UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Participación de la histamina en la biología de los tumores de células de Leydig: estudio de su rol en la progresión tumoral y el bloqueo de su síntesis como potencial estrategia terapéutica.

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

Adriana María Belén Abiuso

Director de Tesis: Dra. Carolina Mondillo

Director Asistente: Dr. Omar Pedro Pignataro

Consejero de Estudios: Dra. Cecilia Varone

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Buenos Aires, 2020

Fecha de defensa: 17 de marzo de 2020

Resumen

Participación de la histamina en la biología de los tumores de células de Leydig: estudio de su rol en la proliferación celular, su posible capacidad angiogénica y el bloqueo de su síntesis como potencial estrategia terapéutica.

Los tumores de células de Leydig (TCL) son tumores endócrinos que se originan principalmente en el intersticio testicular, y en menor proporción en ovario, glándula adrenal y cordón espermático. Según reportes recientes asociados a una mejora en las técnicas de diagnóstico, la incidencia de los TCL testiculares se halla en aumento. Estos tumores se asocian a un 48% de infertilidad masculina, y si bien suelen ser benignos, cuando malignizan no responden a las terapias disponibles actualmente, dando como resultado una sobrevida promedio de solamente dos años. Más aun, múltiples trabajos reportan la reaparición de TCL hasta diez años después de su remoción, sugiriendo así la presencia de células remanentes en otros órganos al momento del tratamiento. Los TCL se caracterizan por una sobreproducción de esteroides, cuyo resultado es la pseudo-pubertad precoz en niños y la disfunción eréctil o ginecomastia, en adultos. En conjunto, lo expuesto evidencia la necesidad de establecer nuevos enfoques terapéuticos. La histamina (HA), amina biogénica sintetizada únicamente por la enzima histidina decarboxilasa (HDC), ha sido descripta en múltiples patologías como factor de crecimiento autócrino, además de su conocido rol como neurotransmisor y modulador de la inflamación. A su vez, ha sido relacionada con el síndrome carcinoide, en donde en forma secundaria a la patología de origen, como ser los tumores secretores de HA, el paciente experimenta diarrea, hipotensión, taquicardia, vasoconstricción, disnea, fibrosis retroperitoneal e incluso falla cardíaca. En nuestro laboratorio hemos descripto la sobreexpresión de HDC en células de Leydig (CL) tumorales MA-10, las cuales también presentan un aumento significativo en la actividad de la enzima en comparación con las CL normales. A su

vez, observamos que en dichas células la HA es capaz de estimular la proliferación celular, y que ejerce un efecto modulador sobre la esteroidogénesis. En base a las consideraciones descriptas, el objetivo de este trabajo fue investigar el papel de la HA en la progresión de los TCL, su efecto sobre la neo-angiogénesis tumoral, y la inhibición de HDC como potencial estrategia terapéutica, tanto para disminuir el tamaño tumoral como para evitar las complicaciones asociadas al tumor y a los tratamientos actuales. En este sentido, la orquiectomía radical y/o la quimioterapia utilizadas de rutina en la clínica conllevan efectos secundarios físicos y psicológicos, que afectan la calidad de vida de los pacientes. En primer término, realizamos ensayos *in vitro* en dos líneas celulares de TCL con diferente fenotipo (las CL de ratón MA-10, que secretan como esteroide mayoritario progesterona ante la estimulación con LH, y las CL de rata R2C, que secretan estradiol de forma constitutiva), y observamos que la HA incrementó la proliferación celular, la neo-angiogénesis y la síntesis de esteroides. Además, las CL R2C presentaron elevada expresión de HDC, al igual que habíamos reportado previamente para las CL MA-10. En concordancia con estos resultados, observamos intensa marcación positiva para HDC en cortes de testículo de pacientes portadores de TCL, no así en controles normales de la misma edad. A su vez, la inhibición de HDC utilizando dos inhibidores, α-MHD y EGCG (sintético y natural, respectivamente) resultó en una disminución de la proliferación celular y la síntesis de esteroides, así como también disminuyó la producción de factores pro-angiogénicos por parte de las CL tumorales. Para los estudios *in vivo* se establecieron dos modelos de TCL murinos a partir de las líneas de CL tumorales citadas. En ambos modelos se evaluó el efecto de α-MHD y EGCG, solos o en combinación con Carboplatino (CP). En el caso de los TCL generados a partir de las CL MA-10, α-MHD fue capaz de disminuir el tamaño tumoral, solo y en combinación con CP, a diferencia de EGCG que no mostró efecto sobre el crecimiento del tumor en los tiempos y esquema de dosis estudiados. Por su parte, el crecimiento de los TCL generados a partir de las CL R2C sólo disminuyó post tratamiento con α-MHD o EGCG en combinación con CP; los inhibidores

administrados solos no tuvieron efecto. Puntualmente la combinación de EGCG con CP fue la más eficaz, dado que el crecimiento de los tumores se detuvo a tiempos tempranos. A pesar de no observarse efecto de ninguno de los inhibidores solos sobre el crecimiento tumoral en los tiempos evaluados, se registró una disminución en los niveles de esteroides plasmáticos, demostrando así su capacidad de contrarrestar el desbalance hormonal asociado la presencia de un tumor endócrino. En conjunto, los resultados de estos ensayos dan cuenta de la necesidad de establecer a futuro a qué fenotipo pertenecen los pacientes con TCL, a fin de definir el inhibidor de HDC que será más efectivo. Con base en los hallazgos que aquí se describen, el presente trabajo demuestra por primera vez el rol de la HA en el crecimiento de los TCL, y sienta las bases para el desarrollo de una estrategia terapéutica novedosa, menos agresiva que las utilizadas actualmente, que apunte a la inhibición de HDC. Las publicaciones relacionadas con el efecto protector del EGCG sobre las gametas masculinas en pacientes sometidos a tratamientos oncológicos subrayan la importancia del presente trabajo, y validan el uso de EGCG en combinación con las terapias de rutina.

