficie de cultivo mediante tripsinización. Para ello, se aspiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con 2 a 4 ml de 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 a 2:30 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 obtenida se utilizó para el recuento en cámara

de Neubauer, y se eligió la densidad de siembra apropiada según la superficie de cultivo a utilizar.

Criopreservación de células

A la suspensión celular obtenida luego de la tripsinización se adicionó glicerol estéril como crioprotector (concentración final: 10%), y alícuotas de 1,5 ml de esta suspensión fueron transferidas a criotubos (densidad celular: 3×10^5 células/criotubo). Los mismos se congelaron a -70°C , y al día siguiente se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido.

Cada lote de células MA-10 se mantuvo en cultivo durante un período de tiempo limitado (3 a 4 meses). Pasado este período, se descongeló un nuevo lote para la propagación celular y la posterior utilización de las células en los distintos ensayos.

Descongelamiento de células

El descongelamiento de cada lote de células se llevó a cabo en forma rápida, para maximizar la supervivencia celular. Cada tres o 4 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 vigorosamente 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 gonadotrofinas y análogos de AMPc, y se determinó la capacidad de respuesta

esteroidogénica de las mismas. Esto permitió garantizar el óptimo estado fisiológico de cada lote utilizado para los diferentes ensayos.

Incubación de células MA-10 para los ensayos de respuesta esteroidogénica

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos, (día cero; $1,25 \times 10^5$ 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_2 , y fueron utilizadas el día 3, cuando la densidad celular por pocillo alcanzó un valor de 5×10^5 . 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. Finalizada la incubación de 5 horas a 37°C , se recolectaron los medios y se conservaron a -20°C para la posterior determinación de progesterona (ver sección 4.2.3.).

Incubación de células MA-10 para la determinación de AMPc intracelular

Se procedió según se describió previamente para los ensayos de respuesta esteroidogénica, 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 sección 4.2.4.

Incubación de células MA-10 para la determinación de inositoles fosfato

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos (día cero; $0,5 \times 10^6$ 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 CO₂. 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 20 a 24 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 fluctuó entre 20 y 30% 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 4.2.5.

Incubación de células MA-10 para los ensayos de western blot y medición de actividad de las enzimas histidina descarboxilasa (HDC) y óxido nítrico sintasa (NOS)

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm, (día cero; 3×10^6 células/placa) y se agregaron 10 ml de medio de crecimiento. Las placas se mantuvieron a 37° C en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂, y fueron utilizadas el día 3, cuando la densidad celular por placa alcanzó un valor de 15×10^6 . Luego de dos lavados, se agregaron 4 ml de medio de ensayo suplementado con 1 mg/ml de BSA, conteniendo los estímulos correspondientes según se especifica en cada figura. Finalizada la incubación de 5 horas, se descartaron los medios y se cosecharon las células para la determinación de actividad de NOS (ver sección 4.2.6.) o HDC (ver sección 4.2.8.), o los ensayos de western blot (ver sección 4.2.7.).

4.2.1.2. Células de Leydig normales de rata

Aislamiento y purificación de células de Leydig de rata

Las células intersticiales de testículo, entre las que se encuentran las células de Leydig, fueron preparadas según técnicas ya descritas (Pignataro y col, 1983).

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley (60 a 70 días), criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental bajo las siguientes condiciones: temperatura controlada (21 a 25° C), y períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron dieta balanceada y libre acceso a agua, respetándose en todo momento 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 CO₂. Los testículos fueron extraídos y decapsulados. La dispersión del tejido se llevó a cabo por agitación (20 minutos, 80 ciclos/minuto, 34° C) en un tubo de plástico de 50 ml conteniendo solución enzimática (1 ml/testículo, 0,25 mg/ml de colagenasa) en Medio 199 (M199, suplementado con HEPES 20 mM; NaHCO₃ 1,2 g/l; BSA 0,1%; pH 7,4) (LI y col, 1991). Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por dilución con M199 frío. Posteriormente, el tubo se agitó en forma rotatoria durante 3 minutos, a fin de lograr una mayor dispersión del tejido. Se dejó reposar otros 3 minutos para que decanten los túbulos seminíferos, y el sobrenadante fue filtrado a través de Nitex (malla de poro 50). 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-NH₄Cl (1,7 y 140 mM respectivamente, pH 7,2) e incubaron durante 10 minutos a 37° C con agitación constante. La lisis de los glóbulos rojos se detuvo por dilución con M199 frío, y las células se centrifugaron nuevamente a 700 x g durante 10 minutos.

Los macrófagos se separaron de la preparación por adherencia diferencial a placas de Petri de plástico. Las células fueron incubadas en M199 durante 15 minutos a 37° C, bajo una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Se recuperó luego el medio conteniendo las células no adheridas, que fueron centrifugadas a 700 x g durante 10 min.

Finalmente, las células de Leydig se purificaron por fraccionamiento en un gradiente de densidad discontinuo de Percoll, de cinco fases: 21, 26, 34, 40 y 60% en M199. El gradiente se centrifugó a 800 x g durante 30 minutos,

después de los cuales se recuperó la fracción enriquecida en células de Leydig (interfase 40-60). Dicha fracción se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos, y el pellet de células fue resuspendido en M199 suplementado con HEPES 20 mM; NaHCO₃ 1,2 g/l y BSA 0,1%; pH 7,4).

La pureza de las preparaciones superó en cada aislamiento el 85%, y fue determinada mediante la tinción histoquímica combinada para 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), específica para células de Leydig (Hedger y Eddy, 1987).

Tinción histoquímica para 3 β -HSD

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

Incubación de las células de Leydig de rata para los ensayos de respuesta esteroideogénica

La preparación de células de Leydig fue diluída en M199 suplementado con HEPES 20 mM y NaHCO₃ 1,2 g/l, conteniendo además IBMX 0,1 mM y BSA 0,5%) (medio de ensayo), a fin de alcanzar una concentración final de 10⁶ células/ml. Posteriormente, las células fueron incubadas en tubos de plástico, a razón de 5 x 10⁵ células/tubo, en un volumen final de 500 μ l de medio de ensayo conteniendo los estímulos que se indican en cada figura. La incubación

se llevó a cabo con agitación constante durante 5 horas a 34° C, y los tubos fueron luego transferidos a un baño conteniendo agua destilada a 90° C por 10 minutos. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 800 x g durante 5 minutos. El sobrenadante de cada tubo se conservó a -20° C para la posterior determinación de los niveles de testosterona (ver sección 4.2.3.).

4.2.2. ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA RECEPTORES DE HA EN CÉLULAS DE LEYDIG

Los ensayos de unión se llevaron a cabo utilizando [³H]-Pirilamina (antagonista específico HRH1) y [³H]-Tiotidina (antagonista específico HRH2) como radioligandos (Davio y col, 1993).

4.2.2.1. Ensayos de unión en la línea celular MA-10

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos, (día cero; 1,25 x 10⁵ células/pocillo), y se agregó a cada pocillo 1 ml medio de crecimiento. Las placas se mantuvieron a 37° C, en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ y fueron utilizadas el día 3, cuando la densidad celular por pocillo alcanzó un valor de 5 x 10⁵. Luego de dos lavados, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de [³H]-Pirilamina (1 a 100 nM) o [³H]-Tiotidina (0,5 a 40 nM), en un volumen final/pocillo de 200 µl de Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), durante 40 minutos a 4° C. Para cuantificar la unión inespecífica, se agregó a cada pocillo pirilamina en concentración final de 100 µM o HA en concentración final de 1 mM, respectivamente. Finalizado el período de incubación, los pocillos se lavaron tres veces con buffer Tris/HCl 50 mM, y 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; Wallac, ETC, Buenos Aires, Argentina), y la radioactividad de se determinó

utilizando un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR, 65% de eficiencia).

4.2.2.2. Ensayos de unión en células de Leydig de rata

Alícuotas de 100 μ l de la suspensión de células de Leydig obtenida por centrifugación en gradiente de Percoll (concentración: 10^6 células/ml) fueron transferidas a tubos de plástico, donde se agregaron 100 μ l de buffer Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), y 10 μ l de concentraciones crecientes de [3 H]-Pirilamina (1 a 100 nM) o [3 H]-Tiotidina (0,5 a 65 nM). Para el cálculo de la unión inespecífica se utilizó pirilamina en concentración final de 100 μ M, y HA en concentración final de 1 mM, respectivamente. Los tubos fueron incubados a 4° C durante 40 minutos. Finalizado el período de incubación, la reacción se detuvo por filtración al vacío utilizando filtros Whatman de fibra de vidrio B (GF-B), previamente bloqueados con una solución de polietilenimina 0,3 %. Luego de tres lavados con Tris/HCl 50 mM, los filtros se secaron en viales de conteo, y se agregó en cada vial 2,5 ml de líquido de centelleo (Opti/Phase "Hisafe" 3; Wallac, Inglaterra). Pasadas 24 horas, la radioactividad de los filtros se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR, 65% de eficiencia).

4.2.2.3. Metodología de análisis de los resultados

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, K_D y capacidad máxima de unión, B_{max}), 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).

4.2.3. DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES

Para cuantificar los niveles de esteroides liberados al medio de incubación, se empleó la técnica de radioinmunoensayo (RIA) (Charreau y col, 1981). El dosaje de progesterona y testosterona se realizó por duplicado, en alícuotas del medio de incubación de células MA-10 y células de Leydig de rata, respectivamente. Para ello, se utilizaron anticuerpos específicos. Cada partida de anticuerpo fue titulada para conocer la dilución óptima y se eligió en cada caso la dilución correspondiente al 40 % de unión de la hormona tritiada de referencia (aproximadamente 10.000 cpm).

Brevemente, alícuotas de 100 μ l del medio de incubación (o de la dilución adecuada) fueron transferidas a tubos de plástico, donde se agregaron 200 μ l de buffer RIA (Na_2HPO_4 40 mM; NaH_2PO_4 30 mM; NaCl 150 mM; azida sódica 0,01 % y gelatina 0,1%; pH 7,0), 100 μ l de hormona tritiada y 100 μ l de la dilución óptima del anticuerpo. Las muestras fueron incubadas durante 16 h a 4° C. Finalizada la incubación, la hormona libre se separó de la unida al anticuerpo mediante el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón (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 agregó 2,5 ml de líquido centelleante (Opti/Phase "Hisafe" 3; Wallac, Inglaterra). La radioactividad de los mismos se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR, 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 μ l). Los coeficientes de variación intra e interensayo en ambos casos fueron menores al 12%.

4.2.4. DETERMINACIÓN DE AMPc INTRACELULAR

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 Na¹²⁵I en el laboratorio mediante el método de cloramina T limitante, utilizando TME-AMPc.

Alícuotas de 100 μ l de los extractos obtenidos (ver sección 4.2.1.1.) fueron transferidas a tubos de plástico, a los que se agregó una mezcla 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 μ l de ¹²⁵I-TME-AMPc (30.000 cpm), y 100 μ l 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 μ l 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 (volúmen final/tubo: 300 μ l). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores al 10%.

4.2.5. MEDICIÓN DE INOSITOLES FOSFATO (IPs)

El dosaje de inositoles fosfato se llevó a cabo según la técnica descrita por Ascoli y col (1989).

Como se describió previamente (ver sección 4.2.1.1.), 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/KHCO₃ (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 (KClO₄ 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 DOWEX de 0,5 x 3,0 cm (resina 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 etapas, agregando en forma secuencial 15 ml de mio-inositol 10 mM para lavar el [³H]-Mio-inositol residual, 5 ml de una solución de ácido fórmico 0,1 M/formiato de amonio 0,2 M para eluir inositoles monofosfato (IP₁), 5 ml de una solución de ácido fórmico 0,1 M/formiato de amonio 0,4 M para eluir inositoles difosfato (IP₂) y 5 ml de una solución de ácido fórmico 0,1 M/formiato de amonio 1 M para eluir inositoles trifosfato

(IP₃). Alícuotas de 0,5 ml de cada eluido fueron transferidas a viales de conteo, a los que se agregó 6 ml de líquido centelleante (Opti/Phase "Hisafe" 3; Wallac, Inglaterra). La radioactividad de las mismas se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR, 65% de eficiencia).

4.2.6. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

4.2.6.1. Preparación de extractos celulares

Las placas de cultivo conteniendo las células se lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) estéril, y las células fueron desprendidas mediante raspado con rastrillo y transferidas a tubos. Luego de una centrifugación a 800 x g durante 10 minutos, el pellet en cada tubo fue resuspendido en buffer de homogeneización (Sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 50mM, pH 7,4, leupeptina 10 µg/µl, PMSF 1mM, NaF 5mM, ortovanadato 50 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM). La ruptura de las células se llevó a cabo en forma mecánica, mediante pasaje de la suspensión celular a través de una aguja N° 21 sesenta veces. Luego de una centrifugación a 900 x g durante 10 minutos a 4° C, los sobrenadantes fueron recuperados y centrifugados a 9000 x g durante 15 minutos, a 4° C. Finalmente, se recuperaron los sobrenadantes de esta centrifugación, se separó una alícuota para el dosaje de proteínas (ver sección 3.2.10.) y el remanente en cada tubo se utilizó para la determinación de actividad enzimática.

4.2.6.2. Determinación de actividad enzimática

La actividad de NOS en los extractos celulares se determinó midiendo la conversión de [³H]-L-Arginina a [³H]-L-Citrulina, según la técnica ya descrita por Bredt y colaboradores (Bredt y Snyder, 1990).

Alícuotas de 70 μ l de extracto celular fueron transferidas a tubos de plástico de 1,5 ml, a los que se agregó 70 μ l de una mezcla de reacción conteniendo: Tris-HCl 50mM (pH 7,4), leupeptina 10 μ g/ μ l, PMSF 1mM, NaF 5mM, ortovanadato 50 mM, DTT 1mM, NADPH 1mM, CaCl₂ 1mM, L-Arginina 1mM y [³H]-L-arginina (400.000 cpm). Los tubos fueron incubados a 37° C durante 30 minutos, y la reacción se detuvo agregando 1 ml de buffer STOP frío (HEPES 50 mM, EDTA 10mM, pH 5,5). Posteriormente, las muestras se sembraron en columnas Dowex de 0,5 x 2 cm (AG 50W-X8, trama 100-200, forma hidrógeno), y se eluyeron con 2 ml de agua destilada. Alícuotas de 500 μ l de cada eluido fueron transferidas a viales de conteo, a los que se agregó 2,5 ml de líquido centelleante (Opti/Phase "Hisafe" 3; Wallac, Inglaterra). La radioactividad de las mismas se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR, 65% de eficiencia).

4.2.7. ENSAYOS DE WESTERN BLOT PARA EVALUAR EXPRESIÓN DE HISTIDINA DESCARBOXILASA

4.2.7.1. Preparación de extractos celulares

Las placas de cultivo conteniendo las células se lavaron 3 veces con PBS, y las células adheridas fueron despegadas mediante raspado con rastrillo, y transferidas a tubos. Se separó una alícuota de la suspensión celular en cada tubo para el recuento en cámara de Neubauer, y las células fueron luego centrifugadas durante 5 minutos a 9000 x g. A continuación, se descartaron los sobrenadantes y el pellet en cada tubo fue resuspendido en buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8, Tritón X-100 1 %, EGTA 0,5 mM, Leupeptina 10 μ g/ml, NaF 5 mM, ortovanadato de sodio 0,05 M, PMSF 2,5 mM), agregándose 20 μ l/10⁶ células. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 15 minutos para completar la lisis, y luego fueron sometidos a una centrifugación de 10 minutos, a 13000 x g. Se recuperaron los sobrenadantes, se separó una alícuota para el dosaje

de proteínas (ver sección 3.2.10.) y el remanente se utilizó para el ensayo de western blot.

4.2.7.2. Electroforesis en matriz de poliacrilamida

Las proteínas de los extractos celulares fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) (SDS-PAGE), según la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), y transferidas a membranas de polivinil fluoruro (PVDF) (Polyscreen PVDF Transfer Membrane, NEN 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 diluidos al medio en buffer de siembra (Tris-HCl 0,06 M; pH 6,8, glicerol 25 % V/V, SDS 2 % P/V, azul de bromofenol 0,01 % P/V, β -mercaptoetanol 5 % V/V) 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 (30 V para el gel concentrador y 100 V para el gel separador), empleando un dispositivo de BioRad (Miniprotean III).

Finalizada la corrida electroforética, el gel fue equilibrado en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 150 mM, metanol 20% V/V) durante 15 minutos. Las proteínas fueron luego transferidas a la membrana de PVDF, previamente activada con metanol y equilibrada en el mismo buffer. El proceso se desarrolló a corriente constante (100 mA) durante 4 horas a 4° C.

Posteriormente, se recuperó la membrana de PVDF y la misma se tiñó con una solución de Rojo Ponceau-ácido acético (0,2-0,5%) para verificar la transferencia de las proteínas. El colorante fue luego removido mediante sucesivos lavados con TBS (Tris 4 mM, NaCl 250 mM, pH 7,5).

4.2.7.3. 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%, durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación en presencia del anticuerpo específico anti-HDC (40 ng/ml, dilución 1:10000) se llevó a cabo durante 1 hora. Luego de sucesivos lavados con PBS-Tween, la membrana fue incubada por 30 minutos en presencia de un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo, acoplado a peroxidasa (dilución 1:20000, concentración 100 ng/ml). Finalmente, el revelado se llevó a cabo incubando la membrana en una solución sustrato de peroxidasa, amplificadora de quimioluminiscencia (Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus-NEN Life Science Products) 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.

4.2.8. ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE HISTIDINA DESCARBOXILASA (HDC)

4.2.8.1. Preparación de extractos celulares

Las placas de cultivo conteniendo las células se lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) estéril, y las células fueron desprendidas mediante raspado con rastrillo y transferidas a tubos. Luego de una centrifugación a 800 x g durante 10 minutos, el pellet en cada tubo fue resuspendido en PBS 50 mM, pH 6,5. La ruptura de las células se llevó a cabo en forma mecánica, mediante pasaje de la suspensión celular a través de una aguja N° 21 sesenta veces. Luego de una centrifugación a 900 x g durante 10 minutos a 4° C, los sobrenadantes fueron recuperados y centrifugados a 9000 x g durante 15 minutos, a 4° C. Finalmente, se recuperaron los sobrenadantes de esta centrifugación, se separó una alícuota para el dosaje de proteínas (ver sección 4.2.10.), y el remanente se utilizó como fuente de enzima para el ensayo de determinación de actividad enzimática.

4.2.8.2. Determinación de actividad enzimática

La actividad de HDC en los extractos celulares se determinó midiendo la descarboxilación específica del aminoácido L-histidina, según la técnica ya descrita por Cricco y colaboradores (Cricco y col, 1994). Para ello, alícuotas de 200 µl de extracto celular fueron transferidas a tubos de vidrio conteniendo 200 µl de buffer fosfato 20 mM, pH 6,5, a los que se agregó seguidamente 10 µl de piridoxal-5'-fosfato (concentración final: 10^{-5} M). En estas condiciones se realizó una preincubación durante 15 minutos a 37° C, iniciando luego la reacción con el agregado de 100 µl de una mezcla de L-carboxil-¹⁴C-histidina (0,1 µCi) y L-histidina (20 mM final). Para determinar la descarboxilación inespecífica, los blancos de reacción se prepararon con el agregado de 10 µl del

inhibidor de descarboxilasas de aminoácidos NSD-1015, en concentración final de 10^{-5} M. Para retener el $^{14}\text{CO}_2$ desprendido durante la reacción, se empleó un papel de filtro plegado y embebido en 100 μl de hidróxido de yamina (base fuerte). Éste fue colocado en un dispositivo plástico con forma de cucharón, suspendido del tapón de goma que permitía el cierre hermético del tubo de incubación.

La incubación se realizó durante 1 hora a 37° C, con agitación constante, luego de lo cual se agregaron 0,5 ml de TCA 10% mediante una jeringa con aguja a través del tapón de goma. Seguidamente, los tubos se taparon y se guardaron en heladera durante 24 horas para la completa difusión del CO_2 . Los papeles fueron luego transferidos a viales de conteo conteniendo solución centelleadora, y la radioactividad de los mismos se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR, 65% de eficiencia).

4.2.9. INMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE CONTENIDO ENDÓGENO DE HA

Para la detección de contenido endógeno de HA en la línea celular MA-10 y en células de Leydig de rata, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares (12 mm de diámetro, Marienfeld, Germany) colocados en placas de cultivo de 12 pocillos (125.000 células/pocillo), y cultivadas en 1 ml de medio de crecimiento a 37° C, en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO_2 . Al tercer día, las células adheridas a los cubreobjetos fueron lavadas con PBS y fijadas durante 10 minutos en una solución de formaldehído 4% en PBS (pH 7,4) y, luego de tres lavados con PBS, las mismas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 (0,25 % en PBS 10 mM) durante 10 minutos. Seguidamente, las células fueron lavadas tres veces con PBS y posteriormente incubadas en solución de bloqueo (BSA 1% en PBS 10 mM) durante 1 hora. Todos los pasos descriptos hasta aquí se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con agitación.

Las células fueron luego incubadas durante 24 horas en presencia de un anticuerpo específico anti-HA (desarrollado en conejo), en cámara húmeda a 4° C (dilución 1:100 en solución de bloqueo). A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con isocianato de fluoresceína (FITC, dilución 1:200 en solución de bloqueo) durante dos horas, en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente, luego de tres lavados con PBS 10 mM y un enjuague con agua destilada (previamente filtrada), se procedió al montaje. El mismo se llevó a cabo agregando 1 gota de líquido de montaje específico, FluorSave™ Reagent (Calbiochem, USA). La visualización de la fluorescencia verde se realizó mediante un microscopio láser confocal (Nikon C1).

4.2.10. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Bradford (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).

4.2.11. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EXCLUSIÓN DEL COLORANTE AZUL DE TRIPÁN

4.2.11.1. Línea celular MA-10

Finalizada la incubación de 5 horas en presencia de los estímulos correspondientes, se aspiró el medio de incubación y se agregó a cada pocillo de P24 300 µl de una solución del colorante azul de tripán 0.2 %. Se incubaron las células durante 5 minutos a temperatura ambiente y se aspiró luego el colorante. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 250 µl de una solución de tripsina-EDTA, y la misma se dejó actuar durante 45 segundos. A continuación,

se aspiró la solución de tripsina, y las placas se mantuvieron en estufa a 37° C durante a 2:30 minutos. El porcentaje de células no teñidas (células vivas) se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

4.2.11.2. Células de Leydig de rata

A 100 μ l de la suspensión de células de Leydig en Medio 199 se agregaron 500 μ l de una solución de azul de tripán 0,4%, y 400 μ l de Medio 199 conteniendo 0,2% de BSA. Las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego de lo cual se determinó el porcentaje de células vivas mediante conteo en cámara de Neubauer.

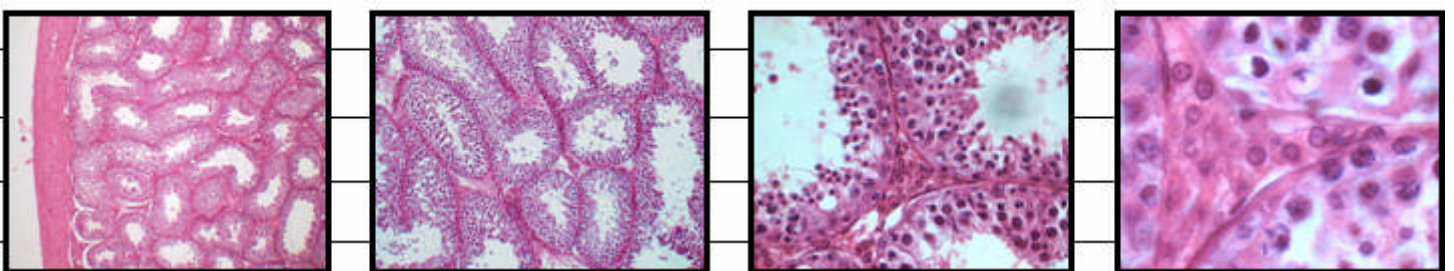
4.2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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 Tukey-Kramer 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 (Steel y Torrie, 1992).

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.

RESULTADOS



5.1. RECEPTORES DE HISTAMINA EN CÉLULAS DE LEYDIG

De acuerdo con los objetivos específicos planteados, se investigó en primer término la presencia de receptores de HA células de Leydig. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de unión utilizando ligandos radiactivos específicos para los subtipos de receptores HRH1 y HRH2.

5.1.1. ENSAYOS DE UNIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MA-10

5.1.1.1. Ensayos de unión con [³H]-Pirilamina

Utilizando [³H]-Pirilamina como radioligando específico, se demostró la presencia de HRH1 en la línea celular MA-10. La figura 13A muestra la curva de saturación obtenida a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo de un sitio de unión, que resultó significativamente mejor según la prueba parcial F. Los parámetros cinéticos, KD y B_{max}, se presentan en la tabla 1.

5.1.1.2. Ensayos de unión con [³H]-Tiotidina

Se utilizó [³H]-Tiotidina como radioligando específico para investigar la presencia de HRH2 en la línea celular MA-10. De igual modo que para HRH1, los datos experimentales se ajustaron mejor al modelo de un sitio de unión. La figura 13B muestra la curva de saturación correspondiente. Los valores de KD y B_{max} se presentan en la tabla 1.

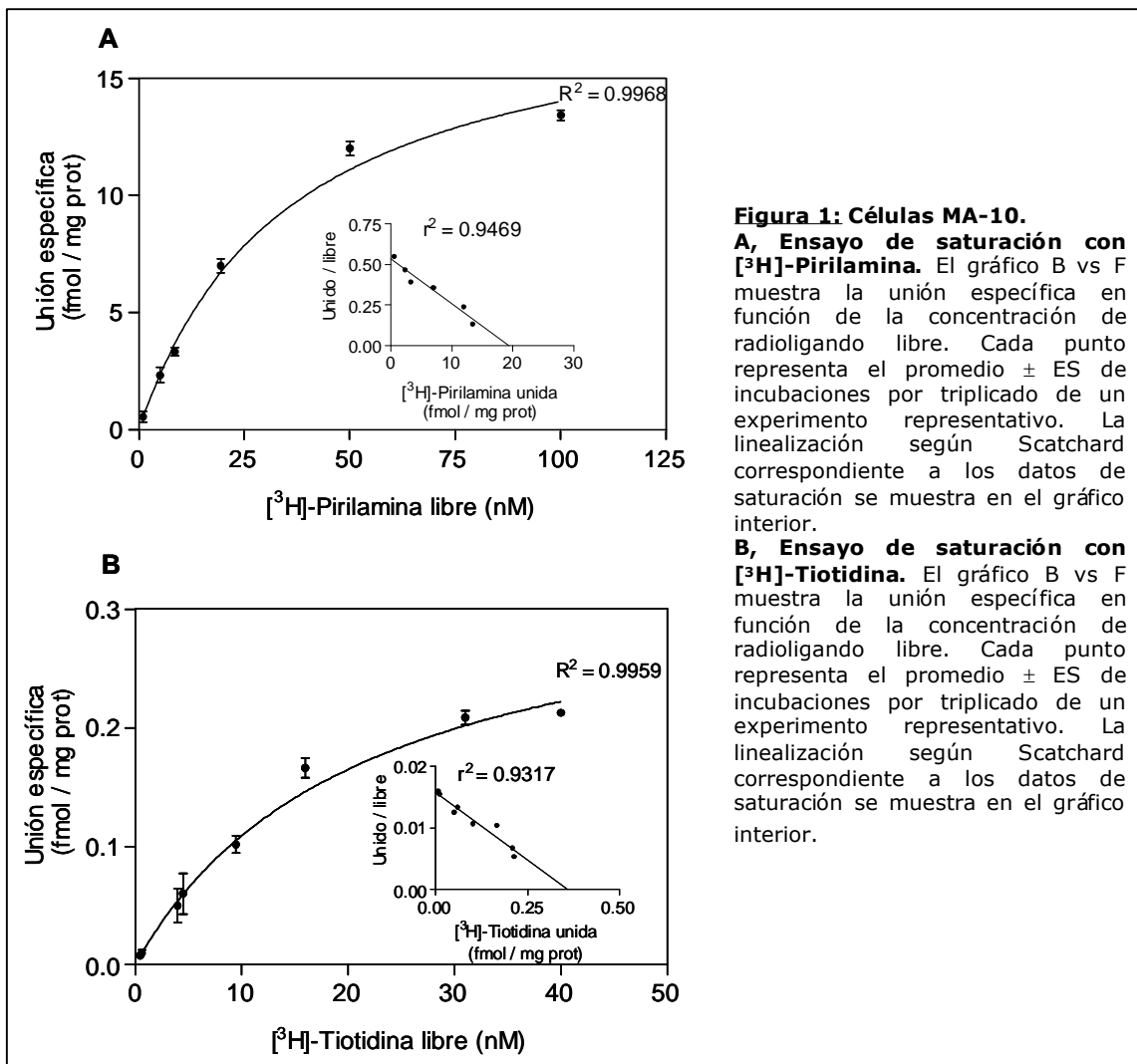


Figura 1: Células MA-10.

A, Ensayo de saturación con $[^3\text{H}]$ -Pirilamina. El gráfico B vs F muestra la unión específica en función de la concentración de radioligando libre. Cada punto representa el promedio \pm ES de incubaciones por triplicado de un experimento representativo. La linealización según Scatchard correspondiente a los datos de saturación se muestra en el gráfico interior.

B, Ensayo de saturación con $[^3\text{H}]$ -Tiotidina. El gráfico B vs F muestra la unión específica en función de la concentración de radioligando libre. Cada punto representa el promedio \pm ES de incubaciones por triplicado de un experimento representativo. La linealización según Scatchard correspondiente a los datos de saturación se muestra en el gráfico interior.

TABLA 1. Células MA-10. Sitios de unión a $[^3\text{H}]$ -Pirilamina y $[^3\text{H}]$ -Tiotidina.

	K_D (nM)	B_{\max} (fmol/mg prot)
$[^3\text{H}]$ - Pirilamina	$35,5 \pm 4,3$	$18,9 \pm 1,6$
$[^3\text{H}]$ - Tiotidina	$21,4 \pm 2,1$	$0,34 \pm 0,02$

Los valores de K_D (promedio \pm ES) y B_{\max} (promedio \pm ES) fueron calculados a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo de un sitio de unión, que resultó significativamente mejor según la prueba parcial F. La tabla muestra datos de tres experimentos independientes, realizados por triplicado.

5.1.2. ENSAYOS DE UNIÓN EN CÉLULAS DE LEYDIG DE RATA

Las células MA-10 representan un modelo útil para el estudio de la regulación de la esteroidogénesis. Sin embargo, dado su origen tumoral, resultó imprescindible validar los resultados obtenidos investigando la presencia de receptores de HA en células de Leydig normales. El aislamiento y purificación de dichas células se llevó a cabo según fue descrito en Materiales y Métodos (sección 4.2.1.2.).

5.1.2.1. Ensayos de unión con [³H]-Pirilamina

Utilizando [³H]-Pirilamina como radioligando específico, se demostró la presencia de HRH1 en células de Leydig de rata. De igual modo que para la línea celular MA-10, el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el de un sitio de unión. La figura 14A muestra la curva de saturación correspondiente. Los valores de KD y B_{max} se presentan en la tabla 2.

5.1.2.2. Ensayos de unión con [³H]-Tiotidina

A fin de investigar la presencia de HRH2 en células de Leydig de rata, se utilizó [³H]-Tiotidina como radioligando específico para los ensayos de unión. La figura 14B muestra la curva de mejor ajuste para los datos experimentales, correspondiente al modelo de un sitio de unión. En la tabla 2 se presentan los parámetros cinéticos, KD y B_{max}.

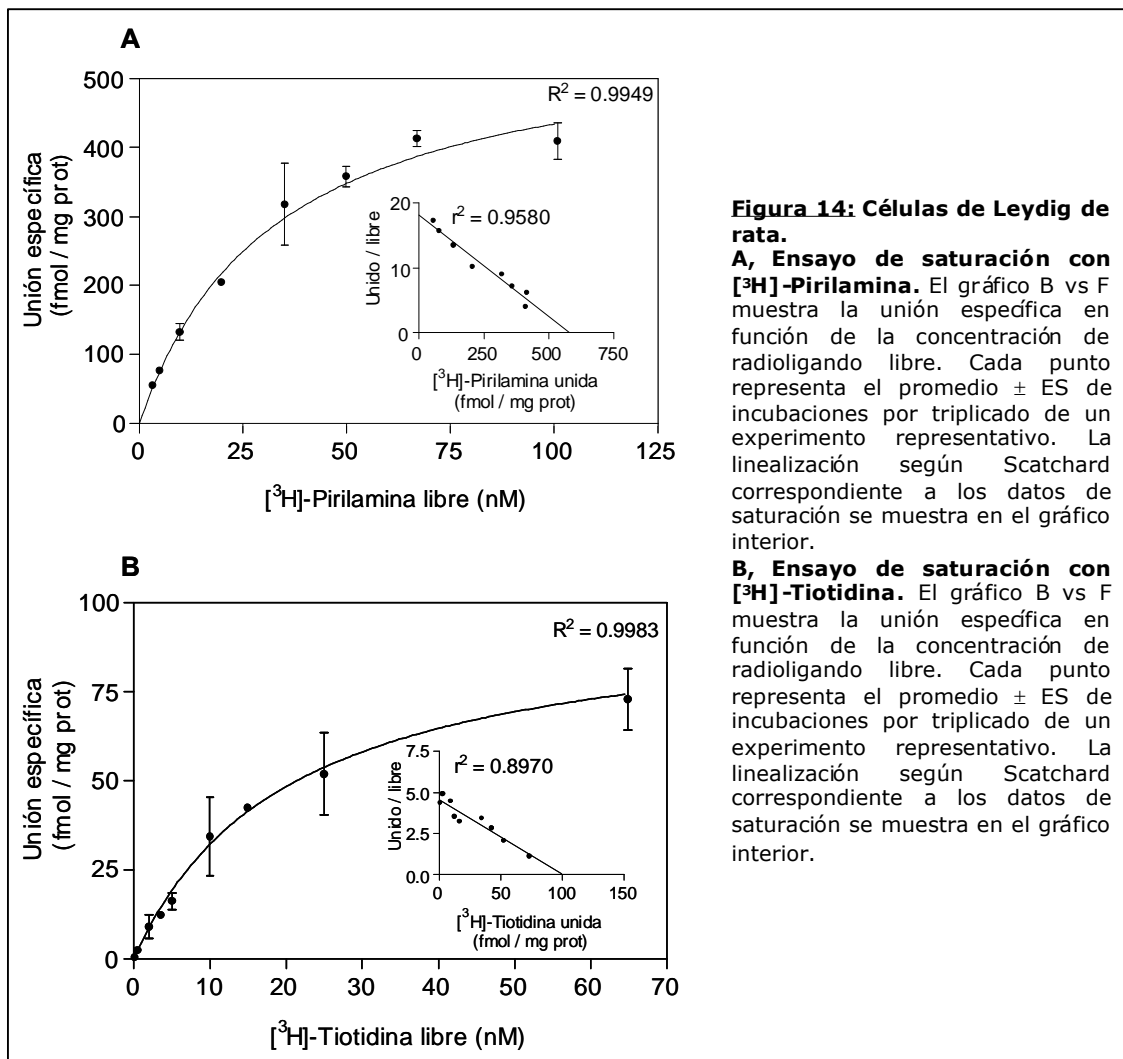


Figura 14: Células de Leydig de rata.

A, Ensayo de saturación con $[^3\text{H}]$ -Pirilamina. El gráfico B vs F muestra la unión específica en función de la concentración de radioligando libre. Cada punto representa el promedio \pm ES de incubaciones por triplicado de un experimento representativo. La linealización según Scatchard correspondiente a los datos de saturación se muestra en el gráfico interior.

B, Ensayo de saturación con $[^3\text{H}]$ -Tiotidina. El gráfico B vs F muestra la unión específica en función de la concentración de radioligando libre. Cada punto representa el promedio \pm ES de incubaciones por triplicado de un experimento representativo. La linealización según Scatchard correspondiente a los datos de saturación se muestra en el gráfico interior.

TABLA 2. Células de Leydig de rata. Sitios de unión a $[^3\text{H}]$ -Pirilamina y $[^3\text{H}]$ -Tiotidina.

	K_D (nM)	B_{\max} (fmol/mg prot)
$[^3\text{H}]$ - Pirilamina	$32,8 \pm 4,7$	$576,8 \pm 36,9$
$[^3\text{H}]$ - Tiotidina	$20,5 \pm 2,1$	$97,9 \pm 5,4$

Los valores de K_D (promedio \pm ES) y B_{\max} (promedio \pm ES) fueron calculados a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo de un sitio de unión, que resultó significativamente mejor según la prueba parcial F. La tabla muestra datos de tres experimentos independientes, realizados por duplicado.

El análisis de los resultados presentados en las tablas 1 y 2 revela que las células de Leydig expresan un mayor número de sitios HRH1 y HRH2 en la membrana, en comparación con las células MA-10.

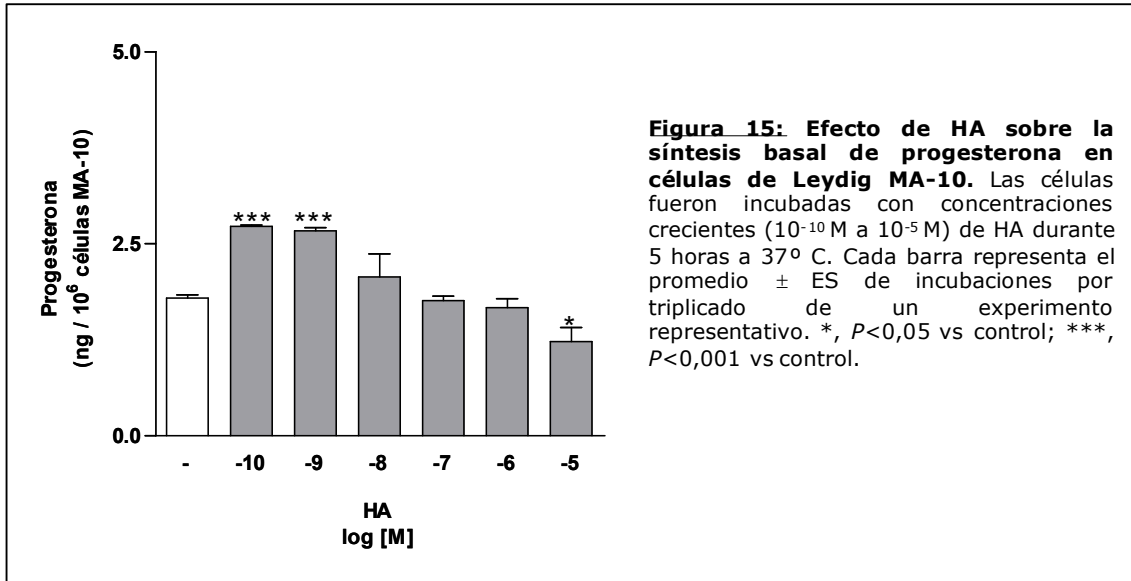
5.2. REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS POR HISTAMINA EN CÉLULAS DE LEYDIG

Habiendo demostrado la presencia de receptores HRH1 y HRH2 en células de Leydig, resultó de interés evaluar una posible función reguladora de HA sobre el proceso esteroideogénico en dichas células.

5.2.1. EFECTO DE HA SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN LA LÍNEA CELULAR MA-10

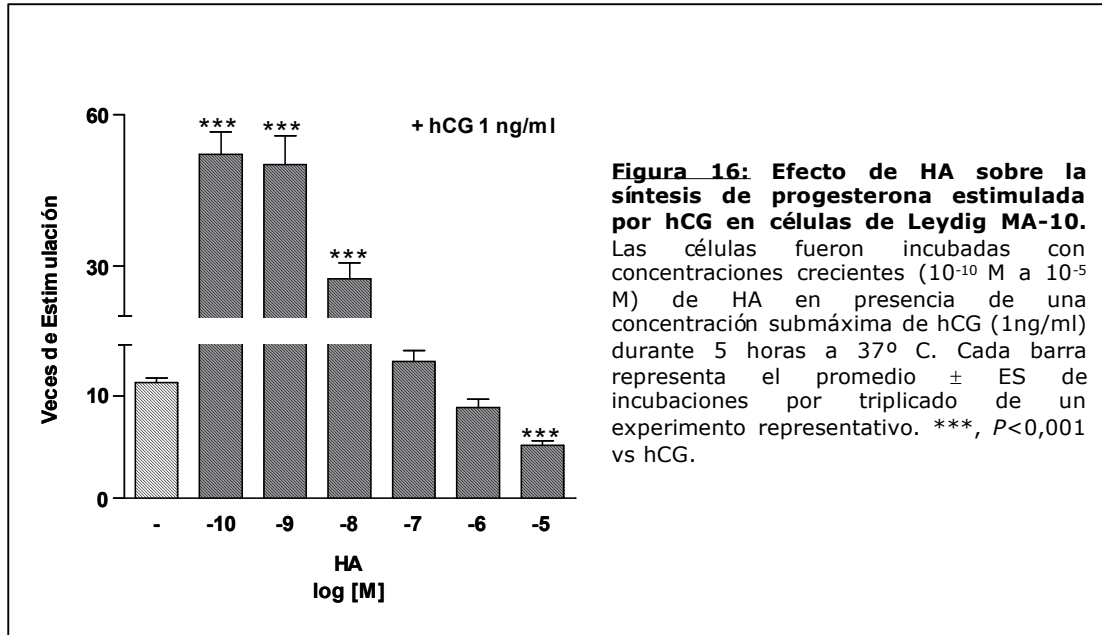
5.2.1.1. Efecto de HA sobre la síntesis basal de progesterona

Las células MA-10 fueron incubadas con concentraciones crecientes de HA (10^{-10} M a 10^{-5} M) durante 5 horas a 37° C. Los resultados se muestran en la figura 15. Se observa un efecto dual de HA sobre la síntesis basal de progesterona, siendo dicho efecto estimulador a concentraciones de orden nanomolar e inhibitorio para HA 10 micromolar. No se utilizaron concentraciones más elevadas a fin de evitar posibles efectos citotóxicos. Concentraciones inferiores a 10^{-10} M no tuvieron efecto sobre la esteroideogénesis.

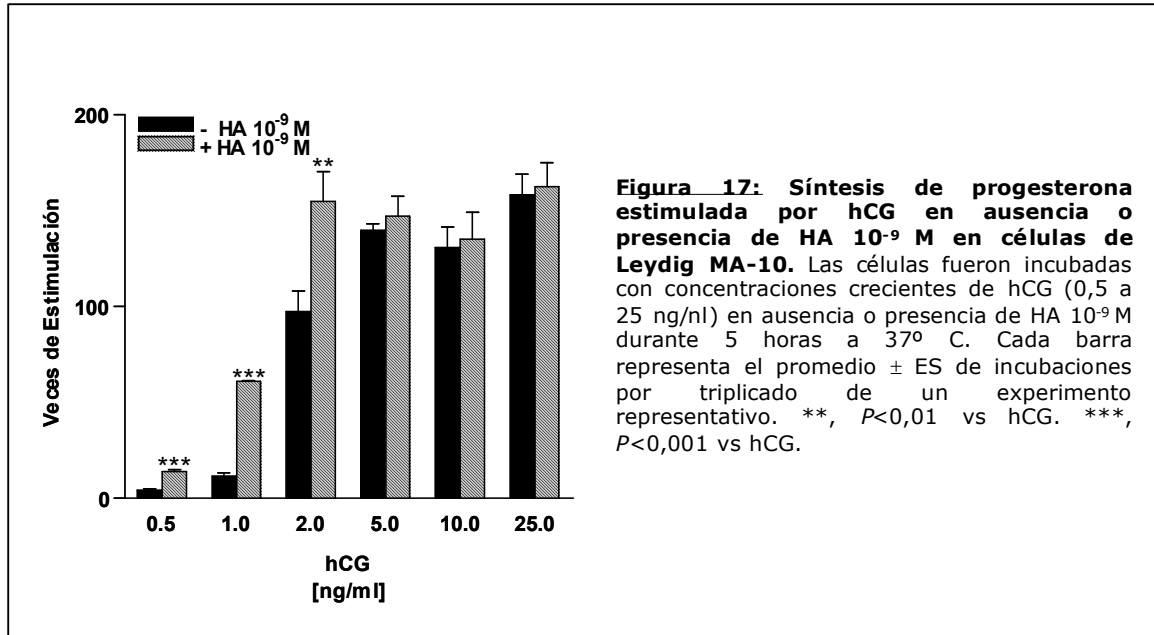


5.2.1.2 Efecto de HA sobre la síntesis de progesterona estimulada por hCG

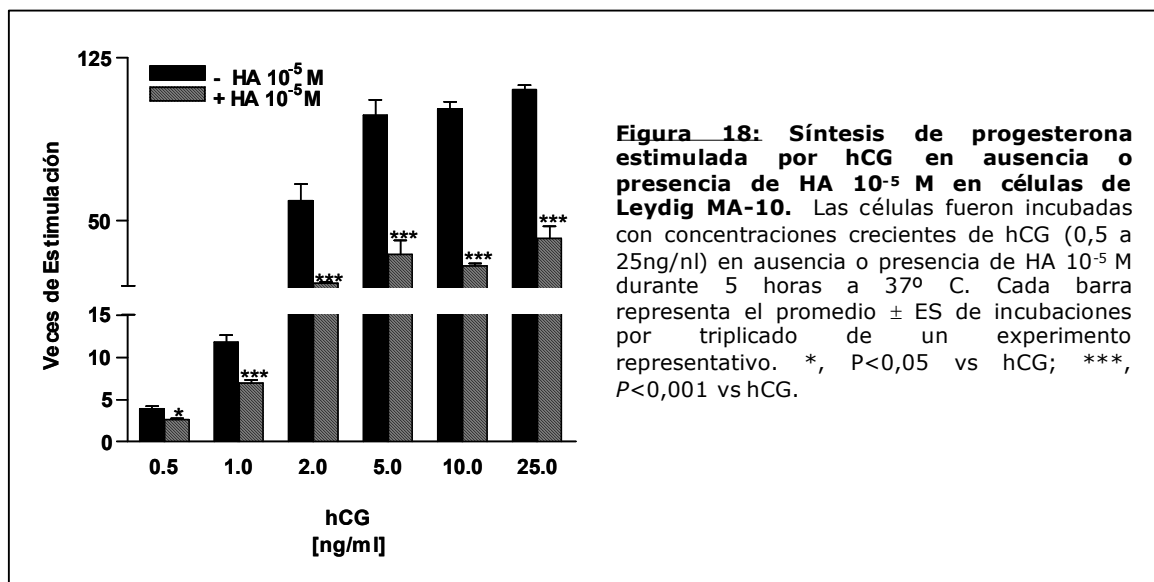
En primer término, las células MA-10 fueron incubadas con concentraciones crecientes de HA (10^{-10} M a 10^{-5} M), en presencia de una concentración submáxima de hCG (1 ng/ml) durante 5 horas a 37° C. La figura 16 muestra que el efecto dual de la amina observado en condiciones basales también ocurre en presencia de hCG. Además, se observa claramente que HA en concentraciones nanomolares potencia la respuesta de las células a la hormona (4,6 veces respecto de hCG).



En otro grupo de experimentos, las células MA-10 fueron incubadas con HA 10^{-9} M o HA 10^{-5} M, en presencia de concentraciones crecientes de hCG (0,5 a 25 ng/ml) durante 5 horas a 37° C. El efecto estimulador de HA 10^{-9} M resultó dependiente de la concentración de hCG utilizada, como se muestra en la figura 17. En concordancia con los resultados antes descritos, HA 10^{-9} M aumentó significativamente la respuesta esteroidogénica inducida por concentraciones submáximas de hCG. Sin embargo, no tuvo efecto sobre concentraciones máximas de la hormona (5 a 25 ng/ml).

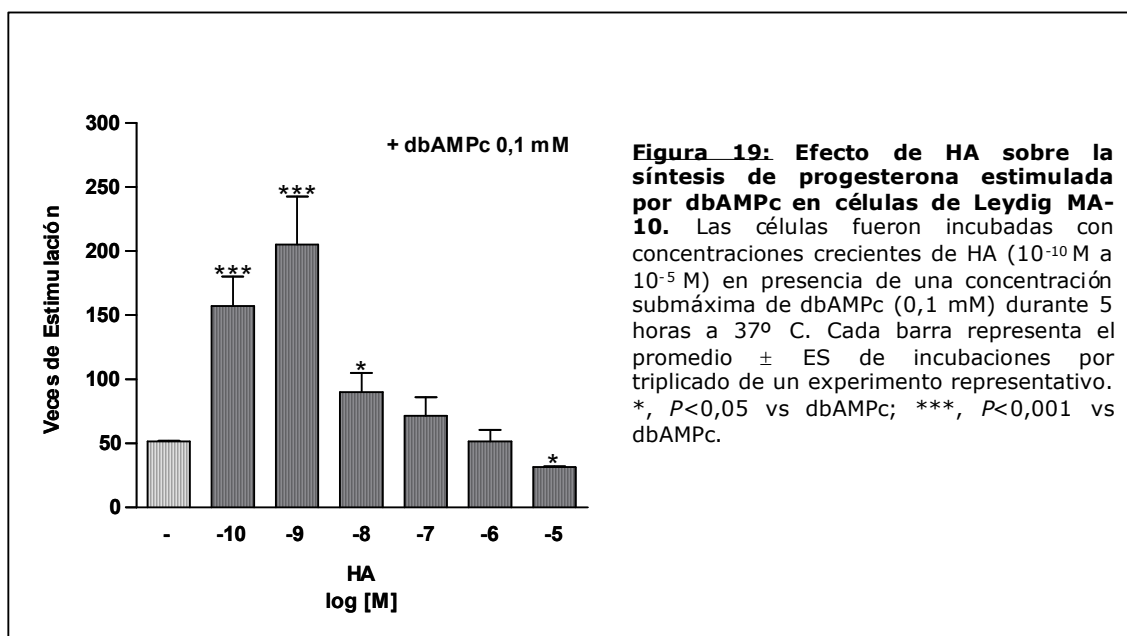


En cambio, el efecto inhibitorio de HA 10⁻⁵ M resultó independiente de la concentración de hCG. La figura 18 muestra que la inhibición de la respuesta a la hormona ocurre tanto en presencia de concentraciones máximas como submáximas de la misma (50% de inhibición en promedio).