Palabras clave: **Tumor de células de Leydig – Angiogénesis – Proliferación celular – Histamina – Galato de epigalocatequina -**

Abstract

Histamine participation in the biology of Leydig cell tumors: study of its role on cell proliferation, its possible pro-angiogenic capacity and the inhibition of its synthesis as a potential therapeutic strategy.

Leydig cell tumors (LCT) are endocrine tumors that originate primarily in the testicular interstitium, and to a lesser extent in the ovary, adrenal gland and spermatic cord. According to recent reports associated with an improvement in diagnostic techniques, the incidence of testicular LCT is increasing. These tumors are associated with 48% male infertility, and although they tend to be benign, when they become malignant they do not respond to currently available therapies, resulting in an average survival of only two years. Moreover, multiple studies have reported the reappearance of LCT up to ten years after its removal, suggesting the presence of remaining cells in other organs at the time of treatment. LCTs are characterized by an overproduction of steroids, the result of which is early pseudo-puberty in children and erectile dysfunction or gynecomastia in adults. All in all, the evidence above demonstrates the need to establish new therapeutic approaches. Histamine (HA), a biogenic amine synthesized solely by histidine decarboxylase (HDC) enzyme, has been described in multiple pathologies as an autocrine growth factor, in addition to its well-known role as a neurotransmitter and modulator of inflammation. Also, HA has been related to the carcinoid syndrome, a paraneoplastic syndrome which causes the patient to experience diarrhea, hypotension, tachycardia, vasoconstriction, dyspnea, retroperitoneal fibrosis and even heart failure. In our laboratory we have described the overexpression of HDC in MA-10 tumor Leydig (LC) cells, which also have significantly increased enzyme activity compared to normal LC. Also, we observed that in these cells HA is capable of stimulating cell proliferation, and that it can modulate steroidogenesis. Based on the above, the objective of this thesis was to investigate the role of HA in the progression of LCT, its effect on tumor neo-angiogenesis, and the inhibition of HDC

as a potential therapeutic strategy not only to reduce tumor growth but also to minimize complications related to the tumor itself and to current treatments. In this sense, radical orchiectomy and / or chemotherapy routinely used in the clinic have physical and psychological side effects that affect the life quality of the patients. Firstly, we performed in vitro assays in two LCT cell lines with different phenotype (MA-10 mouse LCs, which secrete progesterone upon stimulation with LH as a major steroid, and R2C rat LCs, which secrete estradiol in a constitutive manner), and we observed that HA increased cell proliferation, neo-angiogenesis and steroid synthesis. In addition, R2C LCs showed high HDC expression, as we had previously reported for MA-10 LCs. In accordance with these results, we observed intense positive HDC staining in testis sections of patients with LCT, but not in normal controls of the same age. Additionally, inhibition of HDC using two inhibitors, α-MHD and EGCG (synthetic and natural, respectively) resulted in a decrease in cell proliferation and steroid synthesis, as well as in a decreased production of pro-angiogenic factors by tumor LC. For in vivo studies, two murine LCT models were established based on the aforementioned tumor LC lines. In both models we evaluated the effect of α-MHD and EGCG, as single agents or in combination with Carboplatin (CP). In the case of the LCT generated from MA-10 LCs, α-MHD was able to decrease the tumor size, alone and in combination with CP, unlike EGCG which showed no effect on tumor growth over the time and dosing scheme studied. On the other hand, the growth of the LCT generated from R2C LCs only decreased after treatment with α-MHD or EGCG in combination with CP; the inhibitors administered alone had no effect. Particularly, the combination of EGCG with CP was the most effective, since the growth of the tumors stopped at early stages. In spite of not observing an effect of any of the inhibitors alone on tumor growth in the evaluated times, we did see a decrease in plasma steroid levels, thus demonstrating their ability to counteract the hormonal imbalance associated with the presence of an endocrine tumor. Together, the results of these work evidence the need to establish the phenotype to which patients baring LCT belong, in order

to define which HDC inhibitor would be most effective. Based on the findings described herein, this work demonstrates for the first time the role of HA in the growth of TCL, and sets the basis for the development of a novel therapeutic strategy, less aggressive than the ones currently used, directed to HDC inhibition. Recent publications related to the protective effect of EGCG on male gametes in patients undergoing cancer treatments underline the importance of this work, and validate the use of EGCG in combination with current therapies.

Key words: **Leydig cell tumor – Angiogenesis – Cell proliferation – Histamine – Epigallocatechin gallate**

Agradecimientos

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo y colaboración, tanto directa como indirecta, de **todos** los que me rodean.

Les agradezco principalmente a:

Esta casa de estudios de excelencia, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires; y al CONICET, por el financiamiento para realizar los experimentos y por la adjudicación de la beca para poder llevarlos a cabo.

Al Dr. Omar Pignataro, por abrirme las puertas de su laboratorio en el Instituto de Biología y Medicina Experimental y permitirme moverme con absoluta libertad día a día. Y a todos los miembros del IBYME, que de forma directa o indirecta, facilitaron la concreción de esta tesis. Particularmente a nuestros compañeros de pasillo, a Luis por ayudarme con los ensayos de angiogénesis, y a Nati por su constante buena predisposición en el Bioterio.

A mi directora de Tesis, la Dra. Carolina Mondillo, quien supo guiarme a través de este proceso de aprendizaje, dándome el espacio necesario para que pueda tomar mis decisiones y aconsejándome cuando me estaba desviando de mi objetivo. Quien también siempre me ayudó a analizar los resultados de forma crítica y completa, y quien absolutamente **siempre** me trató con respeto y cariño.