5.2.1.3. Efecto de HA sobre la síntesis de progesterona estimulada por un análogo de AMPc

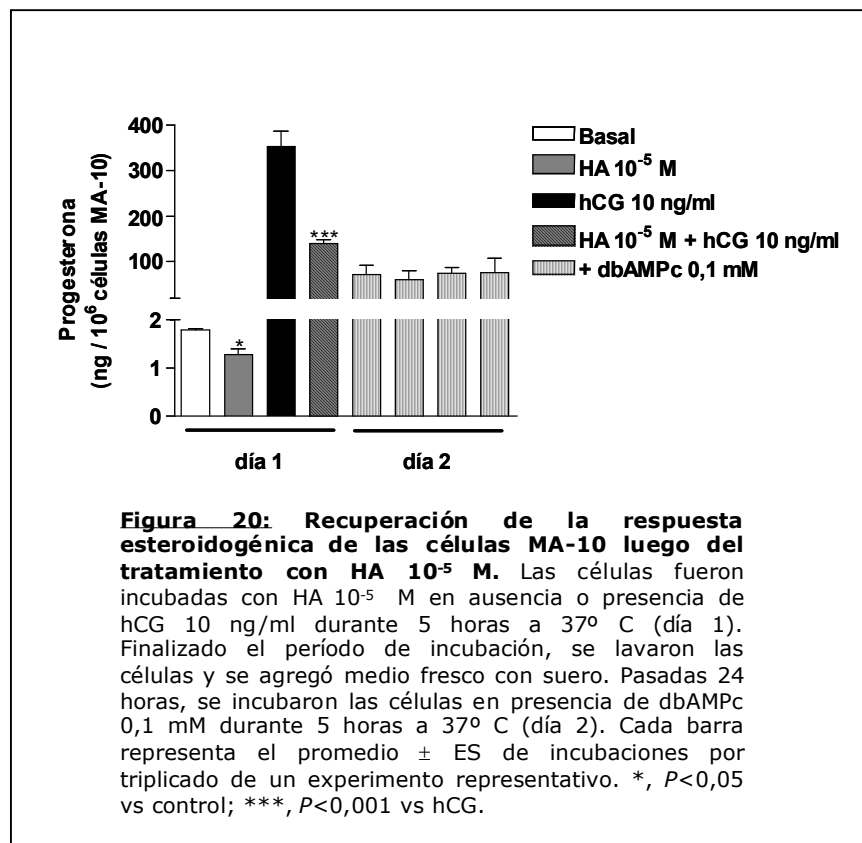
Siendo el AMPc mediador clásico de las acciones de LH/ hCG, se estudió también el efecto de HA sobre la esteroidogénesis estimulada por una concentración submáxima de dbAMPc (0,1 mM), análogo permeable del segundo mensajero. Se observó un perfil similar al obtenido en condiciones basales y en presencia de concentraciones submáximas de hCG (Figura 19). HA en concentraciones de orden nanomolar aumentó la síntesis de progesterona inducida por el análogo, mientras que HA 10^{-5} M mostró un efecto inhibitorio.



5.2.1.4. Recuperación de la respuesta esteroideogénica luego del tratamiento con HA 10^{-5} M

Para descartar que la inhibición de la esteroideogénesis por HA 10^{-5} M pudiera deberse a un efecto citotóxico de la amina sobre las células MA-10, se evaluó la reversibilidad del efecto de HA 10^{-5} M sobre el proceso esteroideogénico. Finalizada la incubación de 5 horas con HA 10^{-5} M, en presencia o ausencia de hCG (día 1), se lavaron las células y se agregó medio fresco con suero. Pasadas 24 horas, se evaluó la respuesta de esas mismas células a dbAMPc (día 2). Se utilizó dbAMPc, y no hCG, para evitar el efecto de una posible disminución en el número de receptores de hCG en aquellas células que habían sido tratadas con la hormona el día 1. La figura 20 muestra que la inhibición ejercida por HA 10^{-5} M sobre la síntesis de progesterona basal o estimulada por hCG se revierte completamente luego de 24 horas en ausencia de la amina: Las células MA-10 recuperaron en un 100% su capacidad de responder a un estímulo esteroideogénico. Estos resultados confirman que el tratamiento con HA 10^{-5} M no resulta citotóxico.

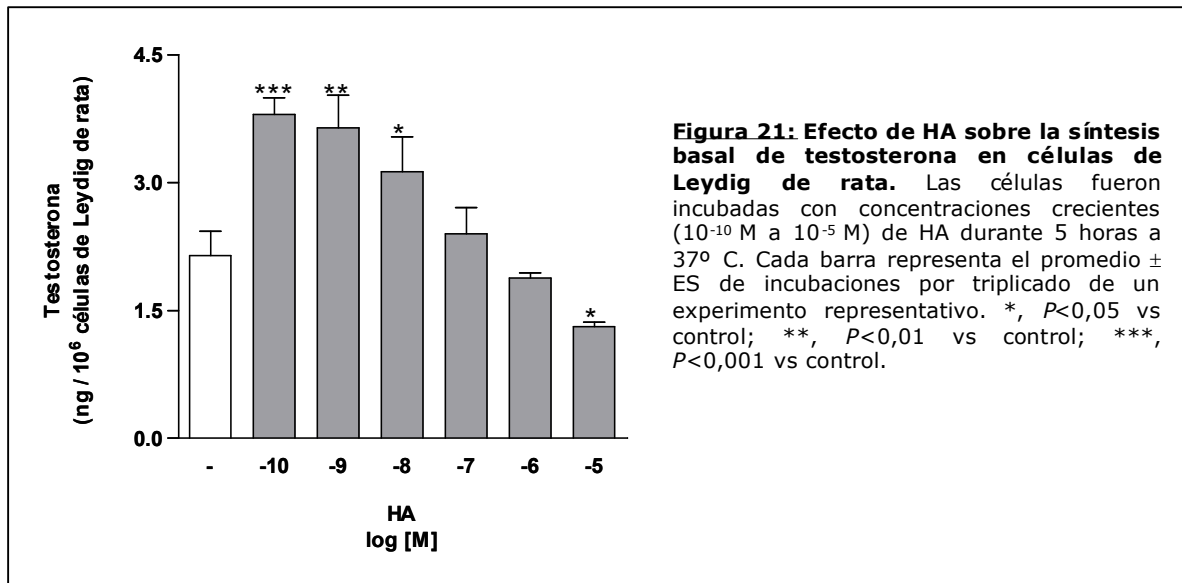
También se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante la tinción por exclusión con azul de tripán. No se observaron diferencias significativas entre los controles (95%) y las células tratadas con HA (94%).



5.2.2. EFECTO DE HA SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS DE LEYDIG DE RATA

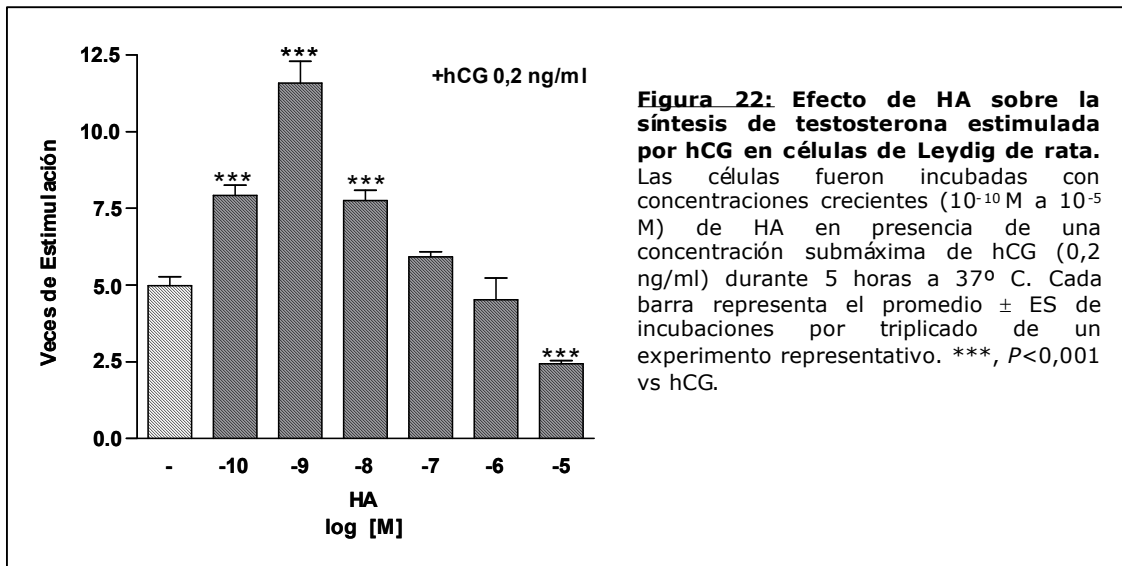
5.2.2.1. Efecto de HA sobre la síntesis basal de testosterona

A fin de validar los resultados obtenidos para la línea celular MA-10, las células de Leydig de rata fueron incubadas con concentraciones crecientes de HA (10⁻¹⁰ M a 10⁻⁵ M) durante 5 horas a 37° C. Los resultados se muestran en la figura 21. Se observa un efecto dual de HA sobre la síntesis basal de testosterona, de igual modo que para las células MA-10. La magnitud del efecto estimulador fue comparable a aquella obtenida para células MA-10 (1,5 veces respecto del control en ambos modelos experimentales), mientras que el efecto inhibitorio fue algo superior (40% de inhibición en células de Leydig de rata, 32% en células MA-10).



5.2.2.2. Efecto de HA sobre la síntesis de testosterona estimulada por hCG

Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de HA (10^{-10} M a 10^{-5} M), en presencia de una concentración submáxima de hCG (0,2 ng/ml) durante 5 horas a 37° C. La figura 22 muestra que el efecto dual de HA observado en condiciones basales ocurre también en presencia de concentraciones submáximas de hCG, de igual modo que en la línea MA-10. En este caso, el efecto estimulador (2,4 veces respecto de hCG) fue menos pronunciado que aquél descrito para la línea MA-10, mientras que el efecto inhibitorio fue de similar magnitud (50% de inhibición).



5.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE HISTAMINA EN CÉLULAS DE LEYDIG

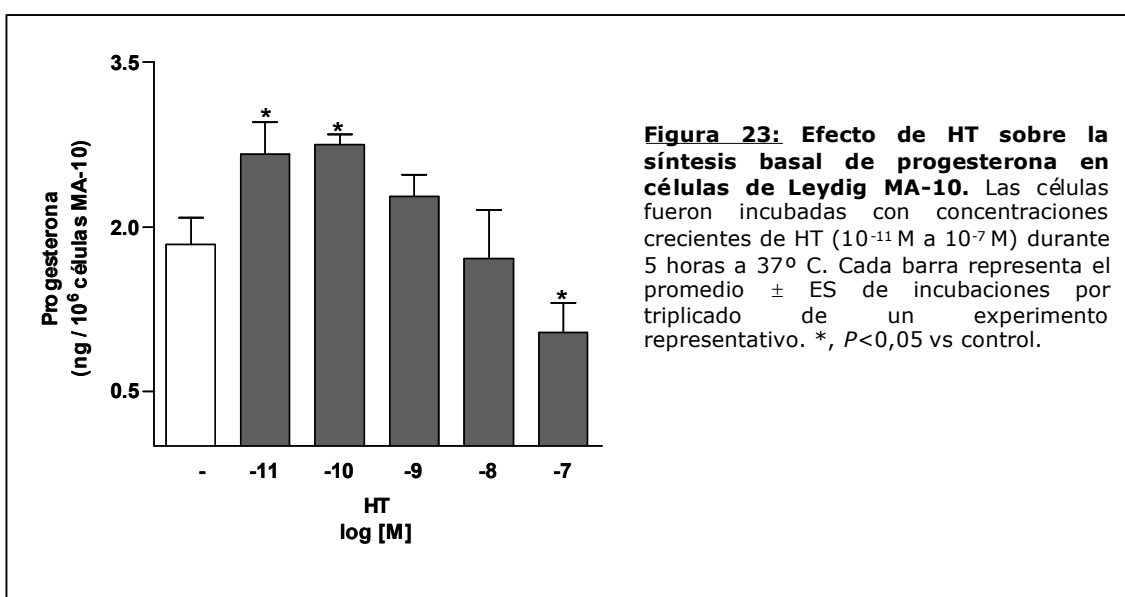
5.3.1 ESTUDIO DE LA POSIBLE PARTICIPACIÓN DE HRH1 Y/Ó HRH2 EN EL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS POR HA

5.3.1.1. Efecto de agonistas de los subtipos de receptores HRH1 y HRH2 sobre la esteroidogénesis en la línea celular MA-10

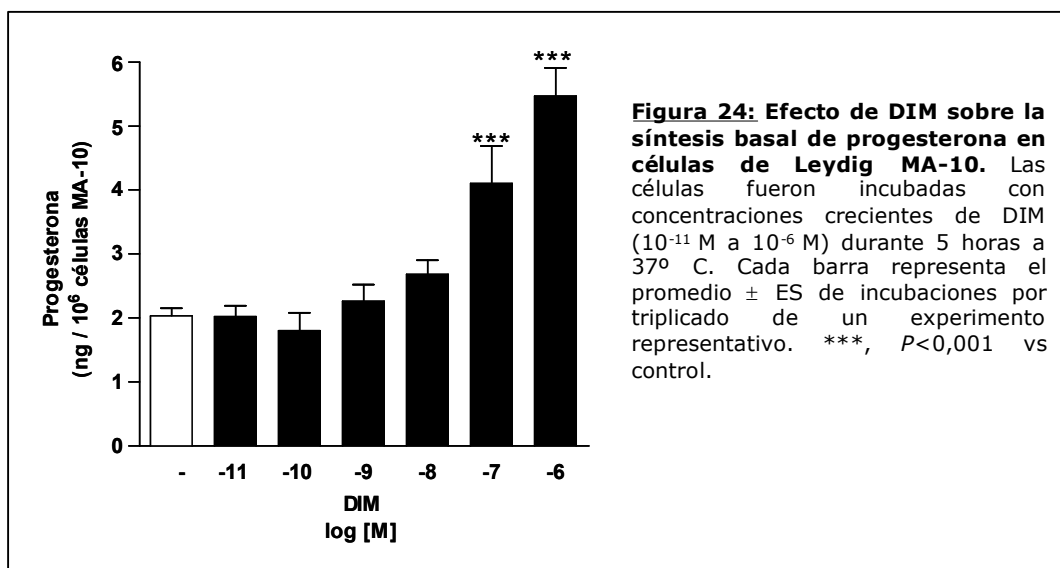
A fin de determinar si HRH1 y/ó HRH2 están involucrados en los efectos de HA sobre la síntesis de esteroides, se evaluó la respuesta esteroidogénica de las células MA-10 en presencia de agonistas HRH1 o HRH2 (HTMT-dimaleate (HT) y Dimaprit (DIM), respectivamente).

Efecto de HT y DIM sobre la síntesis basal de progesterona

Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de HT (10^{-11} M a 10^{-7} M) o DIM (10^{-11} M a 10^{-6} M) durante 5 horas a 37° C. Se observó un efecto dual de HT sobre la síntesis basal de progesterona, como fue descrito para HA (Figura 23).



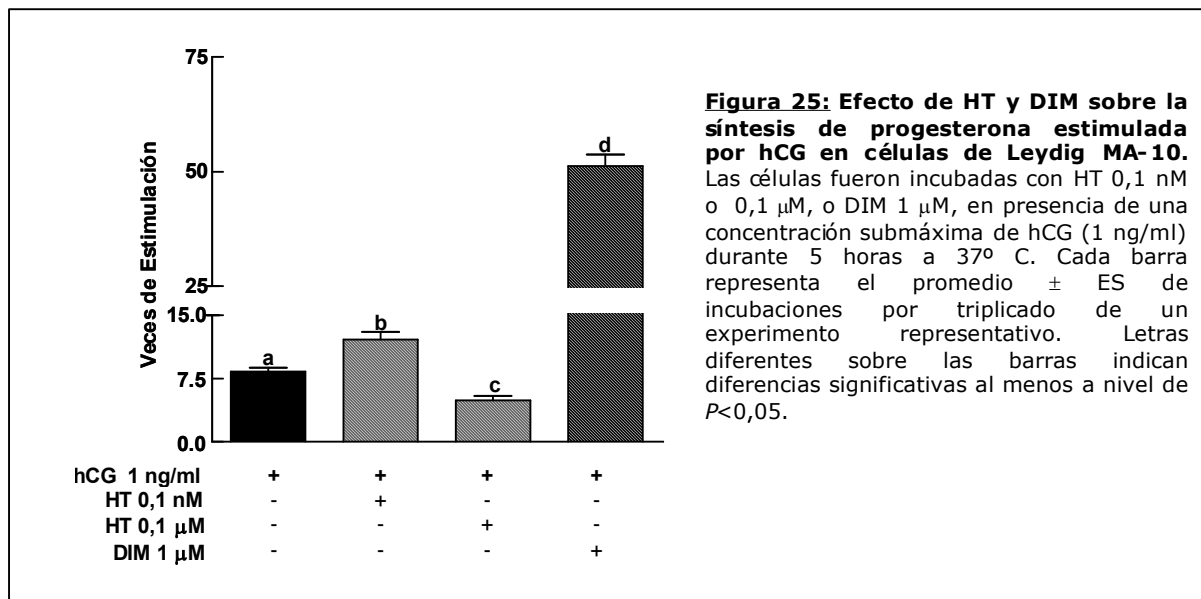
DIM, en cambio, estimuló la esteroidogénesis de manera dependiente de la concentración, alcanzando un máximo de 3 veces respecto del control en una concentración de 10^{-6} M (Figura 24). Este efecto fue más pronunciado que aquél descrito para HA 10^{-9} M o HT 10^{-10} M, que sólo estimularon la síntesis de esteroides 1,5 veces respecto del control.



Para llevar a cabo los experimentos que se detallan a continuación, se utilizaron las concentraciones de HT y DIM que tuvieron efecto sobre la esteroidogénesis basal: HT 10^{-10} M y 10^{-7} M, con acciones opuestas sobre la síntesis de esteroides, y DIM 10^{-6} M, capaz de inducir la máxima estimulación.

Efecto de HT y DIM sobre la síntesis de progesterona estimulada por hCG

Las células fueron incubadas con HT 10^{-10} M y 10^{-7} M (designadas a partir de aquí 0,1 nM y 0,1 μ M, respectivamente) o DIM 10^{-6} M (designada 1 μ M) en presencia de hCG 1 ng/ml durante 5 horas a 37° C. Los resultados se muestran en la figura 25.



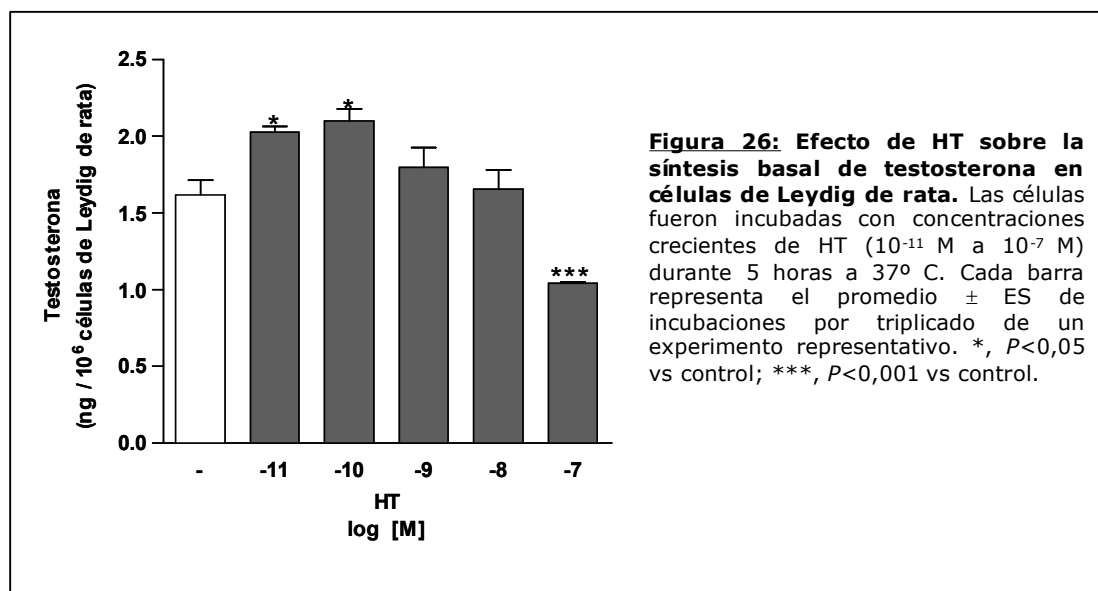
Se observa un efecto estimulador de HT 0,1 nM sobre la esteroidogénesis inducida por concentraciones submáximas de hCG, como ocurre en presencia de HA 10^{-9} M. Sin embargo, mientras que HA 10^{-9} M potencia la respuesta de las células a la hormona (4,6 veces respecto de hCG), HT sólo induce un modesto incremento (1,5 veces respecto de hCG). Por su parte, DIM 1μM ejerce un importante efecto estimulador, de mayor magnitud que el obtenido con HA 10^{-9} M (6 veces respecto de hCG).

Con respecto al efecto inhibitorio de HT 0,1 μM sobre hCG, los resultados son similares a aquéllos obtenidos en presencia de HA 10^{-5} M (45 y 50% de inhibición, respectivamente).

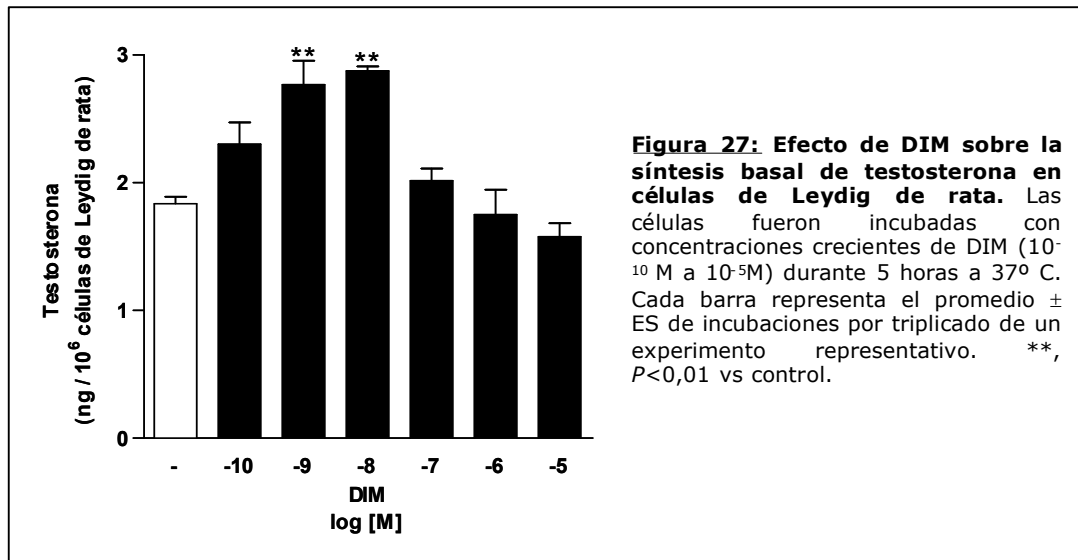
5.3.1.2. Efecto de agonistas de los subtipos de receptores HRH1 y HRH2 sobre la esteroidogénesis en células de Leydig de rata

Efecto de HT y DIM sobre la síntesis basal de testosterona

Nuevamente, a fin de validar los resultados obtenidos para la línea celular MA-10, las células de Leydig de rata fueron incubadas con concentraciones crecientes de HT (10^{-11} M a 10^{-7} M) o DIM (10^{-10} M a 10^{-5} M) durante 5 horas a 37° C. HT mostró un efecto dual sobre la síntesis basal de esteroides (Figura 26).



DIM, por su parte, estimuló la producción basal de testosterona de manera dependiente de la concentración, como se observó en la línea MA-10 sobre la síntesis de progesterona (Figura 27). Sin embargo, la figura muestra que la concentración de DIM con efecto estimulador sobre la esteroidogénesis en células de Leydig de rata es al menos dos órdenes menor que aquella con el mismo efecto en la línea MA-10.

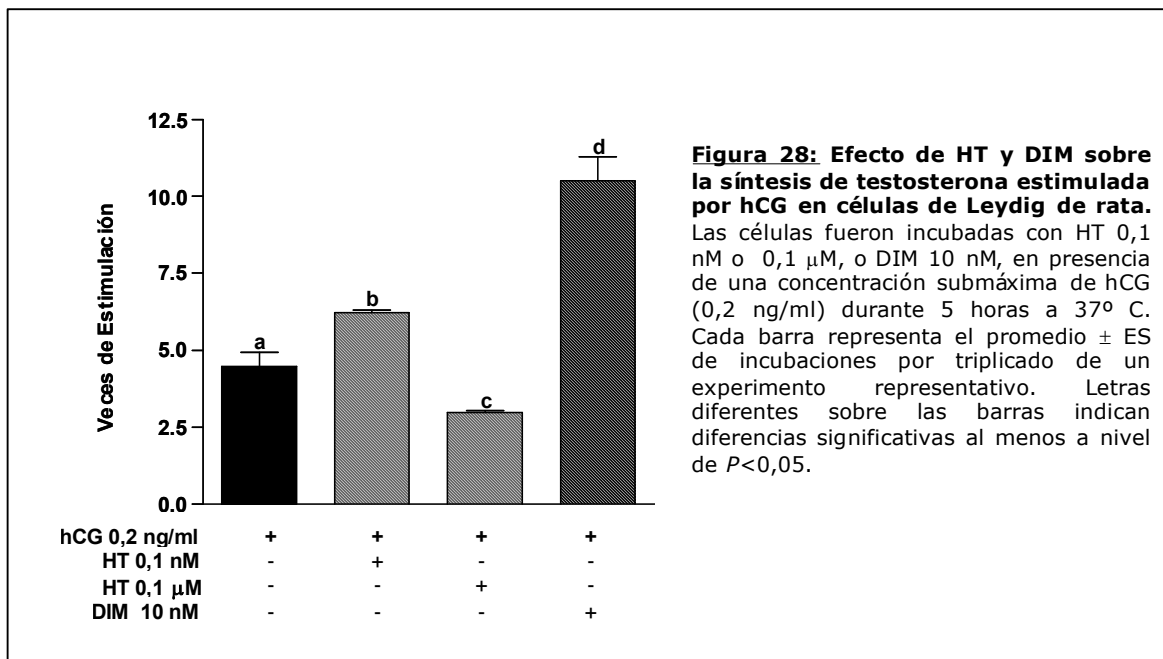


Efecto de HT y DIM sobre la síntesis de testosterona estimulada por hCG

Aplicando el mismo razonamiento que para la línea MA-10, se utilizaron las concentraciones de HT y DIM que tuvieron efecto sobre la esteroidogénesis basal: HT 10^{-10} M y 10^{-7} M, y DIM 10^{-9} M.

Las células fueron incubadas con HT (10^{-10} M ó 10^{-7} M, designadas en el gráfico 0,1 nM y 0,1 μ M, respectivamente) o DIM (10^{-9} M, designada 1 nM), en presencia de hCG 0,2 ng/ml durante 5 horas a 37° C. De igual modo que en la línea MA-10, HT 0,1 nM mostró un débil efecto estimulador sobre la esteroidogénesis inducida por concentraciones submáximas de la hormona (1,3 veces respecto de hCG). DIM 1 nM, por su parte, mostró un marcado efecto estimulador (2,5 veces respecto de hCG) de magnitud comparable a aquél descrito para HA 10^{-9} M en las mismas células (Figura 28).

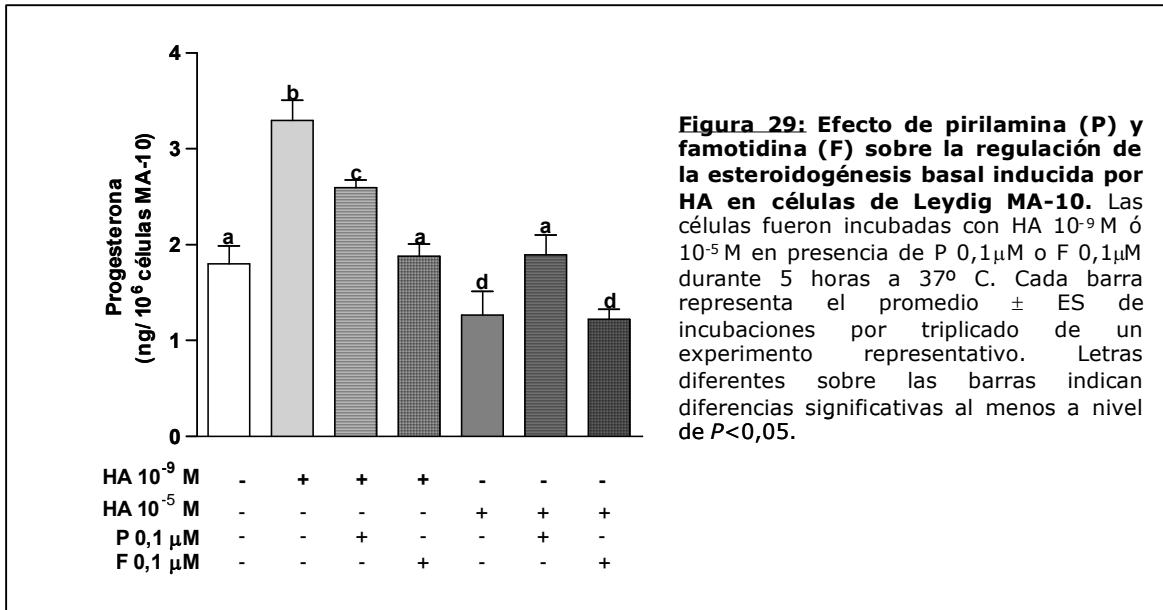
Con respecto al efecto inhibitorio de HT 0,1 μ M sobre hCG, los resultados son similares aquéllos obtenidos para la línea MA-10 (40% de inhibición).



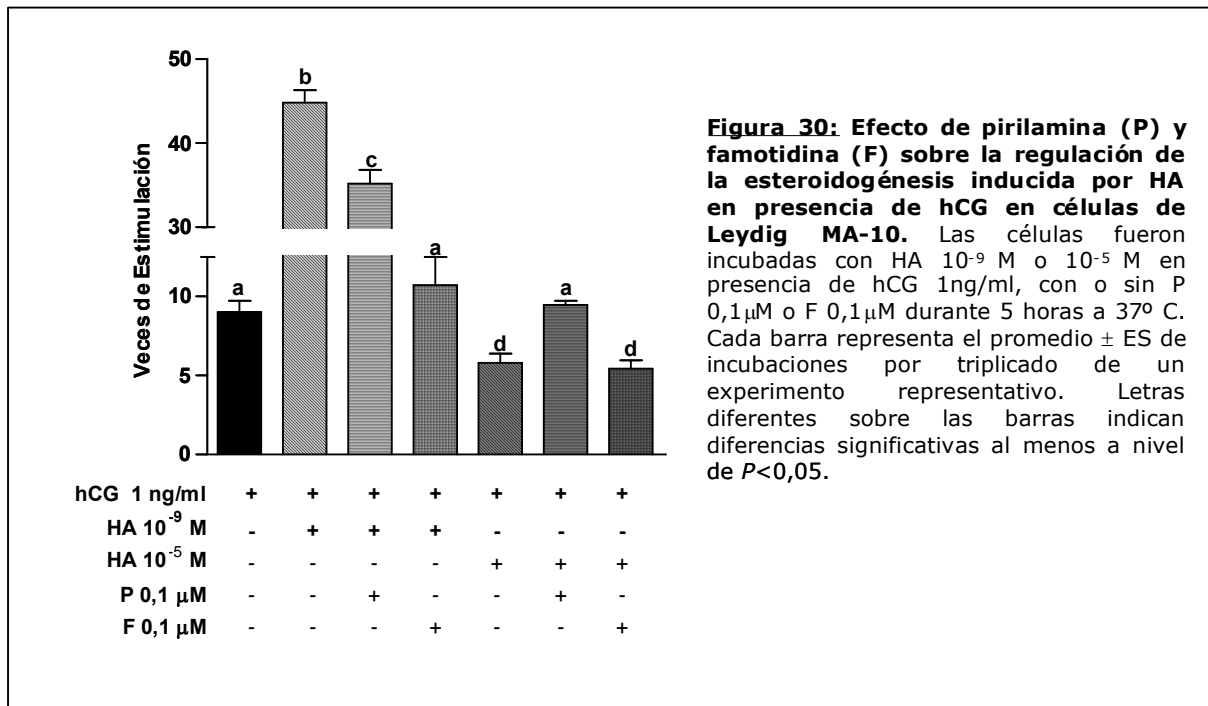
5.3.1.3. Efecto de antagonistas de los subtipos de receptores HRH1 y HRH2 sobre las acciones de HA en la línea celular MA-10

A fin de confirmar los resultados obtenidos en presencia de los agonistas HT y DIM, se investigó el efecto de antagonistas específicos HRH1 y HRH2 (pirilamina y famotidina, respectivamente) sobre las acciones de HA en células de Leydig. En este caso, se trabajó únicamente con la línea celular MA-10.

En primer término las células fueron incubadas con HA 10^{-9} M o HA 10^{-5} M, en ausencia o presencia de pirilamina o famotidina 0,1 μM (P y F, respectivamente) durante 5 horas a 37° C. La figura 29 muestra que el efecto inhibitorio de HA 10^{-5} M sobre la esteroidogénesis basal sólo se revierte completamente en presencia de P, mientras que F no es capaz de bloquear dicha inhibición. Por otra parte, la estimulación de la esteroidogénesis por HA 10^{-9} M se bloquea totalmente en presencia de F, mientras que sólo disminuye un 20% en presencia de P.



En otro grupo de experimentos, las células fueron incubadas con HA 10^{-9} M o 10^{-5} M, en presencia de hCG 1 ng/ml , con o sin P o F $0,1\mu\text{M}$ durante 5 horas a 37°C . La figura 30 muestra un perfil similar a aquél obtenido al evaluar el efecto de P y F sobre la regulación de la esteroidogénesis inducida por HA en ausencia de hCG.



5.3.2. ESTUDIO DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS INVOLUCRADOS EN EL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS POR HA

Sobre la base de los resultados hasta aquí descritos, el efecto estimulador de HA 10^{-9} M sobre la síntesis de esteroides en células de Leydig involucraría fundamentalmente la activación de HRH2. Por otra parte, la inhibición de la esteroidogénesis por HA 10^{-5} M estaría mediada únicamente por activación de HRH1.

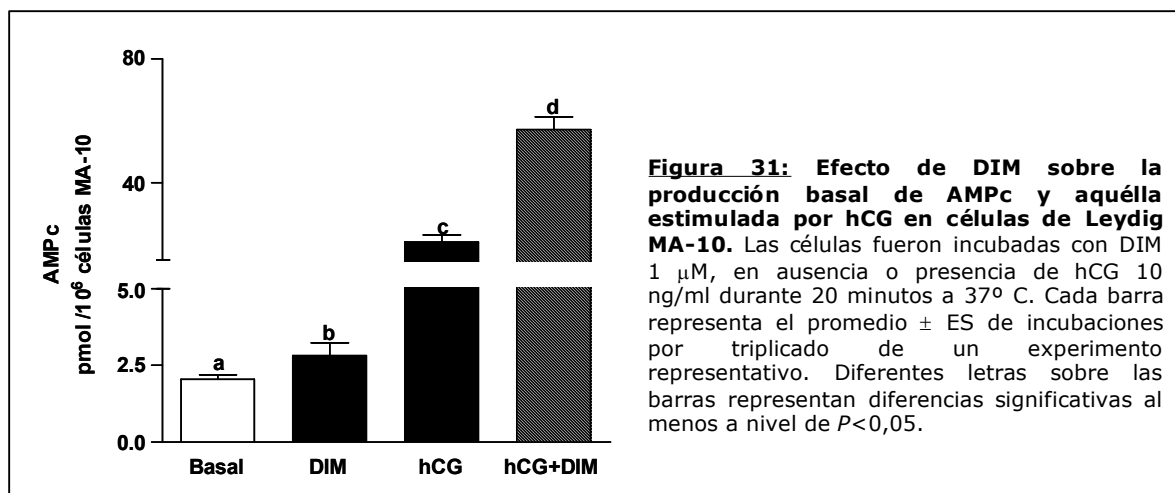
Para completar el estudio del mecanismo de regulación de la esteroidogénesis por HA en las células de Leydig, restaba caracterizar los segundos mensajeros asociados a la activación de HRH1 y HRH2. Para ello, se llevaron a cabo los experimentos que se detallan a continuación.

5.3.2.1. Mecanismo de estimulación de la esteroidogénesis: segundos mensajeros asociados a la activación de HRH2

Dosaje de AMPc intracelular en presencia de DIM 1 μ M

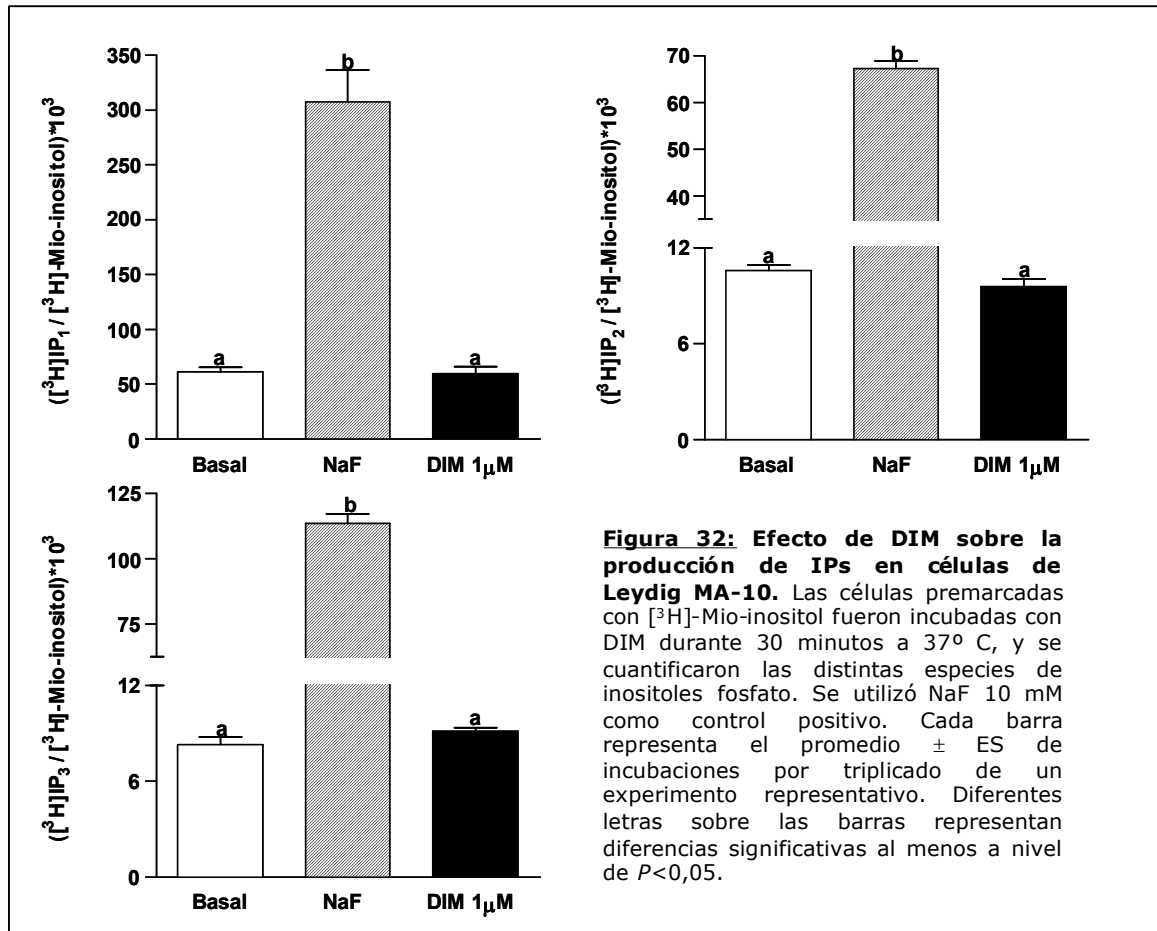
Como se indicó en la introducción, numerosos trabajos describen a HA como potente estimulador de la producción de AMPc a través de HRH2. Se investigó entonces la participación del nucleótido en la transducción de la señal de dicho subtipo de receptor. Para ello, se trabajó con DIM 1 μ M, concentración que mostró el máximo efecto estimulador sobre la esteroidogénesis.

Las células fueron incubadas con DIM 1 μ M en ausencia o presencia de hCG (10 ng/ml) durante 20 minutos, y se midieron los niveles de AMPc intracelular por RIA. La figura 31 muestra que DIM aumentó la producción basal de AMPc, como así también aquella estimulada por la hormona.



Dosaje de IPs en presencia de DIM 1 μ M

Dado que en algunos sistemas la activación de HRH2 podría conducir a un incremento en los niveles de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), también se estudió la posible participación de dicho segundo mensajero en la transducción de la señal de HRH2. Las células MA-10 fueron incubadas en presencia de DIM 1 μ M y se midieron los niveles de IP₁, IP₂ e IP₃. Como control positivo de reacción se utilizó fluoruro de sodio (NaF). No se observaron diferencias significativas respecto a los valores basales (Figura 32).



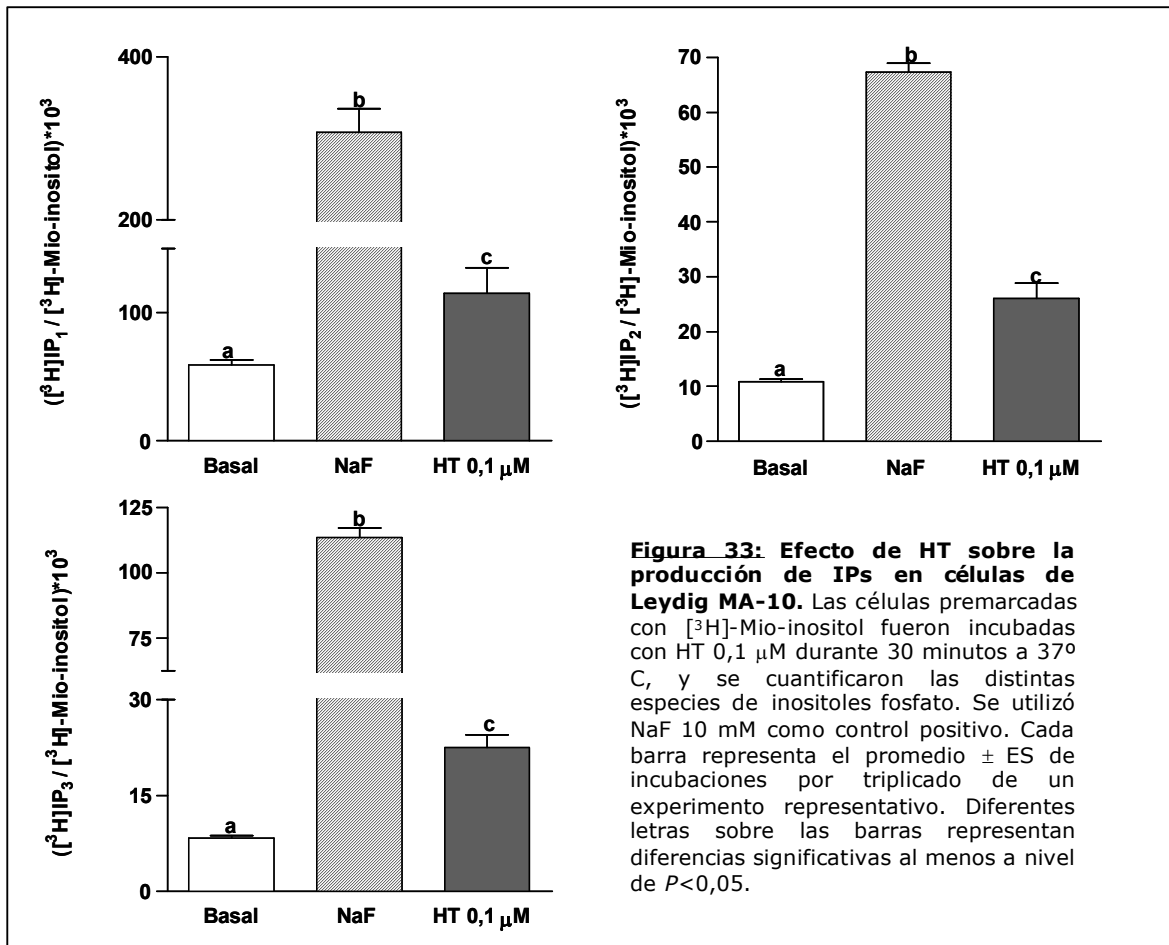
Sobre la base de los resultados obtenidos, la activación de HRH2 en células de Leydig estimularía la producción de AMPc, pero no de IP₃. Dado que un aumento en los niveles de AMPc conduce directamente a un incremento en la síntesis de esteroides en dichas células, estos resultados permitirían explicar, al menos en parte, el efecto estimulador de HA sobre la esteroidogénesis.

5.3.2.2. Mecanismo de inhibición de la esteroidogénesis: segundos mensajeros asociados a la activación de HRH1

Dosaje de IPs en presencia de HT 0,1 μM

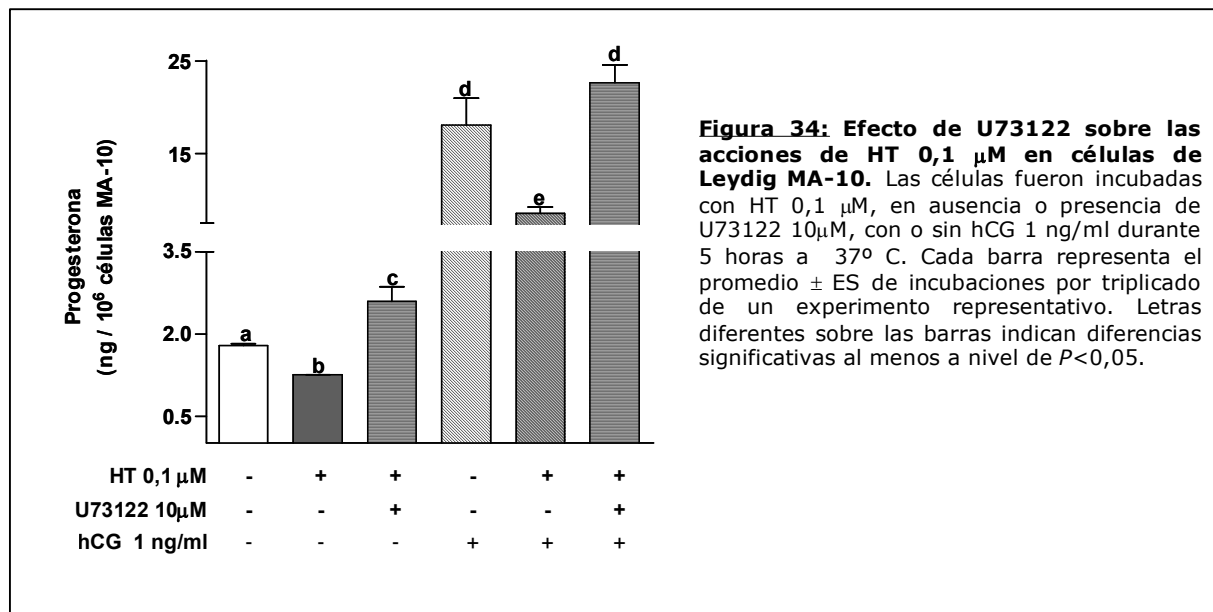
Como se describió previamente, la vía clásica de transducción reportada para el receptor HRH1 involucra la activación de PLC, con la consecuente producción de IP_3 y DAG, y la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares. Se estudió entonces la participación de IP_3 como segundo mensajero en la transducción de la señal de HRH1. Para ello, se trabajó con HT 0,1 μM concentración que mostró efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis basal y estimulada por hCG.

Las células MA-10 fueron incubadas en presencia de HT 0,1 μM , y se midieron los niveles de IP_1 , IP_2 e IP_3 . Los resultados se muestran en la figura 33. Se observa claramente un efecto estimulador sobre la producción basal de inositol fosfato (IP_1 , IP_2 e IP_3) en presencia del agonista.



Efecto de U73122, inhibidor de PLC, sobre la regulación de la esteroidogénesis por HT 0,1 μM

A fin de confirmar la participación de la vía antes descrita en el mecanismo de señalización de HRH1, se estudió el efecto de un inhibidor específico de PLC (U73122) sobre la regulación de la esteroidogénesis por HT 0,1 μM (Figura 34). Para ello, las células fueron incubadas con HT 0,1 μM, en ausencia o presencia de U73122 10 μM, con o sin hCG 1 ng/ml durante 5 horas a 37° C. Los resultados se presentan en la figura 34.

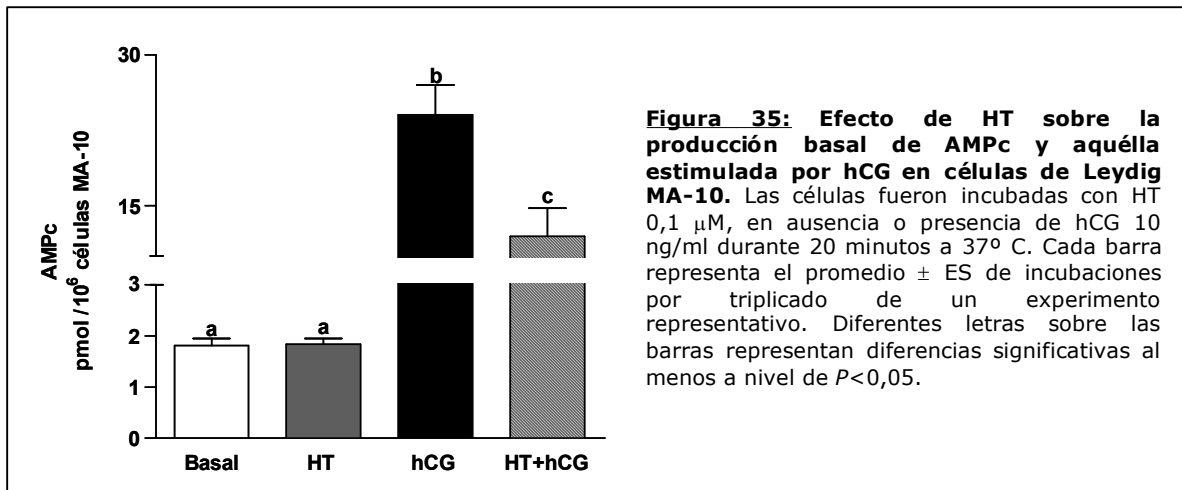


Se observa claramente que el efecto inhibitorio de HT 0,1 μM sobre la esteroidogénesis basal y estimulada por hCG se revierte totalmente en presencia de U73122.

Dosaje de AMPc intracelular en presencia de HT 0,1 μM

Así como un incremento en los niveles AMPc conduce a un aumento en la esteroidogénesis en células de Leydig, una disminución en dichos niveles debería tener un efecto negativo sobre el proceso esteroidogénico. Siguiendo este razonamiento, también se investigó la posibilidad de que HT 0,1 μM inhibiera la producción del segundo mensajero. Para ello, las células fueron incubadas con HT 0,1 μM en ausencia o presencia de hCG (10 ng/ml) durante 20 minutos, y se midieron los niveles de AMPc intracelular por RIA.

El agonista no modificó la producción basal de AMPc, pero disminuyó los niveles del segundo mensajero producidos en respuesta a la hormona (Figura 35).



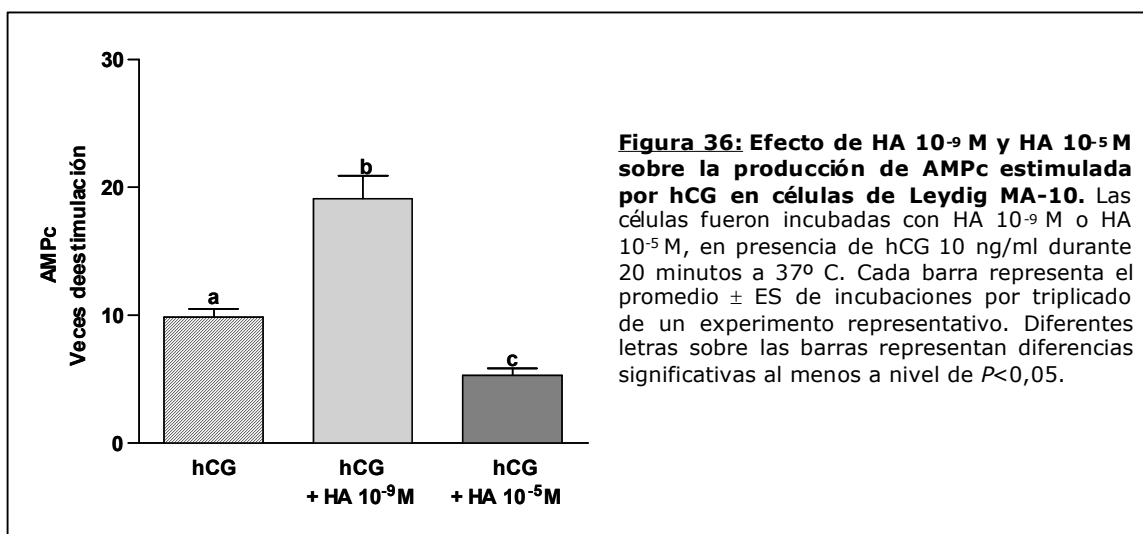
En conjunto, los resultados hasta aquí descriptos indican que el AMPc producido en respuesta a la activación de HRH2 en células de Leydig sería el principal responsable de los efectos estimulatorios de HA sobre la síntesis de esteroides. Por otra parte, la activación de la vía PLC/IP₃/Ca²⁺ en respuesta a la unión de la amina a HRH1, y la disminución en los niveles de AMPc estimulados por hCG, conducirían fundamentalmente a una inhibición de la síntesis de esteroides en dichas células.