A mi compañera y amiga, Marilú, cuya aparición en el laboratorio cambió rotundamente mi día a día, ayudándome constantemente con los experimentos, con el análisis de resultados y discusión al respecto; con quien remamos para optimizar los recursos y poder sacar lo mejor de ellos. Con quien aprendimos a trabajar *in vivo* juntas, poniendo a punto las técnicas y aprendiendo de nuestros errores; y quien me enseñó a ser más crítica en muchos aspectos. Sin ella la segunda mitad de esta tesis hubiera sido muy

aburrida, y los últimos 11 años de mi vida ni les cuento! Sin duda el trabajo en equipo es siempre mucho mejor.

A Trini, que me demuestra todos los días que se puede trabajar con excelencia, no importan las adversidades. Con quien compartimos el mejor y último congreso del doctorado, a base de risas y anécdotas difíciles de olvidar.

A Marcus Alberto, quien me apoyó desde el primer día en el que llegué al laboratorio, ayudándome y escuchándome siempre. Quien además hizo que mi paso por el laboratorio fuese sumamente divertido y quien me regaló las mejores carcajadas de la historia cuando me mostró su foto-carnet italiana. Nunca lo voy a olvidar (lo de la foto carnet).

A mi compañero y amigo, Dieguito, quien me hizo notar lo "francamente aburrido" que es levantar células de una placa de cultivo, y me consiguió miles de testículos caninos para nuestro próximo proyecto. Además de recomendarme muy buen material literario.

A Elba, con quien compartimos algunas pasiones más que el pipeteo en la mesada y que fueron motivo de extensas charlas durante los almuerzos. Y a Cachy, que fue la primera que me adoptó en el laboratorio y me dejó invadir su espacio a preguntas para enseñarme todo lo que estaba haciendo.

A Espe, mi ángel de la guarda científico. Siempre dispuesta a dar lo mejor de sí para que esta tesis tuviera excelente material clínico y resultados. Y a todos los miembros de su Laboratorio en el Garrahan y al Servicio de Juan Manuel Lazatti, quienes siempre nos recibieron con la mejor onda y nos hicieron sentir como en casa.

A Tita, primero mi colega, después mi compañera, y finalmente y más importante: una gran amiga. Guardo miles de anécdotas juntas. Gracias por ser incondicional siempre y por tus brillantes consejos científicos.

A mi grupo hermoso de Spanglish: Marita, Maurito y Chevy; "los Elizalde", los mejores compañeros y amigos que me pude haber cruzado. Gracias a ellos muchos de estos resultados no serían posibles. SIEMPRE que los necesité me ayudaron, ya sea con un reactivo o con un consejo. Para ellos un especial agradecimiento. Y por supuesto por los mates post-laboratorio, por los piletazos, por salvarnos del robo gritando ''oficial, oficial'', por las anécdotas, por llevarme a las fiestas del IBYME y por el cariño inmenso. Y por supuesto gracias por sacar las malas ondas con palo santo. Siempre me hicieron sentir parte de su laboratorio. También les agradezco a Ceci, Fran, a Lean y a Cancu que cada vez que fue necesario me dieron una mano.

A los miembros del laboratorio de la Dra. Patricia Cuasnicú y de la Dra. Parborell por facilitarnos ratones para los experimentos. Gracias Mili, Solcito, Nati y Gonza particularmente.

A mis amigas de la facultad, las Lechonas: Sil, So, Neity, Flo, Ra, que saben todas y cada una de las cosas que pasaron los últimos cinco años y que siempre estuvieron ahí para dar lo mejor, particularmente cuando uno andaba necesitando una sonrisa.

A mis amigas de la vida, Gaby y Dany, que a pesar de que no logran entender lo que uno hace adentro del labo, intentan constantemente estar al día e interesarse por todo.

A los Nefastos, mi grupo selecto de locos lindos que fueron adoptados a lo largo de esta tesis y que día a día me sacan una sonrisa, me prestan un reactivo, me recomiendan un paper, me mandan un meme (sobretodo esto último). A los que están acá y a los que están de pos-doc, que los extraño mucho.

A mi familia política, mi nueva familia adquirida, que siempre me apoya y me tira buena onda, sobretodo en esta etapa de estresante escritura. Gracias Hugo, Elvita, Flo, Gi y Martín. Y gracias a Tati por su ayuda, su transparencia y su bondad.

A mi marido, Luqui (Doris para los amigos), que es lo más. Que me saca una sonrisa todo los días. Sí, todos. Quien me ayudó con la confección de este trabajo cuando no

podía editar una imagen y me ponía nerviosa; y me tiró buena onda desde el momento en el que me senté a escribir. Que me imprimió mil páginas de prueba para verificar que esté todo perfecto. Quién me acompañó a congresos nacionales e internacionales, demostrándome su apoyo constante aunque su profesión poco tuviera que ver con este trabajo. Quien se ofreció a sacar fotos en eventos relacionados con el instituto donde desarrollé la tesis, demostrándome nuevamente su incondicionalidad para ayudar siempre, y a quien tuve trabajando de cocinero durante la confección de esta tesis. La vida con Doris no sería lo mismo sin Lito y Pipi, mi familia.

Finalmente un agradecimiento especial a mi papá, que siempre me transmitió la importancia de hacer las cosas bien. Quien me apoyó cuando decidí dedicarme a esto y estuvo sentado seis horas esperando que salga de rendir un final de física. A mi mamá, que a pesar de no haber estado físicamente presente durante este trabajo, siempre estuvo conmigo. Y a mi hermano y mejor amigo, Fede, la persona más fuerte del mundo. Quien no deja de enseñarme constantemente que con buena energía y motivación se puede alcanzar cualquier objetivo, y que uno tiene que ser feliz en todos lados, en todo momento.