Para confirmar esta hipótesis y, teniendo en cuenta que la mayor parte de los resultados fueron obtenidos a partir de experimentos utilizando agonistas, se evaluó tanto la producción de AMPc como de inosítoles fosfato en presencia de HA 10⁻⁹ M y HA 10⁻⁵ M.

5.3.2.3. Segundos mensajeros generados en respuesta a la activación de receptores histaminérgicos por HA

Dosaje de AMPc intracelular en presencia de HA 10⁻⁹ M o HA 10⁻⁵ M

Las células fueron incubadas con HA 10⁻⁹ M o HA 10⁻⁵ M, en ausencia o presencia de hCG (10 ng/ml) durante 20 minutos, y se midieron los niveles de AMPc intracelular por RIA. HA no modificó los valores basales de AMPc en ninguna de las concentraciones estudiadas (datos no mostrados). En cambio, la amina tuvo efecto sobre la producción de AMPc estimulada por hCG. Los resultados se muestran en la figura 36. HA 10⁻⁹ M aumentó la producción de AMPc estimulada por la hormona, mientras que para HA 10⁻⁵ M se observó un efecto inhibitorio.



Dosaje de IPs en presencia de HA 10⁻⁹ M o HA 10⁻⁵ M

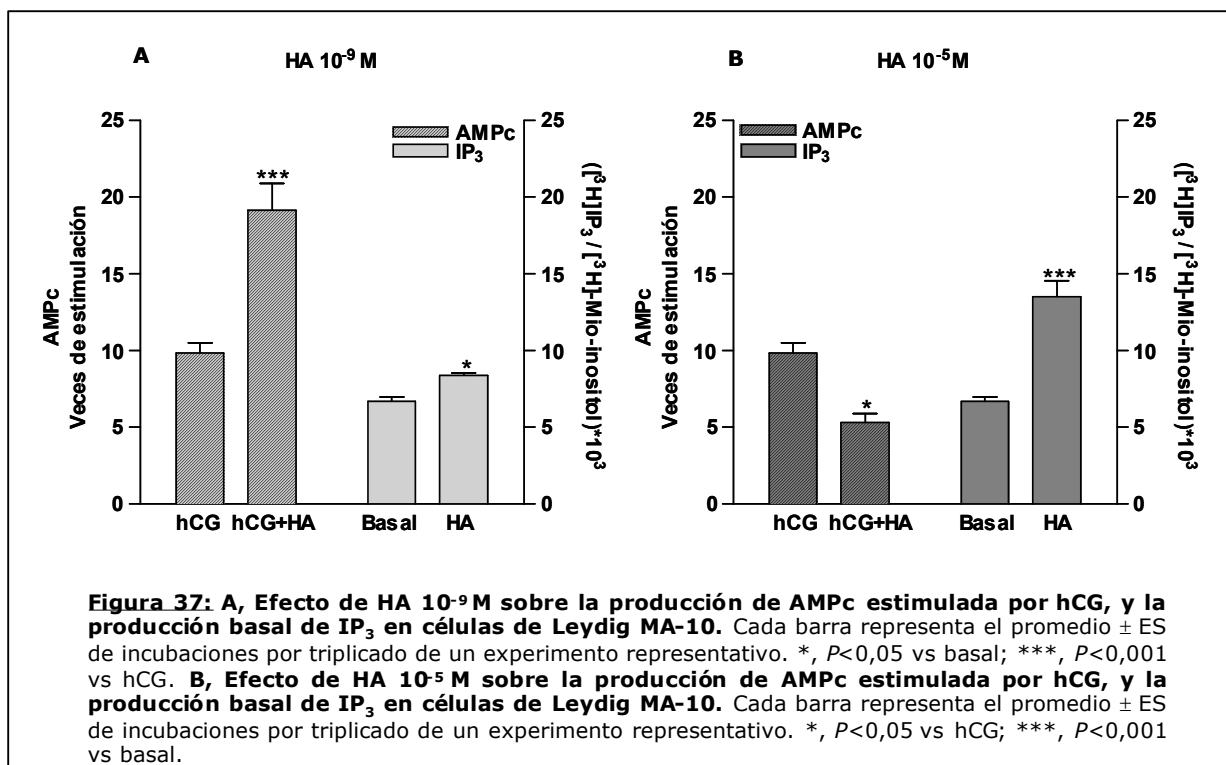
Las células MA-10 fueron incubadas en presencia de HA 10⁻⁹ M o HA 10⁻⁵ M, y se midieron los niveles de IP₁, IP₂ e IP₃. Los resultados se muestran en la tabla 3. Se observa que, si bien ambas concentraciones de la amina ejercen un efecto estimulador sobre la producción de inosítoles fosfato (IP₁, IP₂ e IP₃), la estimulación es significativamente mayor en presencia de HA 10⁻⁵ M.

Tabla 3: Efecto de HA sobre la producción de inosítoles fosfato en células de Leydig MA-10.

	([³ H]IP ₁ /[³ H]-Mio- inositol)*10 ³	([³ H]IP ₂ /[³ H]-Mio- inositol)*10 ³	([³ H]IP ₃ /[³ H]-Mio- inositol)*10 ³
Basal	36,04 ± 0,04 ^a	8,09 ± 0,15 ^a	6,68 ± 0,28^a
HA 10⁻⁹M	48,46 ± 0,19 ^b	10,31 ± 0,65 ^b	8,39 ± 0,18^b
HA 10⁻⁵M	75,58 ± 2,41^c	20,26 ± 0,36^c	13,53 ± 1,02^c

Las células premarcadas con [³H]-Mio-inositol fueron incubadas con HA 10⁻⁹ M o HA 10⁻⁵ M durante 30 minutos a 37° C, y se cuantificaron las distintas especies de inosítoles fosfato. Se muestra el promedio ± ES de incubaciones por triplicado de un experimento representativo. Diferentes letras en cada columna representan diferencias significativas al menos a nivel de $P < 0,05$.

La figura 37 resume en forma gráfica los resultados obtenidos para las dos concentraciones de HA estudiadas. Se muestra que HA 10⁻⁹ M induce un importante aumento en los niveles de AMPc producidos en respuesta a hCG, pero ejerce sólo un modesto efecto estimulador de la producción de IP₃ (Figura 37A). Por el contrario, HA 10⁻⁵ M inhibe la producción de AMPc estimulada por hCG, e incrementa notablemente los niveles de IP₃ (Figura 37B).



Nótese que se grafica el efecto de HA sobre la producción de AMPc inducida por hCG, mientras que para IP₃ se muestra la producción basal en comparación con aquella inducida por la amina. Al respecto, cabe aclarar que la estimulación de las células de Leydig MA-10 por LH/hCG no conduce a la activación de la vía PLC-IP₃-Ca²⁺ (Ascoli y col, 1989).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que AMPc es el principal segundo mensajero involucrado en el efecto estimulador de HA 10⁻⁹ M sobre la esteroidogénesis basal e inducida por LH/hCG en células de Leydig. A su vez, el aumento en la producción de IP₃ y la disminución en los niveles de AMPc producidos en respuesta a LH/hCG mediarían el efecto inhibitorio de HA 10⁻⁵ M sobre la estimulación inducida por la hormona.

Estas evidencias revelan la existencia de interacciones positivas y negativas entre las cascadas de señalización intracelular activadas por HA, y la vía clásica activada por LH/hCG, lo cual permitiría explicar el efecto dual de HA sobre las acciones de dicha hormona.

Los resultados descritos hasta aquí constituyen la primera evidencia de un efecto directo de HA sobre la biosíntesis de esteroides en células de Leydig a través de receptores específicos. Los mismos han sido publicados en forma parcial en la revista *Biology of Reproduction* (factor de impacto: 3,6) (Mondillo y col, 2005).

5.4. EL ÓXIDO NÍTRICO COMO MEDIADOR DE LAS ACCIONES DE HA 10⁻⁵ M SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS DE LEYDIG

La disminución en los niveles de AMPc producidos en respuesta a hCG permitía explicar, al menos en parte, el efecto inhibitorio de HA 10⁻⁵ M sobre la síntesis de esteroides inducida por la hormona. Sin embargo, restaba caracterizar el mecanismo de inhibición de la esteroidogénesis basal, ya que la amina no fue capaz de modificar la producción basal del segundo mensajero, como así tampoco HT 0,1 μM. Por otra parte, el hecho que HA 10⁻⁵ M disminuya la respuesta esteroidogénica a dbAMPc sugería la existencia de al menos un sitio de inhibición adicional, en algún paso posterior a la producción del segundo mensajero.

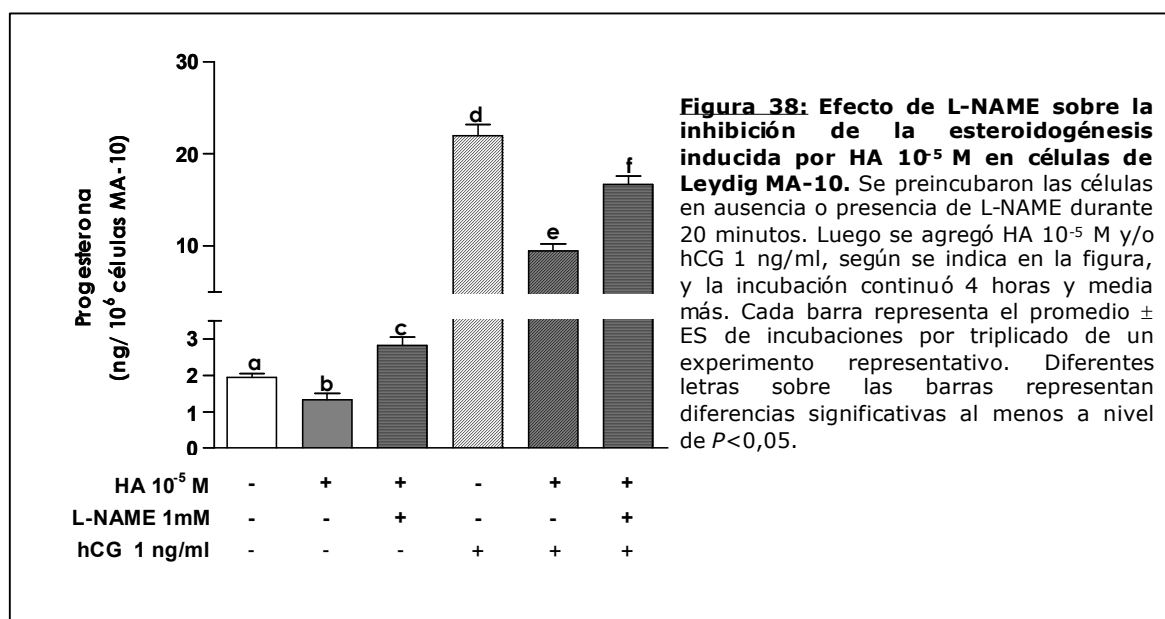
A su vez, evidencias previas del laboratorio señalaban que NO es capaz de inhibir la síntesis de esteroides en células de Leydig, actuando a nivel de enzimas dependientes de citocromo P450 involucradas en el camino esteroidogénico (Del Punta y col, 1996; Reche, 2005). Más aún, en el laboratorio pudo también detectarse actividad basal de NOS en dichas células (Reche, 2005).

Sumado a lo expuesto, numerosos trabajos reportaban una posible relación entre HA y NO en distintos sistemas (Li y col, 2003; Borda y col, 2002; Lázár-Molnár, 2004). Así, resultó de interés investigar la participación de NO en el mecanismo de inhibición de la esteroidogénesis por HA 10^{-5} M. Para ello, se llevaron a cabo los experimentos que se describen a continuación.

5.4.1. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE NO EN EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS POR HA EN LA LÍNEA CELULAR MA-10

5.4.1.1. Efecto de L-NAME, inhibidor específico de la enzima óxido nítrico sintasa, sobre las acciones de HA 10^{-5} M

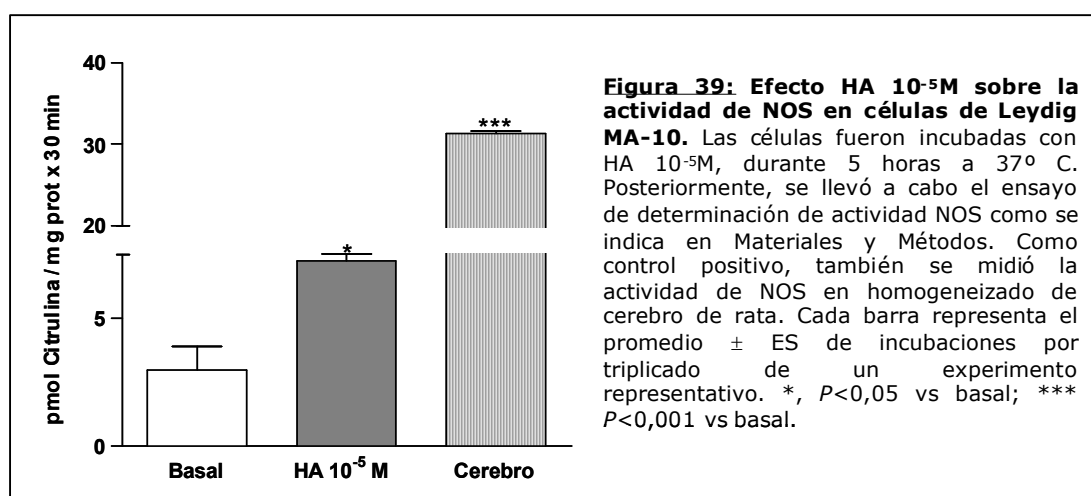
Las células fueron incubadas en ausencia o presencia de L-NAME durante 20 minutos, y luego se agregó HA 10^{-5} M y/o hCG 1 ng/ml en el medio de incubación, según se indica en la figura 38. La incubación continuó en estas condiciones durante 4 horas y media.



Se observa en la figura que L-NAME revierte el efecto inhibitorio de la amina sobre la esteroidogénesis basal, y reduce un 60% la inhibición de la síntesis de progesterona estimulada por hCG. Estas evidencias sugieren la participación de NO en el mecanismo de acción de HA 10^{-5} M en células MA-10.

5.4.1.2. Efecto de HA 10^{-5} M sobre la actividad de NOS

Teniendo en cuenta lo observado en presencia de HA 10^{-5} M y L-NAME, resultó de interés evaluar la posibilidad de que HA 10^{-5} M aumente la actividad de NOS en las células MA-10. Para ello, las células fueron incubadas en presencia de HA 10^{-5} M durante 5 horas a 37° C, luego de lo cual se llevó a cabo el ensayo de determinación de actividad de NOS, como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.2.6.). Se observó un aumento de la actividad de la enzima en presencia de HA 10^{-5} M (Figura 39).



5.4.1.3. Efecto de HA 10^{-5} M sobre la actividad de las enzimas del camino esteroidogénico

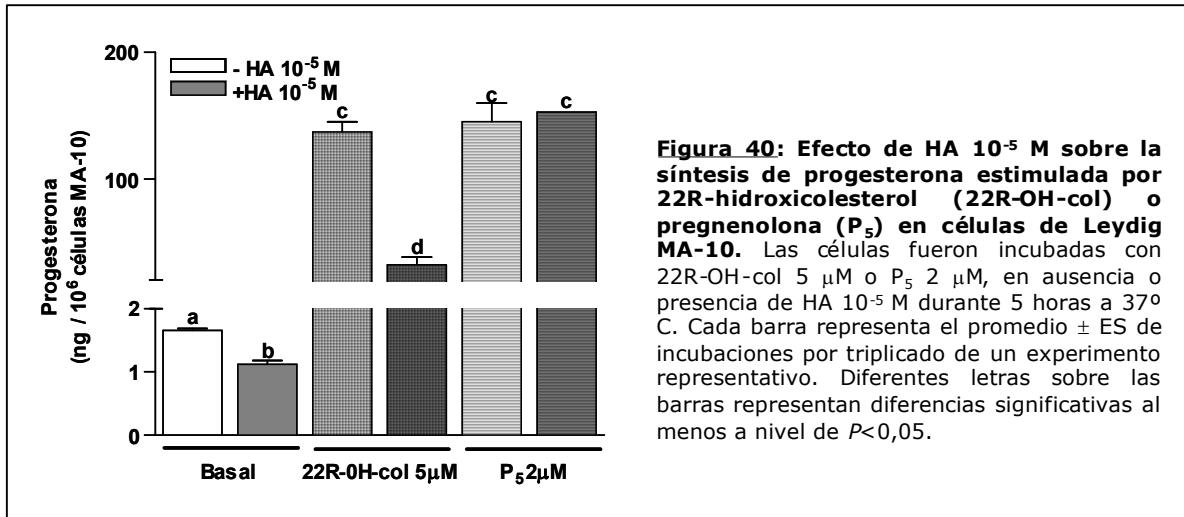
Como se indicó al principio de esta sección, evidencias previas del laboratorio señalaban que el efecto inhibitorio del NO sobre el camino esteroidogénico en células de Leydig ocurriría a nivel de enzimas dependientes

de citocromo P450, fundamentalmente CYP11A. A su vez, los resultados obtenidos en presencia de HA 10^{-5} M y dbAMPc sugerían la existencia de al menos un sitio de inhibición de HA a nivel de algún paso posterior a la producción de AMPc.

A fin de sumar evidencias a favor de la participación de NO en el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis por HA 10^{-5} M, se diseñaron experimentos tendientes a identificar el/los sitio/s de inhibición de la amina sobre el camino esteroidogénico.

22R-hidroxicolesterol (22R-OH-C-Col) es un análogo permeable del colesterol que, a diferencia de este último, no necesita de sistemas de transporte para atravesar las membranas mitocondriales. Pregnenolona, por su parte, es precursor inmediato de progesterona. Así, la incubación de las células en presencia de estos metabolitos permitiría evaluar, de manera indirecta, el efecto de HA 10^{-5} M sobre la actividad de las enzimas CYP11A y 3β HSD (ver Biosíntesis de testosterona en células de Leydig, sección 1.6.1., figura 9). Cabe recordar que, en células MA-10, la actividad de la enzima CYP17 es deficiente, por lo que el camino esteroidogénico se interrumpe a nivel de progesterona.

Las células fueron incubadas con 22R-OH-Col 5 μ M o P₅ 2 μ M, en ausencia o presencia de HA 10^{-5} M durante 5 horas a 37° C. Los resultados se muestran en la figura 40. Se observa claramente que, cuando se utilizó 22R-OH-Col como sustrato para la esteroidogénesis, HA 10^{-5} M produjo una inhibición significativa de la síntesis de progesterona, mientras que la amina no tuvo efecto sobre la estimulación inducida por P₅. Estos resultados indican que, en células MA-10, HA 10^{-5} M inhibe la conversión de colesterol a pregnenolona, pero no tiene efecto sobre el paso inmediato posterior del camino esteroidogénico, en concordancia con las evidencias previas del laboratorio respecto al sitio de acción del NO.

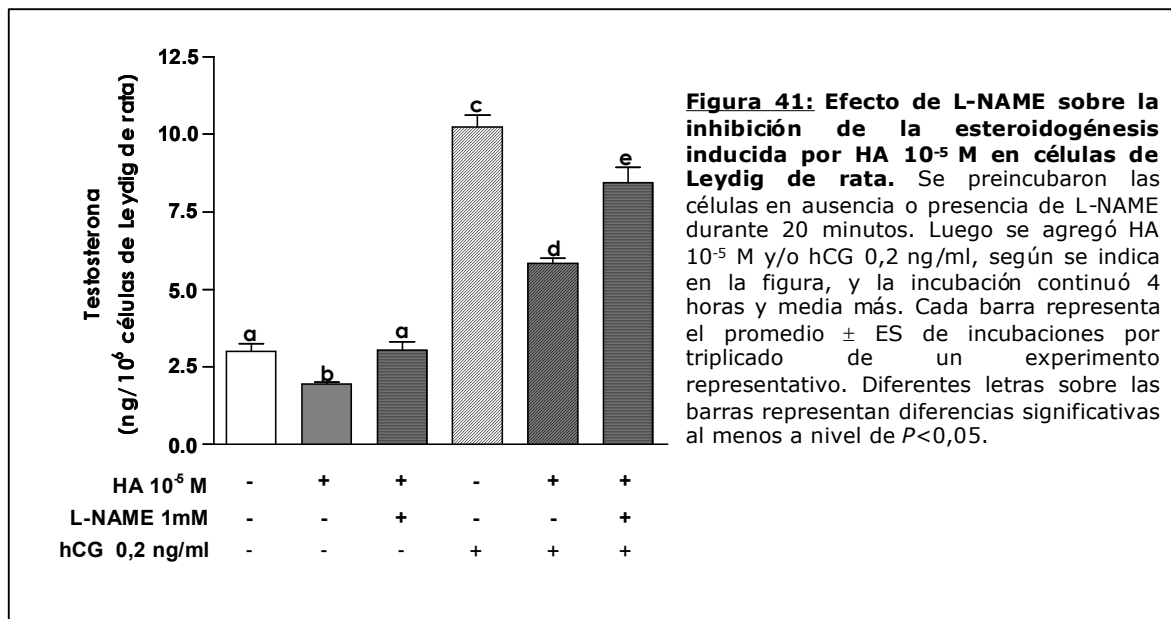


5.4.2. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE NO EN EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS POR HA EN CÉLULAS DE LEYDIG DE RATA

5.4.2.1. Efecto de L-NAME, inhibidor específico de NOS, sobre las acciones de HA 10⁻⁵ M

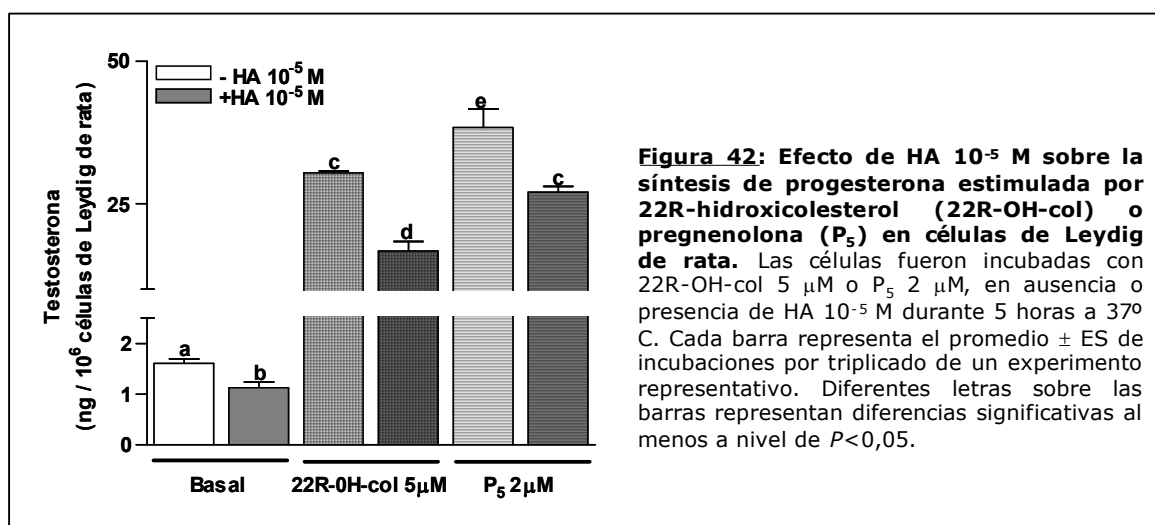
A fin de validar los resultados obtenidos para la línea celular MA-10, las células de Leydig de rata fueron incubadas en ausencia o presencia de L-NAME durante 20 minutos a 37° C, y luego se agregó HA 10⁻⁵ M y/o hCG 0,2 ng/ml en el medio de incubación, según se indica en la figura 41. La incubación continuó en estas condiciones durante 4 horas y media.

De igual modo que para las células MA-10, L-NAME revirtió el efecto inhibitorio de 10⁻⁵ M sobre la esteroidogénesis basal, y redujo un 59% la inhibición de la síntesis de progesterona estimulada por hCG.



5.4.2.2. Efecto de HA 10⁻⁵ M sobre la actividad de las enzimas del camino esteroidogénico

Aplicando el mismo razonamiento que para la línea MA-10, las células de Leydig de rata fueron incubadas con 22R-OH-Col 5 μM o P₅ 5 μM, en ausencia o presencia de HA 10⁻⁵ M. La figura 42 muestra resultados similares a los obtenidos para la línea celular, excepto por el efecto de HA 10⁻⁵ M sobre la estimulación producida por P₅. En este caso, HA 10⁻⁵ M inhibió la síntesis de testosterona.



Los resultados descriptos sugieren que, en células de Leydig de rata, HA 10^{-5} M inhibiría tanto la síntesis de pregnenolona como algún paso enzimático posterior a la producción de dicho metabolito en el camino esteroideogénico. Sobre la base de las evidencias previas del laboratorio respecto al NO y los resultados obtenidos en presencia de L-NAME, es posible que dicho paso involucre la enzima CYP17, dependiente de citocromo P450.

5.5. BIOSÍNTESIS DE HISTAMINA EN CÉLULAS DE LEYDIG

Si bien la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento señalan a los mastocitos como fuente productora de HA en el testículo, evidencias recientes sugieren que los espermatozoides también podrían sintetizar la amina (Safina y col, 2002).

Resultó por lo tanto interesante evaluar la posibilidad de que HA pudiera ser producida por las propias células de Leydig, actuando así como regulador autocrino y/o paracrino de la esteroideogénesis.

5.5.1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA ENZIMA L-HISTIDINA DESCARBOXILASA EN LA LÍNEA CELULAR MA-10

Trabajando en colaboración con el grupo de la Dra. Elena Rivera (Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA), se llevaron a cabo experimentos tendientes a determinar actividad basal de HDC en células MA-10. Como se indicó en la Introducción (ver sección 1.7.1.1.), HDC es la única enzima productora de HA en células de mamíferos.

Las células mantenidas en cultivo durante tres días se procesaron como se indica en Materiales y Métodos (sección 4.2.8.), y luego se llevó a cabo el ensayo de determinación de actividad de HDC, midiendo el $^{14}\text{CO}_2$ liberado a partir de la descarboxilación específica de L-carboxyl- ^{14}C -histidina. En la figura 43A se presenta el valor obtenido para la actividad basal de HDC en células MA-10. Este último está en el orden de lo reportado para otros sistemas, como glándula mamaria y estómago (Sieja y col, 2005; Thiebaut y col, 1985).

También se realizaron ensayos para determinar expresión de la enzima. En este caso, se trabajó en colaboración con la Dra. Hargita Hegyesi, del grupo del Dr. Andras Falus (Departamento de Genética, Biología Celular e Inmunobiología, Universidad Semmelweis de Medicina, Budapest, Hungría).

Las células mantenidas en cultivo durante tres días se procesaron como se indica en Materiales y Métodos (sección 4.2.7.1.), y los extractos celulares se emplearon para llevar a cabo ensayos de western blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-HDC, y un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. El revelado permitió visualizar dos bandas, correspondientes a las dos formas de HDC (74 y 53 KDa), como se muestra en la figura 43B.

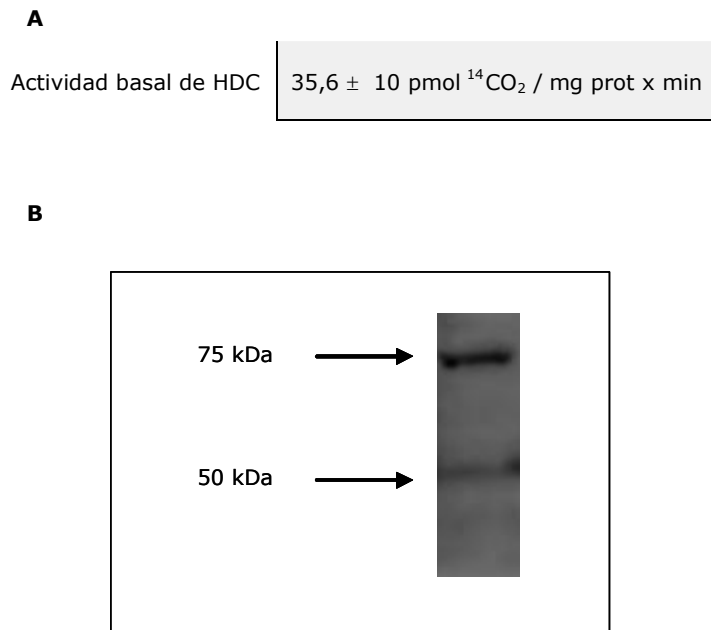


Figura 43: A, Actividad basal de HDC en células MA-10. Las células fueron mantenidas en cultivo durante tres días a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Luego se procesaron y se llevó a cabo el ensayo de determinación de actividad de HDC como se indica en Materiales y Métodos. **B, Expresión de HDC en células MA-10.** Las células mantenidas en cultivo durante tres días se procesaron como se indica en Materiales y Métodos, y los extractos celulares obtenidos se emplearon para el ensayo de Western Blot. La autorradiografía muestra dos bandas, de 74 y 53 KDa.

5.5.2. DETECCIÓN DE CONTENIDO ENDÓGENO DE HA EN LA LÍNEA MA-10 Y EN CÉLULAS DE LEYDIG DE RATA

A fin de confirmar los resultados descriptos más arriba, se llevaron a cabo experimentos tendientes a detectar contenido endógeno de HA en las células MA-10. Se empleó la técnica de inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo específico anti-HA y un segundo anticuerpo conjugado con FITC, ambos cedidos gentilmente por la Dra Elena Rivera. Como control negativo, el ensayo también se llevó a cabo en células de la línea U937, que expresan HDC y por lo tanto, no producen HA (Dy M y col, 1999).

El contenido endógeno de HA se visualizó como una intensa fluorescencia verde en el citoplasma y núcleo de las células MA-10, como se muestra en la figura 44, panel A. No se detectó fluorescencia verde en la línea U937 (Figura 44, panel C). Nótese que el panel D de la misma figura muestra los núcleos de las células U937, visualizados por tinción con bromuro de etidio (agente intercalante del ADN) y posterior exposición a luz UV.

Con el objeto de validar los resultados obtenidos para la línea MA-10, se llevó a cabo el ensayo en células de Leydig de rata. Se observó emisión de fluorescencia verde, de igual modo que para la línea celular (Figura 44, panel B).

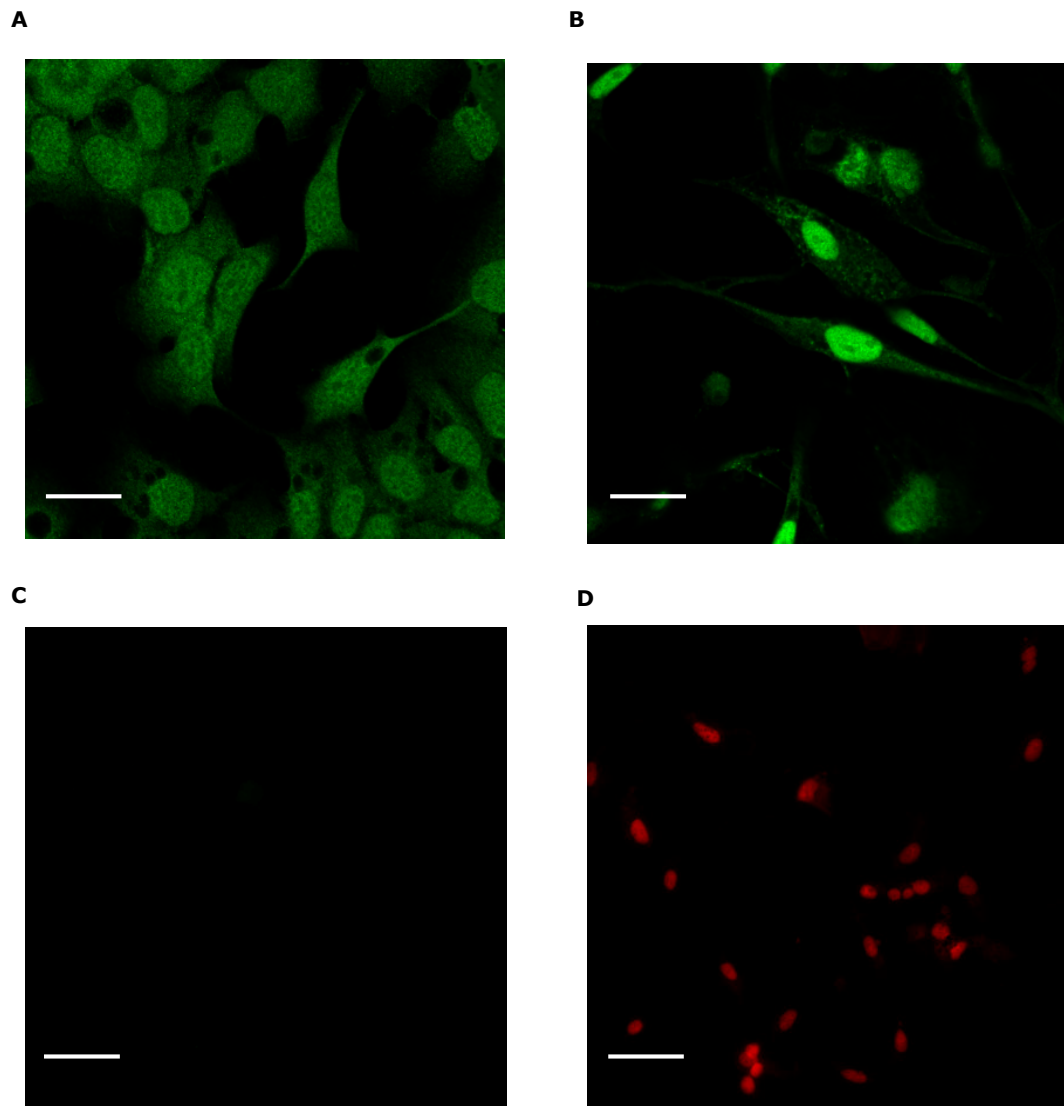
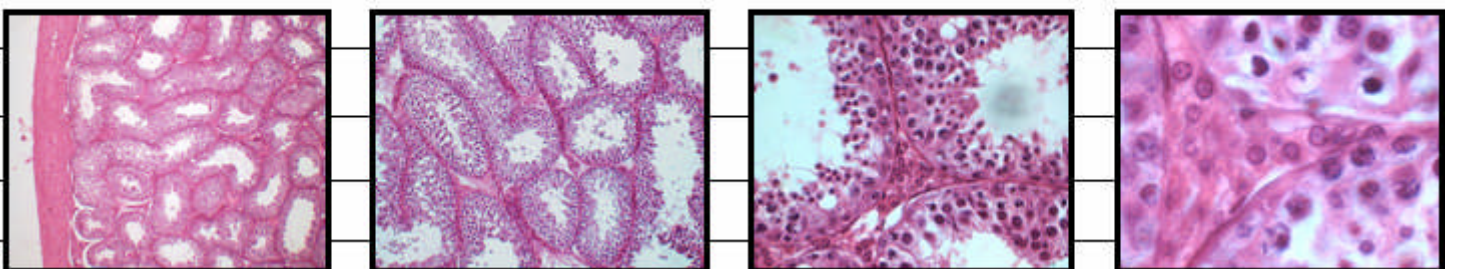


Figura 44: Inmunocitoquímica para detección de contenido endógeno de HA. Las células previamente fijadas y permeabilizadas fueron incubadas con un primer anticuerpo específico anti-HA, y un segundo anticuerpo conjugado con FITC. La visualización de la fluorescencia verde se realizó mediante un microscopio láser confocal. **A**, Línea celular MA-10 (60X, barra=19,5 μm); **B**, Células de Leydig normales de rata (60X, barra=16 μm); **C**, Línea celular U937 (40X, barra= 50 μm); **D**, Línea celular U937 (40X, barra= 50 μm) Tinción: Bromuro de etidio.

DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

Los mastocitos están ampliamente distribuidos en el organismo, siendo elementos constitutivos de tejido conectivo y mucosas de diversos órganos. Son bien conocidos por su participación en procesos inflamatorios y reacciones de hipersensibilidad. Sin embargo, también juegan un papel relevante en múltiples funciones fisiológicas. Al respecto, se ha reportado que los mastocitos contribuirían a la regulación local de la funcionalidad de diversas glándulas endocrinas, como ovario, tiroides, y adrenales. En el testículo normal de rata adulta, los mastocitos residen bajo la túnica albugínea, rodeando los vasos sanguíneos (Gaytan y col, 1990). En el hombre, también se localizan en la región intersticial (Albrecht y col, 2005). Sin embargo, el papel preciso de estos mastocitos en condiciones fisiológicas no ha sido dilucidado. Más aún, de los numerosos tipos celulares presentes en la glándula, los mastocitos constituyen posiblemente el menos estudiado.

El citoplasma de un mastocito maduro está ocupado por gránulos, generalmente en número de 1000 y con un volumen promedio de $0,3 \mu\text{m}^3$. Contiene típicamente 0,5 a 3 pg/célula de HA (Watt y Ennis, 2004). Existen numerosos agentes capaces de inducir la degranulación de mastocitos, y la consecuente liberación de HA. Dichos agentes incluyen análogos de LHRH y LH (Mayerhofer y col, 1989). Como se indicó previamente, este efecto tiene significado fisiológico en el ovario: HA jugaría un papel importante en la regulación de la ovulación y el flujo sanguíneo a la gónada (Schmidt y col, 1990). Además, se ha reportado que HA estimula la síntesis de estradiol en células de granulosa humanas (Bodis y col, 1993), como así también la producción de progesterona en folículos preovulatorios de rata (Schmidt y col, 1987).

Con respecto al testículo, la posibilidad de que HA desempeñe un papel activo como modulador de la esteroidogénesis no ha sido investigada en

profundidad. Hasta el momento, existe un único trabajo en la bibliografía que sugiere una posible función paracrina de HA sobre la síntesis de esteroides testiculares. Mayerhofer y colaboradores demostraron que la amina es capaz de estimular la producción de testosterona y progesterona en parénquima testicular de hámster inmaduro, presumiblemente actuando a través de receptores HRH1 (Mayerhofer y col, 1989). Sin embargo, no se ha establecido si el efecto descrito se produce por acción directa de HA, o si se requiere de otro/s intermediario/s que regulen finalmente la síntesis de esteroides en las células de Leydig.

En este contexto, en el presente trabajo se evaluó la posible interrelación entre las células de Leydig y los mastocitos para modular las acciones de LH, investigando en particular los efectos de HA sobre la regulación paracrina y/o autocrina del proceso esteroidogénico. Al respecto, si bien LH hipofisaria es el factor trófico fundamental para la síntesis de andrógenos, la interacción de las células de Leydig con las diferentes poblaciones presentes en la glándula cumple un rol crítico en el mantenimiento y control de las funciones gonadales (Saez, 1994).

Utilizando ligandos radiactivos específicos, se determinó la presencia de los subtipos de receptores HRH1 y HRH2 en la línea celular MA-10 y en células de Leydig de rata. Los parámetros cinéticos obtenidos en cada caso están dentro del rango de valores reportados para otros sistemas, excepto por el número de sitios HRH2 en células MA-10 (Davio y col, 1994; Foreman y col, 1985; Hattori y col, 1991; Noris y col, 1995; Yamashita y col, 1991). Sin embargo, esto no afectó la capacidad de respuesta de dichas células a HA (ver más adelante).

Previamente, Fitzsimons y colaboradores detectaron expresión de ARNm de HRH2 en testículos de ratones $Hdc^{-/-}$ sometidos a una dieta carente de HA, pero no en ratones $Hdc^{-/-}$ alimentados con dieta libre, o en ratones de genotipo salvaje (Fitzsimons y col, 2001). Por su parte, Nemetallah y colaboradores reportaron la presencia de HRH1 en cápsula testicular de conejo y rata (Nemetallah y col, 1983). Sin embargo, en ningún caso se determinó qué tipos celulares expresan los receptores histaminérgicos en cuestión. Debido a que los resultados de este trabajo fueron obtenidos a partir de ensayos con células de Leydig de rata aisladas y purificadas, puede afirmarse que constituyen la primera evidencia directa de la existencia de receptores de HA en la membrana de un tipo celular específico del testículo, y también en la línea celular MA-10. En concordancia con los resultados descritos, Albrecht y colaboradores han reportado recientemente la expresión de ARNm de HRH1 y HRH2 en células de Leydig de testículo humano, como así también en células derivadas de las regiones germinal y peritubular (Albrecht y col, 2005).

HA mostró un claro efecto dual sobre la esteroidogénesis basal y estimulada por gonadotropinas, tanto en la línea MA-10 como en células de Leydig de rata. Dicho efecto resultó estimulador para HA 1 nM, e inhibitorio para HA 10 μ M. Estos resultados difieren parcialmente de los obtenidos por Mayerhofer y colaboradores en hámster, dado que en dicho modelo experimental concentraciones nanomolares de HA no tuvieron efecto sobre la esteroidogénesis, mientras concentraciones de orden micromolar mostraron un efecto estimulador (Mayerhofer y col, 1989). Los experimentos en parénquima testicular no son directamente comparables a aquéllos en células de Leydig aisladas y purificadas, dada la presencia de otros tipos celulares además de células de Leydig en el primer caso. Por otra parte, no existe hasta el momento evidencia directa de la presencia de receptores histaminérgicos en células de Leydig de hámster. Sin embargo, podría postularse que las células de Leydig de

hámster tienen una sensibilidad más baja a HA que las de ratón o rata, y por lo tanto sólo responden a concentraciones más elevadas de la amina.

En concordancia con los resultados de este trabajo, se ha reportado acción dual de HA en otros sistemas (Mikkelsen y col, 1984; Martinez y col, 2000). Desde una perspectiva fisiológica, el hecho que HA ejerza efectos opuestos sobre la esteroidogénesis podría contribuir a la homeostasis de los niveles de esteroides en el testículo. También existen evidencias de que HA modularía la esteroidogénesis testicular *in vivo*. Al respecto, Pap y colaboradores han señalado que la deficiencia de HA en ratones *Hdc^{-/-}* conduce a una alteración en los niveles de esteroides séricos e intratesticulares, en comparación con ratones de genotipo salvaje. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de ARNm de GnRH hipotalámico entre ambos grupos (Pap y col, 2002).

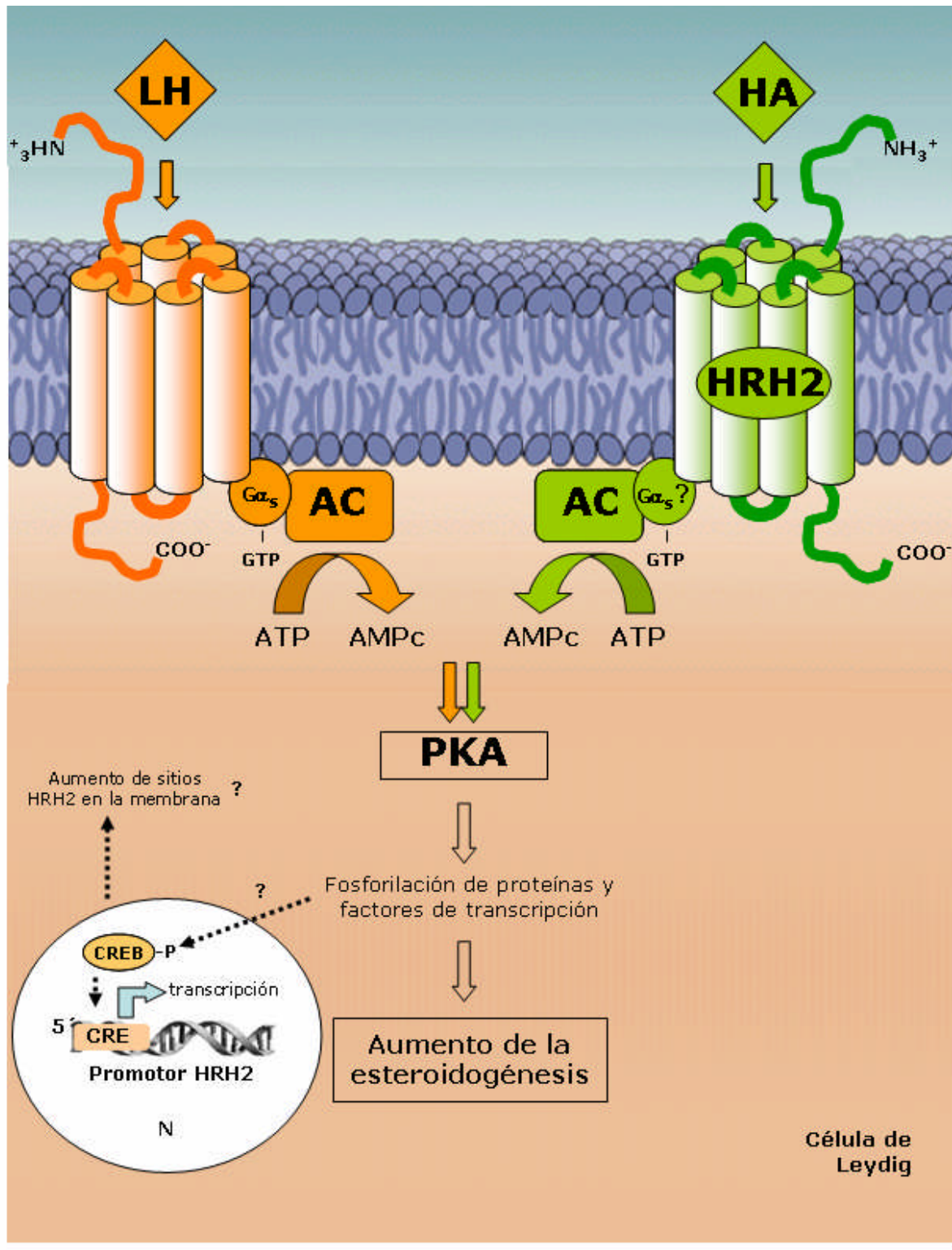
Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos realizados empleando agonistas y antagonistas HRH1 y HRH2, los efectos estimulatorios sobre la esteroidogénesis observados en presencia de HA 10^{-9} M se deberían fundamentalmente a la activación de HRH2 y el aumento en los niveles de AMPc. Podría postularse el acoplamiento de HRH2 a una proteína G_s en células de Leydig, tal como ocurre en la mayoría de los sistemas estudiados (Leurs y col, 1995).

Debido a que no se observó estimulación de la producción de IP_3 en respuesta a la activación de HRH2 por un agonista específico, se asume que dicho segundo mensajero no estaría involucrado en el mecanismo de transducción de señales de HRH2. No se descarta, sin embargo, la activación de otras vías de señalización intracelular.

Sobre la base de los resultados descritos y, dado que AMPc es el segundo mensajero clásico de LH/hCG, la activación de HRH2 por HA contribuiría al efecto estimulador de la hormona sobre la esteroidogénesis en células de Leydig, incrementando los niveles del nucleótido producidos en respuesta a concentraciones submáximas de la misma. Así, HA 10^{-9} M jugaría un papel como modulador positivo de las acciones de LH/hCG sobre la síntesis de esteroides testiculares.

A su vez, se ha reportado que la región no codificante en el extremo 5' del gen de HRH2 contiene secuencias CRE (elemento de respuesta a AMPc) (Del Valle y Gantz, 1997). Por su parte, células MA-10 transfectadas con un plásmido conteniendo el gen reportero de la luciferasa bajo el control de una secuencia CRE, mostraron aumento en la transcripción de dicho gen en presencia de LH y 8Br-AMPc (Arai y col, 2005). Así, podría postularse que LH/hCG induciría la transcripción del gen de HRH2, posiblemente mediante la activación de PKA y posterior fosforilación de factores de transcripción de la familia CREB (proteína de unión a CRE). Esto conduciría finalmente a un mayor número de sitios HRH2 en la membrana de las células de Leydig y, por consiguiente, a un aumento de la síntesis de esteroides en presencia de HA 10^{-9} M. La hipótesis planteada se basa en el hecho de que en distintos sistemas, el efecto final de HA sobre sus células blanco está marcado por el balance en el número de sitios HRH1 o HRH2 en la membrana de las mismas (Pós y col, 2004).

La figura 45 a continuación representa de forma gráfica el mecanismo propuesto para las acciones de HA 10^{-9} M sobre la esteroidogénesis inducida por LH/hCG en células de Leydig.



espacio intersticial - testículo

Figura 45: Mecanismo propuesto para las acciones de HA 10^{-9} M sobre la esteroidogénesis inducida por la hormona luteinizante en células de Leydig. LH: hormona luteinizante, HA: histamina, HRH2: receptor histaminérgico subtipo 2, AC: adenilato ciclasa, $G_{\alpha s}$: subunidad alfa de la proteína G estimuladora, PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc, CRE: elemento de respuesta a AMPc, CREB: proteína de unión a CRE, N: núcleo.

Por otra parte, los efectos inhibitorios de HA se deberían exclusivamente a la activación de HRH1. Dado que se observó aumento de la producción de IP_3 por un agonista de dicho receptor, y que un inhibidor de PLC revirtió las acciones del agonista sobre la síntesis de esteroides, se asume que la vía PLC/ IP_3 / Ca^{2+} estaría involucrada en el mecanismo de inhibición de la esteroidogénesis por HA.

A su vez, los resultados del presente trabajo demuestran que la activación de HRH1 conduciría a una disminución en la producción de AMPc estimulada por hCG. En concordancia con estos hallazgos, agonistas HRH1 atenúan la producción de AMPc inducida por isoprenalina en la línea celular de astrocitoma humano 1321N1. Como se indicó previamente (ver sección 1.7.2.1.), este mecanismo involucraría movilización de Ca^{2+} intracelular, y activación de una fosfodiesterasa dependiente del complejo Ca^{2+} /CaM (Hill y col, 1997). Las incubaciones de las células MA-10 para la posterior determinación de los niveles de AMPc intracelular se llevaron a cabo en presencia del inhibidor de fosfodiesterasa, IBMX. Aún así, tanto HA 10^{-5} M como un agonista HRH1 inhibieron un 50% la acumulación del segundo mensajero inducida por hCG, sugiriendo que este efecto no se debería exclusivamente a la activación de una fosfodiesterasa en respuesta al aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por HA. En este sentido, Pereira y colaboradores han reportado que Ca^{2+} es un inhibidor de AC en células MA-10, disminuyendo la producción de AMPc estimulada por hCG (Pereira y col, 1988). Además, se ha descrito recientemente un efecto similar en la línea de células musculares de arteria A7r5 (Dyer y col, 2005).