A mi mamá, a mi abuela y al Tata.

Índice

Publicaciones relacionadas con este trabajo de tesis..... 19

Abreviaturas..... 21

Introducción

Sistema endocrino testicular. El testículo como órgano endócrino..... 27

Células de Leydig..... 28

Células de Leydig fetales..... 30

Células de Leydig adultas..... 32

Esteroidogénesis testicular..... 34

Patologías asociadas a las células de Leydig..... 38

Hiperplasia de células de Leydig..... 38

Hipoplasia de células Leydig..... 38

Células de Leydig ectópicas..... 39

Tumores de células de Leydig..... 39

Aspectos generales e incidencia..... 39

Manifestaciones clínicas de los tumores de células de Leydig... 41

Diagnóstico histopatológico..... 42

Etiología..... 43

Estrategias terapéuticas..... 44

Aspectos básicos relacionados con la biología tumoral..... 47

Modulación de la proliferación e inhibición de apoptosis..... 47

Modulación del proceso de neo-angiogénesis tumoral..... 48

Histamina..... 50

Generalidades..... 50

Síntesis y degradación..... 51

Receptores a histamina..... 55

Receptor a histamina tipo 1..... 56

Receptor a histamina tipo 2..... 56

Receptor a histamina tipo 3..... 57

Receptor a histamina tipo 4..... 58

Internalización de receptores..... 59

Histaminilación..... 60

Histamina en la progresión tumoral..... 61

Inhibidores de la síntesis de histamina..... 62

Galato de epigalocatequina..... 62

a-metil-DL-histidina..... 64

Antecedentes del laboratorio que dan origen a la hipótesis..... 65

Experimentos *in vitro* en CL tumorales en comparación con CL normales..... 65

Caracterización del perfil de expresión proteico en pacientes pediátricos con TCL..... 69

Hipótesis y objetivos..... 72

Metodología..... 76

Material clínico..... 77

Modelos experimentales 78

Células de Leydig MA-10..... 78

Células de Leydig R2C..... 78

Células HUVEC..... 80

Ratones C57BL/6 x BALB/c..... 80

Ratones Swiss$^{Nu/Nu}$. 80

Reactivos generales..... 81

Métodos..... 82

Inmunohistoquímica..... 82

Cultivo primario de tumores de células de Leydig humanos..... 84

Determinación de angiogénesis *in vitro*..... 84

Proliferación celular..... 85

Inmunocitoquímica..... 86

Western blot..... 87

Determinación de los niveles de ARN mensajero 88

Cuantificación de histamina. 90

Cuantificación de progesterona y estradiol por RIA..... 91

Ensayo de actividad de aromatasa..... 92

Evaluación de angiogénesis *in vivo*. Ensayo CAM. 93

Experimentos *in vivo* en los modelos murinos de Leydigioma..... 94

Protocolo de inyección y obtención de muestras..... 94

Determinación de los niveles de progesterona, testosterona y estradiol en plasma. 96

Determinación de apoptosis mediante la técnica de TUNEL..... 96

Análisis Estadístico..... 97

Resultados..... 98

Capítulo 1. De la histamina y su rol como factor de crecimiento en células de Leydig tumorales

1.1. Expresión de HDC en niños durante el desarrollo gonadal normal y en pacientes pediátricos con tumores de células de Leydig..... 100

1.2.1. La HA como moduladora de la proliferación en CL tumorales... 107

1.2.2. Estudio de la expresión de TGM-2 en TCL..... 110

1.3. Inhibición de la síntesis de HA como estrategia para disminuir el crecimiento de las CL tumorales..... 113

1.4. Modulación negativa de la síntesis de esteroides utilizando inhibidores de HDC..... 115

1.5. Inhibición de la angiogénesis *in vitro* como estrategia para detener el crecimiento tumoral..... 117

Conclusiones parciales del Capítulo 1..... 119

Capítulo 2. De la histamina y su rol como factor de crecimiento en células de Leydig tumorales *in vivo.*

2.0. Establecimiento de modelos pre-clínicos de Leydigioma..... 121

Capítulo 2. Sección 1. Experimentos *in vivo* en TCL establecidos a partir de CL MA-10.

2.1.1. Efecto del tratamiento intraperitoneal con EGCG en combinación con CP en TCL MA-10..... 125

2.1.2. Efecto del tratamiento con inyecciones intra-tumorales de EGCG en combinación con CP en TCL MA-10..... 127

2.1.3. Efecto del tratamiento intraperitoneal con α-MHD en combinación con CP en TCL MA-10..... 131

2.1.4. Análisis del efecto de los tratamientos sobre el estado general de los ratones..... 134

2.1.5. Análisis de la modulación del proceso de angiogénesis *in vivo*... 137

2.1.6. Análisis de la efectividad de los compuestos para inhibir el funcionamiento del sistema histaminérgico en tumores de CL MA-10..... 138

2.1.7. Análisis de inmunogenicidad de los tumores de CL MA-10..... 140

Capítulo 2. Sección 2. Experimentos *in vivo* en TCL establecidos a partir de CL R2C.

2.2.1. Crecimiento tumoral, síntesis de esteroides y estado general..... 142

2.2.2. Estado general de los ratones luego del tratamiento..... 149

2.2.3. Análisis del efecto del tratamiento con EGCG sobre los niveles de glucosa 151

2.2.4. Análisis de la efectividad de los compuestos para inhibir el funcionamiento del sistema histaminérgico en tumores de CL R2C..... 152

2.2.5. Estudio del efecto de los tratamientos sobre la esteroidogénesis a través del análisis de la expresión de enzimas que median la síntesis de esteroides..... 154

Capítulo 2. Sección 3. Mecanismos afectados por los tratamientos.

2.3.1. Modulación de los niveles de VMAT-2 en ambos modelos de TCL...156

2.3.2. Participación de p27 en el mecanismo de inhibición del crecimiento tumoral. 158

2.3.3. Cuadro comparativo del efecto de los inhibidores en ambos modelos..... 162

Capítulo 2. Sección 4. 164

2.4. Posible origen fetal de los TCL. 164

Conclusiones parciales del capítulo 2. 166

Discusión..... 168

Conclusiones..... 190

Referencias..... 193

Publicaciones

Los resultados obtenidos durante el período de realización de este trabajo de tesis y la colaboración en otras líneas de investigación, dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- H4 Histamine receptors inhibit steroidogenesis and proliferation in Leydig cells. ***Abiuso, Adriana María Belén****; Pereyra, Elba Nora; Medina, Vanina; Martinel Lamas, Diego José; Besio Moreno, Marcos; Pignataro, Omar Pedro; Mondillo, Carolina. Journal of Endocrinology. 2014 Dec;223(3):241-53.*

- Histamine H4 receptor as a novel therapeutic target for the treatment of Leydig cell tumors in prepubertal boys. ***Adriana M. Abiuso****; María L Varela; Luis A Haro Durand; Marcos A Besio Moreno; Alejandra Marcos; Roberto Ponzio; Marco A Rivarola; Alicia Belgorosky; Omar P Pignataro; Esperanza Berensztein; Mondillo, Carolina. European Journal Of Cancer. March 2018. Volume 91, Pages 125–135.*

- Sistema histaminérgico testicular: consideraciones sobre el empleo de antihistamínicos y su potencial efecto en la reproducción masculina. *Mondillo, C; Varela, ML y* ***Abiuso, AMB****. Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproducción. Vol. XXVI, Supl. Enero – junio 2019: 54-59.*

- Inhibidores de Histidina Decarboxilasa atenúan la actividad pro-angiogénica de células de Leydig tumorales: ¿potencial terapia neoadyuvante para el tratamiento de leydigiomas? ***Abiuso, AMB****; Varela, ML; Haro Durand, L; Besio Moreno, M; Ponzio, R; Rivarola, M; Belgorosky, A; Pignataro, OP; Berensztein, E; Mondillo, C. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo. 2018.* ***Primer premio del área de investigación en ciencia básica de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo, 2017.***

- Estudio de la expresión del receptor de vitamina D en la ontogenia del testículo y en tumores de células de Leydig: posible interacción con el sistema histaminérgico. *Varela, M.* ***Abiuso, A.M.B****.; Berensztein, E.; Besio Moreno, M.; Belgorosky, A.; Pignataro, O.P.; Knoblovits, P.; Suárez, S.; Costanzo, P.R. y Mondillo, C. Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo. 2018.* ***Segundo premio del área de investigación en***

ciencia básica de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo, 2017.

- Potential deleterious effects of anti-histamines on male reproductive function. *Mondillo, C; Varela, ML;* ***Abiuso, AMB****; Vázquez, R. Reproduction. March 9, 2018.*

- Overexpression of 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 in visceral adipose tissue and underexpression of endothelial Nitric Oxide synthase in the adrenal cortex of dogs with Hyperadrenocorticism'. *Miceli, Diego;* ***Abiuso, Adriana María Belén****; Vidal, Patricia; Gallelli, Florencia; Pignataro, Omar Pedro; Castillo, Víctor. Open Veterinary Journal. Manuscript Number: OVJ-2017-07-123.*

- **Manuscrito en preparación con los resultados *in vivo* aquí presentados.**

Abreviaturas utilizadas en este trabajo

α-MHD: DL-α-metilhistidina dihidrocloruro

AC: adenilato ciclasa

ACTH: hormona adrenocorticotropa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de la varianza

BSA: albúmina sérica bovina

cADN: ADN cíclico

CAM: membrana corioalantoidea

CL: Célula de Leydig

COX-2: ciclooxigenasa 2

CP: Carboplatino

CYP19: aromatasa

DAG: diacilglicerol

DAO: diaminooxidasa

db-AMPc: dibutiril adenosín 3´, 5´-monofosfato cíclico

DEX: dexametasona

DHT: dihidrotestosterona

EC50: concentración efectiva para el 50% de respuesta

EDTA: ácido etilen diamino tetra acético

EGCG: galato de epigalocatequina

EGF: factor de crecimiento epidérmico

E2: estradiol

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster

FXR: receptor nuclear farnesoide X

F1: progenie de la cruza de ratones C57BL/6 x BALB/c

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

GPCR: receptor acoplado a proteína G

G0-G4: categoría de clasificación según estadio del desarrollo gonadal

H1: receptor histaminérgico subtipo 1

H2: receptor histaminérgico subtipo 2

H3: receptor histaminérgico subtipo 3

H4: receptor histaminérgico subtipo 4

HA: histamina

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

HDC: histidina descarboxilasa

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HNMT: histamina-N-metil transferasa

HRF: factor liberador de histamina

HRP: peroxidasa

IBS: Índice Bazo-somático

ICQ: inmunocitoquímica

IgE: inmunoglobulina E

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1

IGS: Índice gonado-somático

IP_3: inositol trifosfato

IHQ: inmunohistoquímica

IHS: Índice hepato-somático

INSL3: Factor símil insulina tipo 3

i.p.: intraperitoneal

i.t.: intratumoral

IP3: inositol fosfato

KO: ratones noqueados genéticamente

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LH: Hormona Luteinizante

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MAO: monoaminaoxidasa

MC: medios de cultivo condicionados

NADP: coenzima oxirreductora nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

OCT: transportador de cationes orgánicos

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación

PDGFR: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGE2: prostaglandina E2