Así, sobre la base de los resultados obtenidos y evidencias previas, el efecto de HA 10^{-5} M sobre la producción de AMPc inducida por hCG en células de Leydig involucraría un incremento de Ca^{2+} intracelular, conduciendo a una regulación negativa de la actividad de AC, posiblemente por medio de la

activación de alguna proteína $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dependiente. Por otra parte, no puede descartarse totalmente la participación de una fosfodiesterasa activada por unión del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ en el fenómeno descrito. En conjunto, esto último permitiría explicar, al menos en parte, el efecto inhibitorio de HA 10^{-5} M sobre la esteroidogénesis inducida por la hormona.

En relación con la hipótesis planteada más arriba, al atenuar la producción de AMPc estimulada por hCG, HA 10^{-5} M también podría inhibir el supuesto efecto inductor de la hormona sobre la transcripción del gen de HRH2, inclinándolo el balance hacia una regulación negativa de la síntesis de esteroides a través de HRH1.

El hecho que HA 10^{-5} M disminuya la respuesta esteroidogénica a dbAMPc sugeriría la existencia de otro sitio de inhibición para la amina, en algún paso posterior a la producción del segundo mensajero. A su vez, evidencias previas del laboratorio indicaban que el efecto inhibitorio de NO sobre el camino esteroidogénico en células de Leydig ocurriría a nivel de enzimas dependientes de citocromo P450, fundamentalmente CYP11A (Del Punta y col, 1996; Reche, 2005). CYP11A cataliza la conversión de colesterol en pregnenolona, y se localiza en la membrana mitocondrial interna.

Estas evidencias, sumado a la reportada relación entre HA y NO en distintos sistemas, sugerirían un posible papel de NO como mediador de los efectos inhibitorios observados en presencia de HA 10^{-5} M. A fin de confirmar esta hipótesis, en el presente trabajo se estudió el efecto de HA 10^{-5} M sobre la esteroidogénesis inducida por 22R-hidroxicolesterol y pregnenolona, ambos metabolitos intermediarios de la síntesis de esteroides.

En células MA-10, HA 10^{-5} M produjo una inhibición significativa de la esteroidogénesis inducida por el análogo permeable del colesterol, mientras que no tuvo efecto sobre la estimulación inducida por pregnenolona. Estos resultados indican que HA 10^{-5} M inhibiría la conversión de colesterol a pregnenolona en dichas células, pero no tendría efecto sobre la conversión de pregnenolona en progesterona. Teniendo en cuenta que esta última reacción es catalizada por 3β HSD, enzima independiente de citocromos, los resultados del presente trabajo concuerdan con las evidencias previas del laboratorio respecto al sitio de inhibición del NO sobre el camino esteroidogénico en células MA-10.

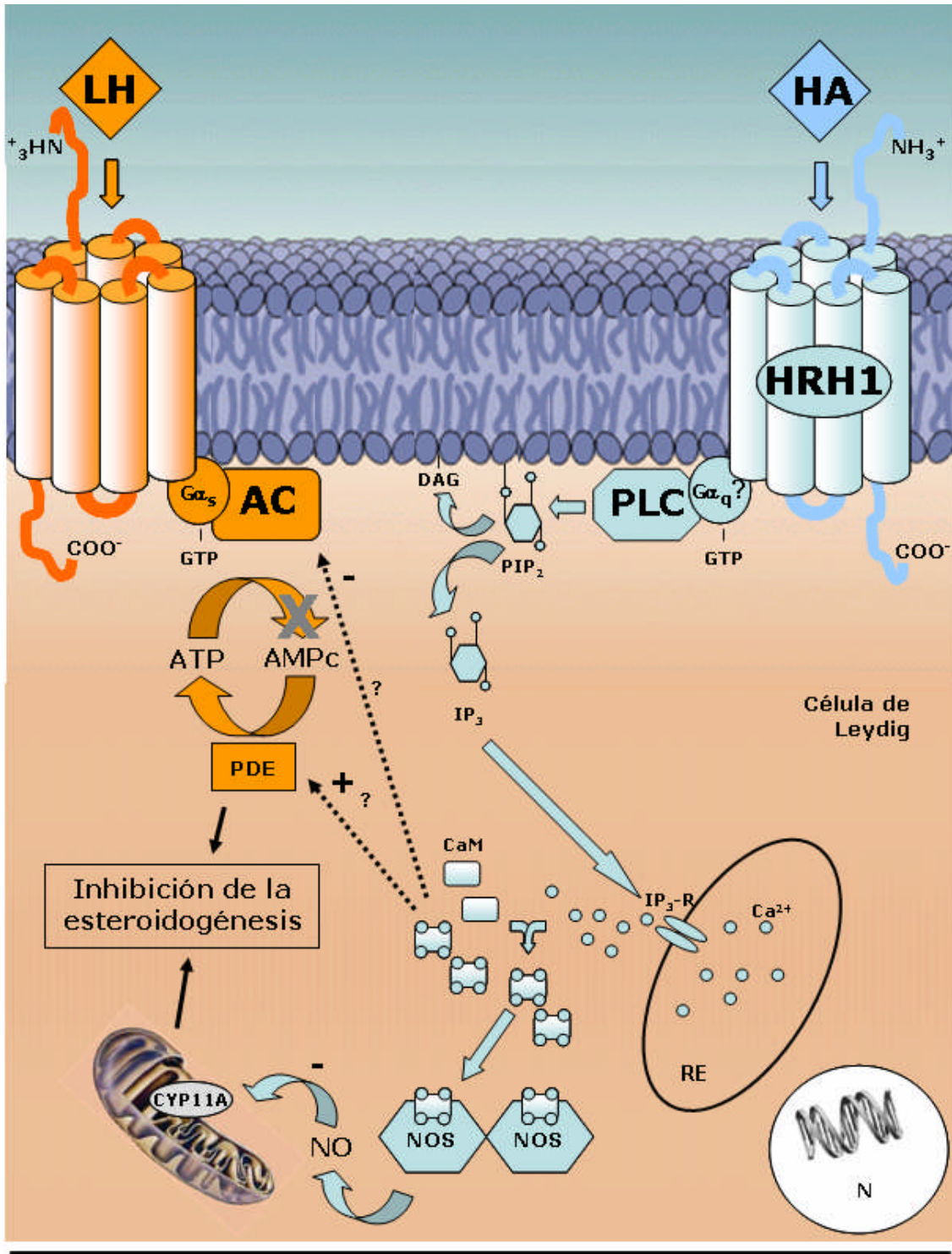
En células de Leydig de rata, HA 10^{-5} M no sólo inhibió la esteroidogénesis inducida por 22R-hidroxicolesterol, sino que también tuvo efecto sobre la estimulación inducida por pregnenolona. Como se indicó en la sección 1.6.1., el camino esteroidogénico que conduce a la síntesis de testosterona en células de Leydig normales involucra dos enzimas dependientes de citocromo P450: CYP11A, igual que en la línea MA-10, y CYP17, que cataliza la conversión de pregnenolona en dehidroepiandrosterona en la vía Δ^5 , o progesterona en androstenodiona en la vía Δ^4 . Esto último ofrece una explicación razonable para los resultados descritos al comienzo de este párrafo, que evidencian nuevamente concordancia con los hallazgos previos del laboratorio respecto al NO.

La participación de NO en el mecanismo de acción de HA 10^{-5} M en células de Leydig se confirmó al observar aumento de la actividad de NOS en presencia de HA 10^{-5} M, como así también reversión del efecto de la amina sobre la esteroidogénesis basal en presencia de L-NAME, inhibidor específico de NOS. A su vez, L-NAME atenuó el efecto inhibitorio de HA sobre la esteroidogénesis inducida por hCG.

Sobre la base de los resultados obtenidos, HA 10^{-5} M a través de HRH1 estimularía la enzima PLC en células de Leydig, generando un aumento en los niveles de IP_3 . Dado que IP_3 puede actuar liberando de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, y sabiendo que la unión del complejo Ca^{2+}/CaM a nNOS y eNOS activa dichas enzimas (Weissman y col, 2002; Pollock y col, 1991), es razonable especular que la vía descrita pueda estar involucrada en el aumento de actividad de NOS en respuesta a HA 10^{-5} M. A favor de esta hipótesis, resultados del laboratorio han permitido detectar expresión de la isoforma nNOS en células de Leydig (Reche, 2005).

En diversos tipos celulares, NO activa una GC soluble, incrementando los niveles de GMPc. Se ha propuesto que este último podría estimular la acción de una fosfodiesterasa específica en células de zona glomerulosa adrenal, disminuyendo así los niveles de AMPc y aldosterona (MacFarland y col, 1991). Sin embargo, análogos de GMPc son incapaces de inhibir la síntesis de esteroides en la línea MA-10 (Del Punta y col, 1996) y en células de Leydig de rata (Reche, 2005). Más aún, dadores de NO no elevan los niveles de GMPc en células MA-10 (Del Punta y col, 1996). Estas evidencias permiten descartar que el efecto inhibitorio de HA 10^{-5} M sobre la producción de AMPc estimulada por hCG antes descrito se deba a la activación de una fosfodiesterasa en respuesta al incremento en los niveles de NO inducido por la amina. Esto último, sumado a que L-NAME sólo atenúa el efecto de HA 10^{-5} M sobre la síntesis de esteroides inducida por hCG en células de Leydig, indica que NO mediaría sólo parte de los efectos inhibitorios de la amina sobre las acciones esteroideogénicas de la hormona.

La figura 46 a continuación representa de forma gráfica el mecanismo propuesto para las acciones de HA 10^{-5} M sobre la esteroideogénesis inducida por LH/hCG en células de Leydig.



espacio intersticial - testículo

Figura 46: Mecanismo propuesto para las acciones de HA 10^{-5} M sobre la esteroidogénesis inducida por la hormona luteinizante en células de Leydig. LH: hormona luteinizante, HA: histamina, HRH1: receptor histaminérgico subtipo 1, AC: adenilato ciclasa, $G_{\alpha s}$: subunidad alfa de la proteína G estimuladora, PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc, PDE: fosfodiesterasa; $G_{\alpha q}$: subunidad alfa de la proteína G_q , PLC: fosfolipasa C, PIP_2 : fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato, IP_3 : inositol 1, 4, 5-trifosfato, IP_3 -R: receptor de IP_3 , DAG: diacilglicerol, CaM: calmodulina, NOS: óxido nítrico sintasa, NO: óxido nítrico, CYP11A: enzima que escinde la cadena lateral del colesterol, dependiente de citocromo P450, RE: retículo endoplasmático, N: núcleo.

En resumen, los resultados descritos hasta el momento permiten afirmar que los efectos estimulatorios observados en presencia de HA 10^{-9} M se deberían fundamentalmente a la activación de HRH2, mientras que la inhibición de la esteroidogénesis por HA 10^{-5} M se debería a la activación de HRH1. Además, los resultados indican la existencia de interacciones positivas y negativas entre las cascadas de señalización intracelular activadas por HA, y la vía clásica activada por LH/hCG. Estas evidencias son consistentes con los estudios que describen respuestas fisiológicas opuestas activadas por HRH1 y HRH2 en otros tejidos (Lázár-Molnár, 2004).

Con respecto a los restantes subtipos de receptores histaminérgicos, Nguyen y colaboradores han detectado expresión de ARNm de HRH4 en homogeneizado de testículo de rata (Nguyen y col, 2001). Sin embargo, previamente se indicó que el testículo se compone de numerosos tipos celulares, que difieren en forma, tamaño y función, por lo que los estudios de Nguyen no aportan evidencias sólidas a favor de la localización de HRH4 en la membrana de las células de Leydig. Más aún, se ha reportado que HRH4 se expresa fundamentalmente en células hematopoyéticas e inmunocompetentes, detectándose elevados niveles de expresión de ARNm de HRH4 en eosinófilos, neutrófilos y células TCD4⁺ (Igaz y Hegyesi, 2004). Estos tipos celulares pueden también encontrarse en la región intersticial del testículo (Mayerhofer y col, 1996). Por su parte, sin bien la presencia de HRH3 no está restringida al sistema nervioso central, los sitios de unión a HRH3 en tejidos periféricos son cuantitativamente menos abundantes que los sitios de unión a HRH1 y HRH2 (Igaz y Hegyesi, 2004).

Los resultados de este trabajo indican reversión total de los efectos estimulatorios e inhibitorios de HA sobre la esteroidogénesis en presencia de antagonistas HRH2 y HRH1, respectivamente. A su vez, los agonistas HRH1 y HRH2 utilizados mostraron efectos comparables a los observados en presencia

de la amina. Claramente, estos hallazgos indican que HRH1 y HRH2 serían los principales mediadores de las acciones de HA sobre la esteroidogénesis en células de Leydig. Por otra parte, los resultados de este trabajo no permiten descartar totalmente la presencia de HRH3 y/o HRH4 en dichas células, que pudieran mediar otras acciones de HA sobre la funcionalidad de las mismas.

Los estudios publicados hasta el momento señalan a los mastocitos como fuente productora local de HA para el intersticio testicular (Albrecht y col, 2005; Mayerhofer y col, 1989). Sin embargo, en este trabajo se demuestra la presencia de contenido endógeno de HA en células de Leydig, como así también actividad y expresión de HDC. Más aún, pudo detectarse expresión de las formas de 74 y 53 KDa, lo cual demuestra que el procesamiento de HDC ocurre en las mismas células de Leydig, de igual modo que en la mayoría de las células y tejidos estudiados (Darvas y Falus, 2004).

Es llamativa la detección de contenido endógeno de HA en el núcleo de las células MA-10 y Leydig de rata. Esto podría estar evidenciando alguna función de la amina como regulador de la expresión génica. En este sentido, si bien la existencia de receptores intracelulares de HA de localización nuclear no ha sido ampliamente aceptada, se ha sugerido que HA sintetizada *de novo* podría estimular la proliferación celular, actuando a través de estos receptores (Brandes y LaBella, 1993). Sin duda, se requiere de experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

En conjunto, los resultados obtenidos conforman la primera evidencia de que las células de Leydig pueden sintetizar HA, constituyendo una fuente adicional de la amina en el testículo. HA podría entonces actuar también como regulador autocrino de la esteroidogénesis. En concordancia con los resultados de este trabajo, se han reportado hallazgos similares para serotonina, amina que también contienen y secretan los mastocitos testiculares: tanto en hámster

como en rata, serotonina podría ser sintetizada *de novo* por células de Leydig (Frungeri y col, 2000; Tinajero y col, 1993), y se ha demostrado que la misma modula la esteroidogénesis en dichas células (Frungeri y col, 2000).

Se ha sugerido que HA cumpliría un papel importante en la maduración del testículo, contribuyendo al proceso de diferenciación de células de Leydig. Al respecto, Pap y colaboradores reportaron que ratones Hdc^{-/-} 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. Más aún, en estos ratones la incorporación de HA en la dieta no reemplaza la falta de producción local de la amina (Pap y col, 2002). En concordancia con la hipótesis de Pap, Gaytan y colaboradores reportaron proliferación y diferenciación simultánea de precursores de mastocitos y precursores de células de Leydig en intersticio testicular de rata (Gaytan y col, 1992). A su vez, 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; Frungeri y col, 2000). Así, las evidencias presentadas sugieren que los mastocitos testiculares podrían ejercer su influencia, actuando en forma paracrina, sobre otros aspectos de la funcionalidad de células de Leydig, independientemente de contribuir a la regulación de la esteroidogénesis.

A su vez, Lima y colaboradores han reportado que bajas concentraciones de testosterona en ratas prepúberes pueden estimular la proliferación y/o diferenciación de mastocitos peritoneales, mientras que la hormona en concentraciones elevadas tendría un efecto inhibitorio sobre dichas células (Lima y col, 2000). Si bien es sabido que los mastocitos de distintos tejidos pueden responder de manera diferente a los mismos factores, es razonable especular sobre la base de los hallazgos de Lima que las células de Leydig

puedan desempeñar también un papel importante en la regulación de la proliferación y/o diferenciación de los mastocitos testiculares, modulando de este modo la secreción de HA y sus acciones sobre la esteroidogénesis. Al respecto, resulta interesante el hecho de que existirían factores inhibitorios de la proliferación de mastocitos en el intersticio de ratas adultas, pero no de ratas prepúberes, donde predominan células de Leydig inmaduras. Más aún, se ha reportado que dichos factores podrían ser producidos por las células de Leydig, una vez que éstas han completado su diferenciación (Gaytan y col, 1990). En concordancia con estas evidencias, la concentración de HA testicular en ratas prepúberes es considerablemente más elevada que en animales adultos (Zieher y col, 1971).

En primates, el incremento en el número de mastocitos testiculares, característico de la etapa prepuberal, se acompaña de niveles séricos bajos de testosterona y niveles elevados de LH, de igual modo que en las ratas. Sin embargo, a diferencia de lo reportado para estas últimas, en primates y humanos no se observa disminución del número de mastocitos intersticiales en el testículo adulto, aunque los niveles séricos de testosterona se incrementan en forma progresiva después de iniciada la pubertad (Frungeri y col, 2000). Así, a pesar de la discrepancia descrita, las observaciones de Frungeri y colaboradores aportarían evidencias a favor de un efecto dual de HA sobre la síntesis de esteroides en células de Leydig.

Sobre la base de los resultados obtenidos y las evidencias previas, concentraciones elevadas de HA tendrían una función fisiológica en el testículo inmaduro, posiblemente contribuyendo al proceso de diferenciación de células de Leydig, como así también modulando la síntesis de testosterona por dichas células para mantener niveles mínimos del andrógeno en etapas prepuberales.

Por su parte, HA también jugaría un papel importante en el testículo adulto, incrementando los niveles de testosterona producidos en respuesta a concentraciones submáximas de LH y asegurando, de este modo, el mantenimiento de caracteres sexuales secundarios y el normal desarrollo del proceso espermatogénico. Al menos en la rata, los efectos descritos se observarían en presencia de concentraciones nanomolares de la amina.

Los niveles intratesticulares de HA en las distintas etapas del desarrollo estarían asociados al grado de degranulación de los mastocitos residentes, determinado posiblemente por acción de LH sobre los mismos, como ocurre en el ovario (Krishna y col, 1986). A su vez, HA podría ser producida por las células de Leydig, y secretada en respuesta a LH, actuando así como modulador autocrino y/o paracrino de la esteroidogénesis. A favor de esta hipótesis, se ha reportado que LH induce liberación de serotonina sintetizada *de novo* en células de Leydig de rata (Tinajero y col, 1993). Finalmente, no puede descartarse que los espermatozoides constituyan una fuente adicional de HA en el testículo, dadas las evidencias que señalan expresión de HDC en dichas células (Safina y col, 2002).

El modelo planteado tendría numerosas semejanzas con lo reportado para glándula mamaria de ratón, donde existen dos pools de HA: HA asociada a células epiteliales que expresan HDC, y HA asociada a mastocitos (Wagner y col, 2003). En útero también se ha postulado un modelo similar (Paria y col, 1998).

Los mastocitos han sido también asociados a diversas condiciones patológicas en el testículo adulto, muchas de ellas causantes de infertilidad. Así, el engrosamiento de los túbulos seminíferos, considerado un rasgo característico en pacientes infértiles, coincide con un aumento en el número y activación de mastocitos testiculares (Yamanaka y col, 2000). En estos

pacientes, los mastocitos se localizan tanto en la zona intersticial como peritubular del testículo, mientras que en pacientes fértiles son rara vez encontrados en la región peritubular (Meineke y col, 2000). Hasta el momento, los trabajos publicados sugieren que la fibrosis tubular que se observa en pacientes infértiles se debería fundamentalmente al aumento en los niveles de triptasa, proteasa neutra presente en los mastocitos cuya participación en procesos fibróticos ha sido ampliamente demostrada (Galli, 1993). Sin embargo, es sabido que los mastocitos sintetizan y secretan una gran variedad de potentes mediadores, incluyendo HA. Al respecto, se ha confirmado recientemente que los mastocitos testiculares humanos expresan HDC, tanto en pacientes normales como infértiles. Podría entonces postularse que la degranulación del gran número de mastocitos que infiltra el testículo en pacientes infértiles incrementa los niveles locales de HA a valores anormalmente elevados para un testículo adulto. Sobre la base de las evidencias recientes que indican la presencia de HRH1 y HRH2 en células peritubulares, HA actuaría sobre dichas células, contribuyendo al establecimiento de fibrosis. Alternativamente, HA podría actuar como mediador inflamatorio, dado que en los pacientes infértiles la activación de mastocitos está acompañada de aparición de otras células y moléculas efectoras del sistema inmune (Frungieri y col, 2002; Hedger y Meinhardt, 2003).

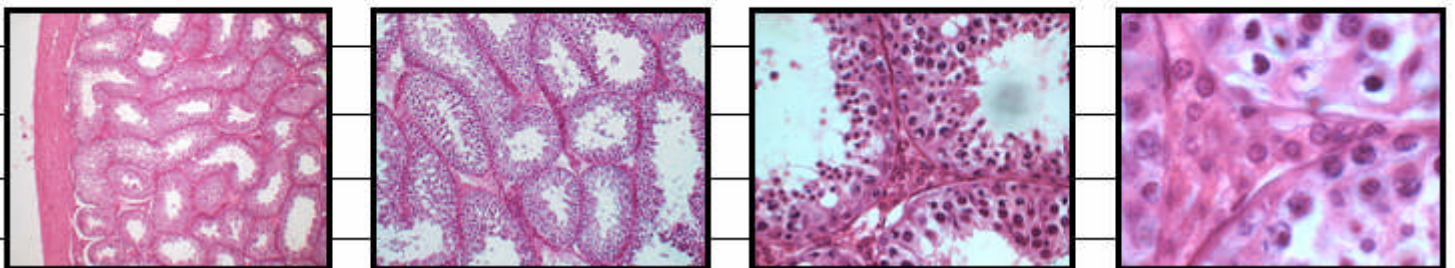
A su vez, estudios recientes indican la presencia de HRH1 y HRH2 en células intersticiales (Albrecht y col, 2005). Más específicamente, los resultados de este trabajo confirman que HA puede actuar directamente sobre células de Leydig. Hasta el momento, no se han llevado a cabo estudios que aporten evidencias a favor de una correlación directa entre los niveles de testosterona intratesticular y sérica, y los niveles intratesticulares de HA en pacientes infértiles. Sin embargo, es razonable especular que HA secretada por los mastocitos testiculares activados en estos pacientes pueda inhibir la síntesis de

testosterona en las células de Leydig, ejerciendo también de este modo un efecto negativo sobre el desarrollo del proceso espermatogénico.

Dada la diversidad de patologías asociadas a HA, en los últimos años se ha introducido en terapéutica una gran variedad de antihistamínicos para el tratamiento de las mismas, particularmente antagonistas HRH1 y HRH2. Sin embargo, la probada participación de la amina en múltiples funciones fisiológicas hace pensar que el uso frecuente de estas drogas podría tener efectos secundarios a largo plazo, comprometiendo los diversos órganos blanco de acción de HA. Con particular referencia al testículo, se ha reportado que cimetidina, poderoso antagonista HRH2 extensamente utilizado para el tratamiento de úlceras gástricas, induce apoptosis en células peritubulares de ratas macho, afectando en consecuencia el proceso espermatogénico (Franca y col, 2000).

Los resultados de este trabajo de Tesis revelan el nuevo papel de HA como modulador dual de la esteroidogénesis testicular. Sin duda, estos hallazgos atraerán atención hacia nuevos efectos colaterales potenciales del uso de antihistamínicos, que podrían alterar el equilibrio local, incrementando o disminuyendo la producción de andrógenos en células de Leydig.

CONCLUSIONES
GENERALES



7. CONCLUSIONES GENERALES

En conjunto, los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Las células de Leydig expresan al menos dos subtipos de receptores histaminérgicos en la membrana: HRH1 y HRH2.

- Histamina ejerce un efecto dual sobre la esteroidogénesis en células de Leydig. Concentraciones nanomolares de la amina estimulan la síntesis basal de esteroides y potencian la respuesta de las células a LH/hCG, mientras que histamina 10 μM muestra un efecto inhibitorio.

- Tanto HRH1 como HRH2 están involucrados en el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis por histamina en células de Leydig: la activación de HRH2 conduce directamente a un incremento en la síntesis de esteroides, en tanto que la activación de HRH1 produce el efecto opuesto. Es probable que el efecto final de histamina sobre dichas células esté marcado por el balance en el número de sitios HRH1 o HRH2 en la membrana de las mismas.

- El AMPc es el principal segundo mensajero involucrado en la transducción de la señal de HRH2 en células de Leydig. Así, la activación de HRH2 por histamina contribuiría al efecto esteroidogénico de LH/hCG, incrementando los niveles del nucleótido producidos en respuesta a concentraciones submáximas de dicha hormona.

- La vía PLC/IP₃/Ca²⁺ estaría involucrada en la transducción de la señal de HRH1 en células de Leydig. La activación de la misma conduciría a una disminución en la producción de AMPc estimulada por LH/hCG, y a

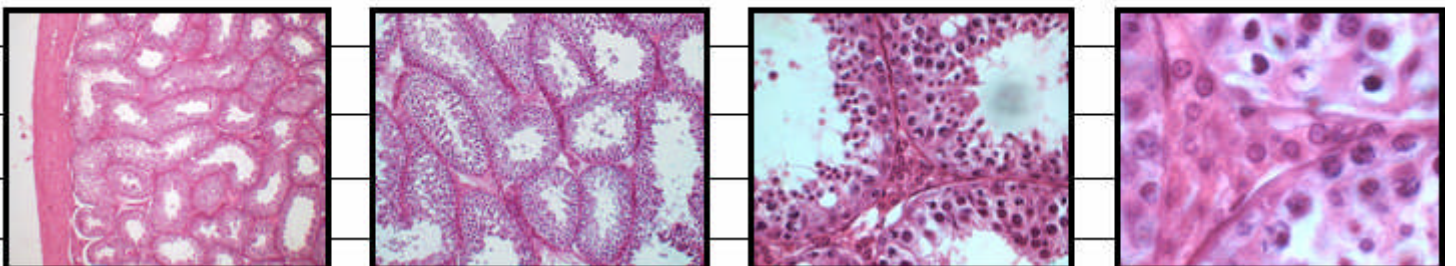
un incremento en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en dichas células, con el consecuente aumento en los niveles de óxido nítrico

■ El efecto inhibitorio de histamina sobre el camino esteroidogénico en células de Leydig ocurriría a nivel de enzimas dependientes de citocromo P450, fundamentalmente CYP11A, en concordancia con hallazgos previos del laboratorio respecto al óxido nítrico. Sobre la base de estas evidencias y lo expuesto más arriba, el óxido nítrico mediaría, al menos en parte, los efectos inhibitorios de histamina sobre la síntesis de esteroides.