PKC: proteína quinasa C

P27: inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina

P4: progesterona

P53: proteína supresora de tumores p53

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PKA: proteína quinasa A

PLP: piridoxal 5'-fosfato

PVDF: fluoruro de polivinilideno

P450scc/ CYP11A1: complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol, dependiente de citocromo P450

P450c17/CYP17: enzima 17α-hidroxilasa/17-20 liasa, dependiente de citocromo P450

RIA: Radioinmunoensayo

RE-α: Receptor de estrógenos Alfa

RE-β: Receptor de estrógenos Beta

RE: retículo endoplasmático

StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

T: testosterona

TBS: Tris buffer salino

TCA: Ácido tricloroacético

TCL: tumor de células de Leydig

TCL MA-10: tumor de células de Leydig obtenido por inoculación de CL MA-10

TCL R2C: tumor de células de Leydig obtenido por inoculación de CL R2C

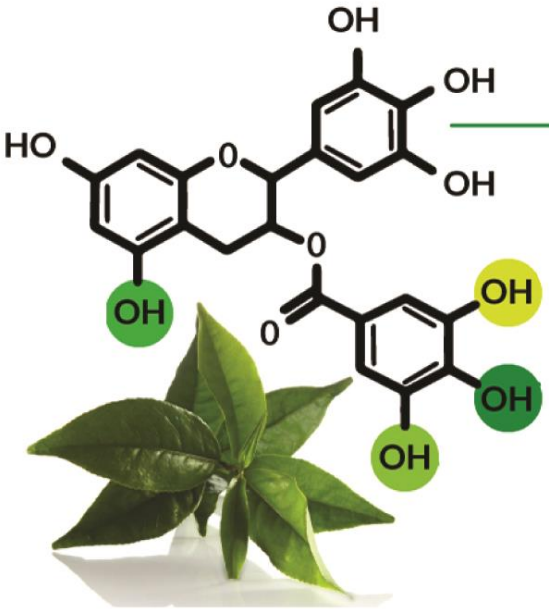
TGM-2: trasnglutaminasa 2

VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular

VMAT-2: transportador vesicular de monoaminas tipo 2

11β-HSD: 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

17β-HSD: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa



Introducción

1. El sistema endócrino testicular y las células de Leydig.

1.1. El testículo como órgano endócrino.

El testículo es uno de los principales órganos responsables de la reproducción en vertebrados, y en mamíferos se encuentra compartimentalizado en dos grandes regiones: los túbulos seminíferos y el intersticio testicular (**Figura 1**).

En los túbulos seminíferos, que abarcan aproximadamente el 90% del tamaño testicular, se desarrolla la espermatogénesis: proceso por el cual las gametas masculinas maduran a espermatozoides. Anatómicamente, los túbulos seminíferos están formados por las células progenitoras de los espermatozoides, denominadas espermatocitos y espermatogonias; y las células de Sertoli, cuya función es ser el soporte físico para la maduración de dichas células progenitoras. A través de uniones fuertes, las células de Sertoli, junto con células peritubulares, que se sitúan rodeando al túbulo, forman la barrera hematotesticular, responsable de la protección de las gametas. La presencia de esta barrera transforma al testículo en un órgano inmunoprivilegiado (Hales, 2002).

Dado que la espermatogénesis se produce íntegramente dentro de los túbulos seminíferos, que a su vez están rodeados por la ya citada barrera hematotesticular, se considera que la modulación del proceso tiene que ser necesariamente a través de factores sintetizados de forma local (Gnessi y col, 1997). Las citoquinas y otros factores inflamatorios son importantes para el desarrollo y la homeostasis testículo (Hales y col, 1999).

En el intersticio testicular se desarrolla principalmente la síntesis de andrógenos destinada al mantenimiento de los órganos reproductores y de la correcta función sexual. Se encuentra situado entre los túbulos seminíferos y está formado por células de Leydig (CL), mastocitos, macrófagos y células endoteliales,

principalmente. Las CL son las principales responsables de la síntesis de hormonas en el testículo.

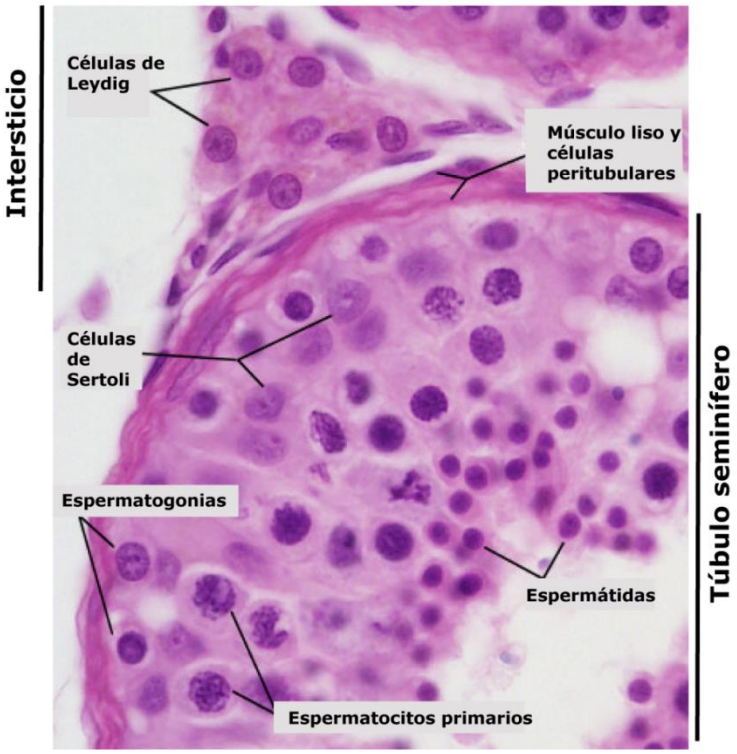


Figura 1. Aspecto general de testículo. Corte transversal de testículo coloreado con hematoxilina y eosina. Se puede observar como las CL se encuentran en el intersticio, entre dos túbulos seminíferos. Tomado y adaptado de: Blue Histology - Male Reproductive System. School of Anatomy and Human Biology -The University of Western Australia.

1.2. Células de Leydig

Las células de Leydig (CL) conforman una de las poblaciones más importantes dentro del testículo. Son las responsables de la síntesis y secreción de hormonas esteroideas, para modular, entre otras cosas, la espermatogénesis. Si bien la correcta maduración de las gametas durante el proceso de espermatogénesis depende de la expresión de genes específicos, de una meiosis correcta, y de la formación de las estructuras características de los espermatozoides; que este proceso llegue a término está relacionado directamente

con la presencia de dichas hormonas esteroideas (Zirkin y col, 1998). Las CL se encuentran agrupadas y rodeando vasos sanguíneos de pequeño calibre a través de los cuales las hormonas sintetizadas son liberadas a circulación (**Figura 2, C**).

A su vez, los esteroides modulan la aparición de caracteres ligados al sexo. Un ejemplo de este tipo de modulación es el que ejerce la testosterona como responsable de la masculinización de caracteres sexuales secundarios. Además, los esteroides son los encargados de mantener la integridad de la barrera hematotesticular (Meng y col, 2005).

En roedores existen dos poblaciones de CL maduras: las CL fetales, responsables de esta síntesis temprana de testosterona, y las CL adultas, quienes modulan el desarrollo testicular y reproductivo a partir de la pubertad. En humanos y primates se considera que existen también precursores de las CL que hacen un aporte temprano de testosterona durante los primeros días de vida (Griswold y Behringer, 2009).

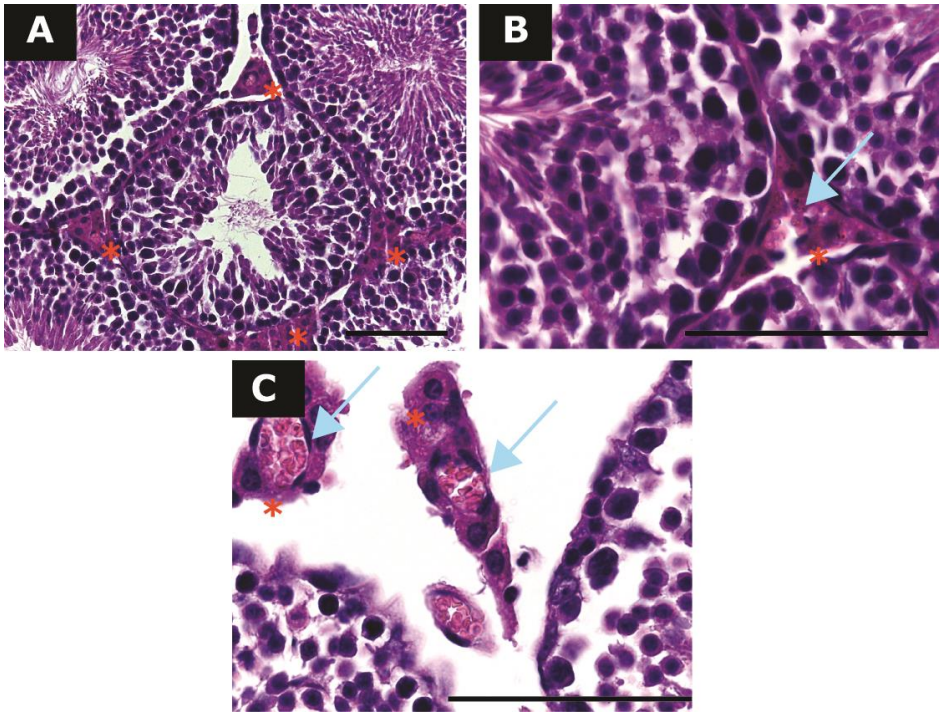


Figura 2. Aspecto general de testículo. Detalle de CL. Corte transversal de testículo coloreado con hematoxilina y eosina. A. Se puede observar como las CL se encuentran

agrupadas en el intersticio (asteriscos rojos), entre los túbulos seminíferos. B. Detalle con mayor magnificación de A. C. Se observa como las CL siempre están asociadas a un capilar o vaso de pequeño calibre (flechas celestes). Las barras negras indican 50 µm.

1.2.1. Células de Leydig fetales.

Sobre el final del desarrollo fetal y durante los seis primeros meses de vida puede observarse en circulación la presencia de testosterona, cuya liberación se le atribuye a las CL fetales (**Figura 3**). Este período está relacionado con la diferenciación y maduración de las gónadas hacia órganos masculinos durante las primeras etapas del desarrollo gonadal.