■ Los resultados obtenidos revelan la existencia de interacciones positivas y negativas entre las cascadas de señalización intracelular activadas por histamina, y la vía clásica activada por LH/hCG en células de Leydig. Desde una perspectiva fisiológica, esto podría contribuir a la homeostasis de los niveles de esteroides en el testículo.

■ Las células de Leydig son capaces de sintetizar histamina, constituyendo una fuente adicional de la amina en el testículo. Histamina podría entonces actuar como regulador autocrino y/o paracrino de la esteroidogénesis.

BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

- 1- 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.
- 2- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.** Biochem J 2001; 357: 593-615.
- 3- Anakwe OO, Payne AH. **Non-coordinate regulation of de novo synthesis of cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage and cytochrome P-450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in mouse Leydig cell cultures: relation to steroid production.** Mol Endocrinol 1987; 1: 595-603.
- 4- Anderson CM, Mendelson CR. **Regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells in culture: effect of human chorionic gonadotropin and dibutyryl cyclic AMP on the synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin.** Arch Biochem Biophys 1985; 238: 378-387.
- 5- Arai KY, Roby KF, Terranova PF. **Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF) Suppresses cAMP Response Element (CRE) Activity and Nuclear CRE Binding Protein in MA-10 Mouse Leydig Tumor Cells.** Endocrine 2005; 27: 17-24.
- 6- Ascoli M **Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses.** Endocrinology (Baltimore) 1981; 108: 88-95

- 7- Ascoli M **Functions and regulation of cell surface receptors in cultured Leydig tumor cells.** En: The Receptors, vol. II. Academic Press; 1985: 367-400.
- 8- 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.
- 9- Ascoli M, Puett D **Gonadotropin binding and stimulation of steroidogenesis in Leydig tumor cells.** Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 99-102.
- 10- Ascoli M, Segaloff DL. **On the structure of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor.** Endocr Rev 1989; 10: 27-44.
- 11- Bakker RA, Schoonus SB, Smit MJ, Timmerman H, Leurs R. **Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling.** Mol Pharmacol 2001; 60: 1133-1142.
- 12- Bartke A. **Concentration of free and esterified cholesterol in the testes of immature and adult mice.** J Reprod Fertil 1971; 25: 153-156.
- 13- Bidri M, Ktorza S, Vouldoukis I, Le Goff L, Debre P, Guillosson JJ, Arock M. **Nitric oxide pathway is induced by Fc epsilon RI and up-**

- regulated by stem cell factor in mouse mast cells.** Eur J Immunol 1997; 27: 2907-2913.
- 14- Bodis J, Tinneberg HR, Schwarz H, Papenfuss F, Torok A, Hanf V. **The effect of histamine on progesterone and estradiol secretion of human granulosa cells in serum-free culture.** Gynecol Endocrinol 1993; 7: 235-239.
- 15- Bogdan C. **Nitric oxide and the immune response.** Nat Immunol 2001; 2: 907-916.
- 16- Borda E, Stranieri G, Sterin-Borda L. **H(1)-Receptor activation triggers the endogenous nitric oxide signaling system in the rat submandibular gland.** Mediators Inflamm 2002; 11: 337-343.
- 17- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. **Cytokines and steroidogenesis.** Mol Cell Endocrinol 2004; 215: 135-141.
- 18- Bouchet A, Cuilleret J. **Anatomía descriptiva, topográfica y funcional. Región retroperitoneal, pelvis menor y perineo.** Ed. Médica Panamericana. 4ª Reimpresión; 1993: tomo 6.
- 19- Bradford MM **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
- 20- Brandes LJ, LaBella FS. **Identification of intracellular histamine receptors H_{1c} that regulate cell proliferation.** En: García-Caballero L, Brandes L, Hosada L (eds.) Histamine in normal and cancer cell proliferation, Oxford: Pergamon Press; 1993: 31-41.

- 21- Brandes LJ, Macdonald LM, Bogdanovic RP. **Evidence that the antiestrogen binding site is a histamine or histamine-like receptor.** Biochem Biophys Res Commun 1985; 126: 905-910.
- 22- Brandes LJ, Queen GM, LaBella FS. **Potent interaction of histamine and polyamines at microsomal cytochrome P450, nuclei, and chromatin from rat hepatocytes.** J Cell Biochem 1998; 69: 233-243.
- 23- Bredt DS, Snyder SH. **Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.** Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 682-685.
- 24- Bredt DS, Snyder SH. **Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum.** Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 9030-9033.
- 25- Bull HA, Cohen J, Dowd PM. **Responses of human dermal microvascular endothelial cells to histamine and their modulation by interleukin 1 and substance P.** J Invest Dermatol 1991; 97: 787-792.
- 26- Bull HA, Courtney PF, Rustin MH, Dowd PM. **Characterization of histamine receptor sub-types regulating prostacyclin release from human endothelial cells.** Br J Pharmacol 1992; 107: 276-81.
- 27- Cameron IT, Campbell S. **Nitric oxide in the endometrium.** Hum Reprod Update 1998; 4: 565-569.

- 28- Cara AM, Lopes-Martins RA, Antunes E, Nahoum CR, De Nucci G. **The role of histamine in human penile erection.** Br J Urol 1995; 75: 220-224.
- 29- Charreau EH, Calvo JC, Nozu K, Pignataro OP, Catt KJ, Dufau ML **Hormonal modulation of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in gonadotropin stimulated and desensitized testicular Leydig cells.** J Biol Chem 1981; 256: 12719-12724.
- 30- Christensen AK. **Leydig cells.** En: Greep RO, Astwood EB, Hamilton DW, Geiger SR (eds) Handbook of Physiology, vol 5. American Physiological Society, Washington DC, 1975: 57- 94.
- 31- Cocchiara R, Albegiani G, Di Trapani G, Azzolina A, Lampiasi N, Rizzo F, Diotallevi L, Gianaroli L, Geraci D. **Oestradiol enhances in vitro the histamine release induced by embryonic histamine-releasing factor (EHRF) from uterine mast cells.** Hum Reprod 1992; 7: 1036-1041.
- 32- Cooke BA. **Transduction of the luteinizing hormone signal within the Leydig cell.** En: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds) The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press; 1996: 351-363.
- 33- Cricco GP, Davio CA, Martin G, Engel N, Fitzsimons CP, Bergoc R y Rivera ES. **Histamine as an autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas.** Agents Actions 1994; 43: 17-20.

- 34- Cricco G, Martin G, Medina V, Nunez M, Gutierrez A, Cocca C, Bergoc R, Rivera E. **Histamine regulates the MAPK pathway via the H(2) receptor in PANC-1 human cells.** *Inflamm Res* 2004; 53: S65-S66.
- 35- 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.* SpringMed publishing Ltd; 2004: 31-42.
- 36- Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF. **Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis.** *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 17-30.
- 37- Davio CA, Cricco GP, Andrade N, Bergoc R, Rivera ES **H1 and H2 histamine receptors in human mammary carcinomas.** *Agents Actions* 1993; 38: C172-C177.
- 38- Davio CA, Cricco GP, Martin G, Fitzsimons CP, Bergoc RM, Rivera ES. **Effect of histamine on growth and differentiation of the rat mammary gland.** *Agents Actions* 1994; 41:C115-117.
- 39- Dawson TM, Snyder SH. **Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain.** *J Neurosci* 1994; 14: 5147-5159.
- 40- de Kretser DM, Kerr JB. **The cytology of the testis.** En: Knobil E, Neil JD, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW (eds.) *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press; 1994: 1177-1290.
- 41- de Kretser DM, Kerr JB. **The effect of testicular damage on Sertoli and Leydig cell function.** *Monogr Endocrinol* 1983; 25:133-154

- 42- Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. **Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis.** Endocrinology 1996; 137: 5337-5343.
- 43- Del Valle J, Gantz I. **Novel insights into histamine H2 receptor biology.** American J of Physiology 1997; 273: 987-996.
- 44- Dyer JL, Liu Y, Pino de la Huerga I, Taylor CW. **Long-lasting inhibition of adenylyl cyclase selectively mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked calcium release.** J Biol Chem 2005; 280: 8936-8944.
- 45- Fitzsimons CP, Lazar-Molnar E, Tomoskozi Z, Buzás E, Rivera ES, Falus A. **Histamine induces tissue-specific down-regulation of histamine HRH2 receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice.** FEBS Letters 2001; 508: 245-248.
- 46- Foreman JC, Norris DB, Rising TJ, Webber SE. **The binding of [3H]-tiotidine to homogenates of guinea-pig lung parenchyma.** Br J Pharmacol 1985; 86: 475-482.
- 47- Franca LR, Leal MC, Sasso-Cerri E, Vasconcelos A, Debeljuk L, Russell LD. **Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells.** Biol Reprod 2000; 63: 1403-1412.
- 48- Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Kohn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A. **Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men.** Fertil Steril 2002; 78: 298-306.

- 49- 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.
- 50- 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.
- 51- Galli Sj. **New concept about the mast cell.** N Eng J Med 1993; 328: 257-265.
- 52- Gaytan F, 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.
- 53- Gaytan F, Aceitero J, Lucena C, Aguilar E, Pinilla L, Garnelo P, Bellido C. **Simultaneous proliferation of mast cells and Leydig cells in the rat testis. Are common regulatory factors involved?** Journal of Andrology 1992; 13: 387-397.
- 54- Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. **Production of nitric oxide by mitochondria.** J Biol Chem 1998; 273: 11038-11043.
- 55- Gordon JR, Galli SJ. **Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin.** Nature 1990; 346: 274-276.

- 56- Hales DB. **Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis.** J Reprod Immunol 2002; 57: 3-18.
- 57- Hall PF. **Testicular steroid synthesis: Organization and regulation.** En: Knobil E, Neil JD, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW (eds.) The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; 1994: 975-998.
- 58- Hansson V V, Skalhegg BS, Tasken K. **Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA.** J Steroid Biochem Mol Biol 2000; 73: 81-92.
- 59- Hattori Y, Gando S, Endou M, Kanno M. **Characterization of histamine receptors modulating inotropic and biochemical activities in rabbit left atria.** Eur J Pharmacol 1991;196: 29-36.
- 60- 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.
- 61- Hedger MP, Meinhardt A. **Cytokines and the immune-testicular axis.** J Reprod Immunol 2003; 58: 1-26.
- 62- Herrero MB, Gagnon C. **Nitric oxide: a novel mediator of sperm function.** J Androl 2001; 22: 349-356.
- 63- 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.
- 64- Hipkin RW, Moger WH. **Type 1 and 2 isoenzymes of cAMP-dependent protein kinase in Leydig cell steroidogenesis.** Mol Cell Endocrinol 1991; 77: 91-96.
- 65- 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.
- 66- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. **Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.** Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 9265-9269.
- 67- Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. **Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001; 281: G626-G634.
- 68- Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. **Scrotal/Testicular Thermoregulation in Bulls.** En: Chenoweth PJ (eds.) Topics in Bull Fertility; Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, New York. World Wide Web (URL: www.ivis.org); 2000.
- 69- Keeney DS, Mason JI. **Expression of testicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5----4-isomerase:**

- regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats.** *Endocrinology* 1992; 130: 2007-2015.
- 70- Knowles RG, Moncada S. **Nitric oxide synthases in mammals.** *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
- 71- Krishna A, Terranova PF, Matteri RL, Papkoff H. **Histamine and increased ovarian blood flow mediate LH-induced superovulation in the cyclic hamster.** *J Reprod Fertil* 1986; 76: 23-29.
- 72- Laemmli UK **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 73- 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.
- 74- Lejeune H, Chuzel F, Thomas T, Avallet O, Habert R, Durand P, Saez J. **Paracrine regulation of Leydig cells.** *Ann Endocrinol* 1996; 57: 55-63.
- 75- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. **Molecular pharmacological aspects of histamine receptors.** *Pharmacol Ther* 1995; 66: 413-463.
- 76- Li H, Burkhardt C, Heinrich UR, Brausch I, Xia N, Forstermann U. **Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells.** *Circulation* 2003; 107: 2348-2354.

- 77- Li H, Hedger MP, Clements JA, Risbridger GP **Localization of immunoreactive β -endorphin and adrenocorticotrophic hormone and pro-opiomelanocortin mRNA to rat testicular interstitial tissue macrophages.** Biol Reprod 1991; 45: 282-289.
- 78- Lima AP, Lunardi LO, Rosa E Silva AA. **Effects of castration and testosterone replacement on peritoneal histamine concentration and lung histamine concentration in pubertal male rats.** J Endocrinol 2000; 167: 71-75.
- 79- Lukyanenko YO, Carpenter AM, Brigham DE, Stocco DM, Hutson JC. **Regulation of Leydig cells through a steroidogenic acute regulatory protein-independent pathway by a lipophilic factor from macrophages.** J Endocrinol 1998; 158: 267-275.
- 80- MacFarland RT, Zelus BD, Beavo JA. **High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells.** J Biol Chem 1991; 266:136-142.
- 81- Marinissen MJ, Gutkind JS. **Proteínas G-heterotriméricas.** En: Kazanietz M. Farmacología Molecular. Receptores, transducción de señales y activación de genes. Universidad Nacional de Quilmes Ediciones; 2000: 99-115.
- 82- Martinez AC, García-Sacristan A, Rivera L, Benedito S. **Biphasic response to histamine in rabbit penile dorsal artery.** Cardiovasc Pharmacol 2000; 36: 737-743.

- 83- Mayerhofer A, Bartke A, Amador A, Began T. **Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster.** Endocrinology 1989; 125: 2212-2214.
- 84- Mayerhofer A, Danilchik M, Pau KY, Lara HE, Russell LD, Ojeda SR. **Testis of prepubertal rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and an intragonadal source of catecholamines.** Biol Reprod 1996; 55: 509-518.
- 85- Megson AC, Walker EM, Hill SJ. **Role of protein kinase C alpha in signaling from the histamine H(1) receptor to the nucleus.** Mol Pharmacol 2001; 59: 1012-1021.
- 86- Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A. **Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men.** Fertil Steril 2000; 74: 239-244.
- 87- Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ **Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells.** J Biol Chem 1975; 250: 8818-8823.
- 88- Mikkelsen E, Sakr AM, Jespersen LT. **Studies on the effect of histamine in isolated human pulmonary arteries and veins.** Acta Pharmacol Toxicol (copenh) 1984; 54: 86-93.

- 89- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** Pharmacol Rev 1991; 43: 109-142.
- 90- 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, mayo de 2005 [Epub ahead of print].
- 91- Motulsky H. **The GraphPad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data.** GraphPad Software, Copyright © 1995 – 2001.
- 92- Murayama T, Kajiyama Y, Nomura Y. **Histamine-stimulated and GTP-binding proteins-mediated phospholipase A2 activation in rabbit platelets.** J Biol Chem 1990; 265: 4290-4295.
- 93- Nathan C. **Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.** FASEB J 1992; 6: 3051-3064.
- 94- Nemetallah BR, Howell RE, Ellis LC. **Histamine HRH1 receptors and prostaglandin-histamine interactions modulating contractility of rabbit and rat testicular capsules in vitro.** Biol Reprod 1983; 28: 632-635.
- 95- Nguyen T, Shapiro D, George S, Steola V, Lee D, Cheng R, Rauser L, Lee S, Lynch K, Roth B, O'Dowd B. **Discovery of a novel member of the Histamine Receptor Family.** Mol Pharmacol 2001; 59: 427-433. Accelerated Communication.

- 96- Niisato N, Ogata Y, Furuyama S, Sugiya H. **Histamine H1 receptor-induced Ca²⁺ mobilization and prostaglandin E2 release in human gingival fibroblasts. Possible role of receptor-operated Ca²⁺ influx.** *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1015-1023.
- 97- Nistal M, Santamaria L, Paniagua R. **Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood.** *Acta Anat* 1984; 119: 155-160.
- 98- Noris G, Hol D, Clapp C, Martinez de la Escalera G. **Histamine directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion from GT1-1 cells via H1 receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis.** *Endocrinology* 1995; 136: 2967-2974.
- 99- 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.* SpringMed publishing Ltd; 2004: 15-28.
- 100- O'Bryan MK, Schlatt S, Gerdprasert O, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. **Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility.** *Biol Reprod* 2000; 63: 1285-1293.
- 101- Pallone TL, Mattson DL. **Role of nitric oxide in regulation of the renal medulla in normal and hypertensive kidneys.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 93-98.

- 102- Pap E. **Connection between histamine and the sexual steroids.** En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), Histamine: Biological and Medical aspects. SpringMed publishing Ltd; 2004: 317-327.
- 103- Pap E, Racz K, Kovacs JK, Varga I, Buza E, Madarasz B, Foldes C, Szalai C, Watanabe T, Ohtsu H, Ichikawa A, Falus A. **Histidine Decarboxylase deficiency in gene knockout mice elevates male sex steroid production.** J Endocrinol 2002; 175: 193-198.
- 104- Paria BC, Das N, Das SK, Zhao X, Dileepan KN, Dey SK. **Histidine decarboxylase gene in the mouse uterus is regulated by progesterone and correlates with uterine differentiation for blastocyst implantation.** Endocrinology 1998; 139: 3958- 3966.
- 105- Payne AH, Downing JR, Wong KL **Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells.** Endocrinology 1980, 106: 1424-1429.
- 106- Payne AH, Hales DB. **Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones.** Endocr Rev 2004; 25: 947-970.
- 107- Payne AH, O'Shaughnessy PJ. **Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the Leydig cell.** En: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds) The Leydig Cell. Vienna: Cache River Press; 1996: 260-285.
- 108- Payne AH, Sha LL. **Multiple mechanisms for regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-----delta 4-isomerase, 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450, and**

cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells.

Endocrinology 1991; 129: 1429-1435.

109- Pecci Saavedra J, Vilar O, Pellegrino de Iraldi A. **Aparato Genital Masculino.** Histología Médica. López Libreros Editores, 3ra edición; 1990: 351-375.

110- Pereira ME, Segaloff DL, Ascoli M. **Ca⁺² is an inhibitor of adenylate cyclase in MA-10 Leydig tumor cells.** Endocrinology 1988; 122: 2232-2239.

111- Pignataro OP, Ascoli M **Epidermal growth factor increases the labeling of phosphatidylinositol-3,4 bisphosphate in MA-10 Leydig tumor cells.** J Biol Chem 1990a; 265: 1718-1723.

112- 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.

113- Podesta EJ, Dufau ML, Catt KJ. **Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase of Leydig cells: in vitro activation and relationship to gonadotropin action upon cyclic AMP and steroidogenesis.** FEBS Lett 1976; 70: 212-216.

114- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. **Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells.** Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 10480-10484.

- 115- Pomerantz DK, Pitelka V. **Nitric oxide is a mediator of the inhibitory effect of activated macrophages on production of androgen by the Leydig cell of the mouse.** Endocrinology 1998; 139: 922-931.
- 116- Porter TD, Coon MJ. **Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms.** J Biol Chem 1991; 266: 13469-13472.
- 117- Pós Z, Hegyesi H, Rivera E. **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.
- 118- Privalle CT, Crivello JF, Jefcoate CR. **Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland.** Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 702-706.
- 119- Reche C. **Regulación de la esteroidogénesis testicular por óxido nítrico y monóxido de carbono.** Tesis Doctoral. Director: Dr. Omar Pignataro; Codirector: Diego Golombek. Universidad Nacional de Quilmes, septiembre de 2005.
- 120- Resink TJ, Grigorian GYu, Moldabaeva AK, Danilov SM, Buhler FR. **Histamine-induced phosphoinositide metabolism in cultured human umbilical vein endothelial cells. Association with thromboxane and prostacyclin release.** Biochem Biophys Res Commun 1987; 144: 438-446.
- 121- Saez JM. **Leydig cells: Endocrine, paracrine and autocrine regulation.** Endocrine Rev 1994; 15: 574-626.

- 122- 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.
- 123- Salamonsen LA, Findlay JK. **Regulation of endometrial prostaglandins during the menstrual cycle and in early pregnancy.** Reprod Fertil Dev 1990; 2: 443-457.
- 124- Schayer R, Reilly MA. **Activity changes in mouse brain histidine decarboxylase.** Agents Actions 1975; 5: 115-118.
- 125- Schmidt C, Ahren K, Branstrom M, Kannisto P, Owman Ch, Sjoberg N-O, Tenenbaum A. **Histamine stimulates progesterone synthesis and cyclic adenosine 3', 5' monophosphate accumulation in isolated preovulatory rat follicles.** Neuroendocrinology 1987; 46: 69-74.
- 126- Schmidt G, Kannisto P, Owman C. **Histaminergic effects on the isolated rat ovarian artery during the estrous cycle.** Biol Reprod 1990; 42: 762-768.
- 127- 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.
- 128- 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.

- 129- Shikita M, Hall PF. **Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. I. Purification and properties.** J Biol Chem 1973; 248: 5598-5604.
- 130- Sieja K, Stanosz S, von Mach-Szczypinski J, Olewniczak S, Stanosz M. **Concentration of histamine in serum and tissues of the primary ductal breast cancers in women.** Breast 2005; 14: 236-241. [Epub 2005 Jan 21].
- 131- Soderling SH, Beavo JA. **Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions.** Curr Opin Cell Biol 2000; 12: 174-179.
- 132- Steel RGD, Torrie JH **Bioestadística: Principios y Procedimientos.** 2^{da} Edición, Ed. Mc Graw Hill S.A., Méjico; 1992.
- 133- Steiner AL, Kipnis DM, Utiger R, Parker C **Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate.** Proc Natl Acad Sci USA 1969; 64: 367-373.
- 134- Stocco DM. **The steroidogenic acute regulatory (StAR) protein two years later. An update.** Endocrine 1997; 6: 99-109.
- 135- Stocco DM. **Tracking the role of a star in the sky of the new millennium.** Mol Endocrinol 2001; 15: 1245-1254.
- 136- Stocco DM, Clark BJ. **Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis.** Biochem Pharmacol 1996; 51: 197-205.

- 137- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. **Multiple Signaling Pathways Regulating Steroidogenesis and StAR Expression: More Complicated Than We Thought.** Mol Endocrinol 2005; [Epub ahead of print].
- 138- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. **Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.** Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7773-7777.
- 139- Tatoyan A, Giulivi C. **Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria.** J Biol Chem 1998; 273: 11044-11048.
- 140- Tatsumi N, Fujisawa M, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. **Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells.** Endocrinology 1997; 138: 994-998.
- 141- Thiebaut R, Garzon B, Millet P, Moreau E, Ducroc R, Geloso JP. **Development of gastric histidine decarboxylase in the rat: sensitivity to fasting and secretagogues.** J Pediatr Gastroenterol Nutr 1985; 4: 482-488.
- 142- Tinajero JC, Fabbri A, Ciocca DR, Dufau ML. **Serotonin secretion from rat Leydig cells.** Endocrinology 1993; 133: 3026-3029.
- 143- Towbin H, Staehelin T, Gordon J **Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 4350-4354.

- 144- Tuncel N, Gurer F, Aral E, Uzuner K, Aydin Y, Baycu C. **The effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on mast cell invasion/degranulation in testicular interstitium of immobilized + cold stressed and beta-endorphin-treated rats.** Peptides 1996; 17: 817-824.
- 145- 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.
- 146- Van't Hof RJ, Ralston SH. **Nitric oxide and bone.** Immunology 2001; 103: 255-261.
- 147- Wagner W, Ichikawa A, Tanaka S, Panula P, Fogel WA. **Mouse mammary epithelial histamine system.** J Physiol Pharmacol 2003; 54: 211-223.
- 148- Wang Y, Goligorsky MS, Lin M, Wilcox JN, Marsden PA. **A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH₂-terminal truncated nitric-oxide synthase.** J Biol Chem 1997; 272: 11392-11401.
- 149- Wang Y, Newton DC, Miller TL, Teichert AM, Phillips MJ, Davidoff MS, Marsden PA. **An alternative promoter of the human neuronal nitric oxide synthase gene is expressed specifically in Leydig cells.** Am J Pathol 2002; 160: 369-380.
- 150- Wang LD, Wang M, Todisco A, Grand E, del Valle J. **The human histamine H₂ receptor regulates c-jun and c-fos in a differential manner.** Am J Physiol Cell Physiol 2000; 278: C1246-C1255.

- 151- Watt AP, Ennis M. **Characterization of histamine release by mast cells, basophils and monocytes.** En: Falus A (ed.); Grosman N, Darvas Z (co-eds.), Histamine: Biological and Medical aspects. SpringMed publishing Ltd; 2004: 99-111.
- 152- Weissman BA, Jones CL, Liu Q, Gross SS. **Activation and inactivation of neuronal nitric oxide synthase: characterization of Ca(2+)-dependent [¹²⁵I]-Calmodulin binding.** Eur J Pharmacol 2002; 18: 9-18.
- 153- Welch C, Watson ME, Poth M, Hong T, Francis GL. **Evidence to suggest nitric oxide is an interstitial regulator of Leydig cell steroidogenesis.** Metabolism 1995; 44: 234-238.
- 154- Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. **Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility.** Hum Reprod 2000; 15: 1543-1547.
- 155- 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.
- 156- Zhao X, Ma W, Das SK, Dey SK, Paria BC. **Blastocyst H2 receptor is the target for uterine histamine in implantation in the mouse.** Development 2000; 127: 2643-2651.
- 157- Zieher LM, Debeljuk L, Iturriza F, Mancini RE. **Biogenic Amine Concentration in Testes of Rats at Different ages.** Endocrinology 1971; 88: 351-354.

158- Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. **Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death.** Biol Reprod 1996; 55: 935-941.