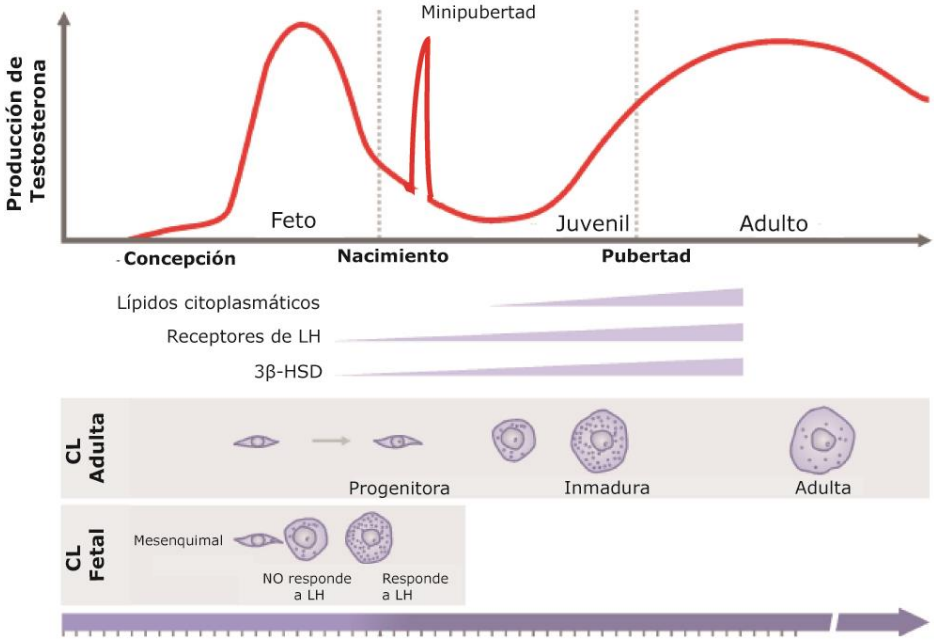


Figura 3. Concentración de testosterona en circulación durante el desarrollo gonadal. Nótese un primer pico durante la vida fetal requerido para la diferenciación de los genitales masculinos y la masculinización del cerebro y un segundo pico durante los primeros meses de vida, en el período denominado minipubertad. Luego la testosterona aumenta conforme se desarrollan las CL adultas. LH: hormona luteinizante. Tomado y modificado de Zirkin y col, 2018; con agregados basados en Kuiri-Hänninen y col, 2014.

Recordemos que los órganos reproductores recientemente formados tienen la capacidad de dar origen a cualquiera de los dos géneros, y que esta determinación sexual estará mediada por los factores que se expresen en ese contexto. En individuos XY, la presencia o ausencia del gen *Sry* en el cromosoma Y determinará que el destino de ese órgano sea un testículo o un ovario (Greenfield and Koopman, 1996). Particularmente las células de Sertoli y las CL fetales son las responsables de culminar con la diferenciación del sistema reproductor hacia el fenotipo masculino. Los andrógenos producidos por las CL fetales en respuesta a la estimulación del receptor de LH (hormona luteinizante), determinan finalmente la aparición de epidídimo y vesículas seminales, y la virilización de los genitales externos (Klonisch y col, 2004). Cabe destacar que durante la vida fetal el receptor de LH puede ser activado por su ligando clásico LH, o por gonadotrofina coriónica humana (hCG), proveniente de la placenta materna.

Se especula que las poblaciones de CL fetales y de CL adultas derivan de precursores diferentes (Dong y col, 2007). Las CL fetales poseen diversos potenciales precursores: células de la cresta neural, poblaciones mesonéfricas que originan el sistema urogenital, y el primordio adrenogonadal, en este último caso compartiendo células progenitoras con la población adrenocortical. Que las CL fetales tengan un origen diferente a las CL adultas toma fuerza en la actualidad debido a que se han publicado trabajos que describen patrones distintos de expresión en ambas poblaciones celulares, lo cual podría reflejar distintos linajes. Sin embargo, estos patrones diferenciales de expresión podrían estar solamente relacionados a diferentes microambientes. Aún no ha sido posible demostrarlo con seguridad en humanos a causa de que casi el completo desarrollo de las CL fetales sucede de forma intrauterina. Por otro lado, el estudio de las CL fetales en modelos murinos ha sido un reto debido a que los procesos que ocurren durante meses o años en el humano, se reducen a períodos muy cortos, generalmente de días en roedores (Griswold y Behringer, 2009).

Las CL fetales a su vez son responsables del descenso de los testículos hacia el escroto, proceso modulado por el factor INSL3 (de su sigla en inglés "*insulin like-3*"). En ausencia de este factor se observan testículos intra-abdominales, proceso que se denomina criptorquidia, y que está asociado con infertilidad y con la aparición de tumores testiculares (Hutson y Hasthorpe, 2005).

Se considera que al menos un 1 % de las CL totales corresponden a CL fetales persistentes durante la vida adulta (Benton y col, 1995), pero a diferencia de las CL adultas, no responden a la estimulación por andrógenos (Shima y col, 2015).

Se caracterizan por su gran tamaño, citoplasma eosinófilo, núcleo esférico con cromatina densa, gran cantidad de gotas lipídicas, retículo endoplasmático liso altamente desarrollado y mitocondrias con numerosas crestas tubulares. La mayoría de estas características son indicios de una alta actividad esteroidogénica por parte de las CL fetales (Bakalska y col, 2003)

1.2.2. Células de Leydig adultas.

Las CL adultas se originan a partir de un proceso de diferenciación que puede subdividirse en cuatro pasos según la morfología y función de sus células: 1) células madre progenitoras, 2) CL progenitoras, 3) CL inmaduras, y 4) CL maduras. Esto se ha descripto tanto en testículo de rata como en testículo humano (Chen y col, 2010). Las células madre progenitoras reconocidas por su forma ahusada y su tinción positiva para la enzima 3β-HSD y negativa para el receptor de LH, proliferan activamente hasta dar inicio a la diferenciación celular. A partir de los días posnatales 14 a 18 se hacen reconocibles las CL progenitoras, que mantienen la morfología ahusada y comienzan a expresar receptores para LH y a producir bajos niveles de testosterona. Se considera que son las responsables del pico de testosterona observado durante el período llamado "minipubertad". En este estadio las células tienen una alta actividad mitótica. Para el día post natal 28, las CL

progenitoras ya adquieren la forma redondeada característica de las CL maduras, presentan numerosas inclusiones lipídicas en el citoplasma y forman la población de CL inmaduras. Aumenta la síntesis de testosterona y del retículo endoplasmático y se incrementan los niveles de expresión de las proteínas involucradas en la esteroidogénesis (3β-HSD, P450scc y P450c17). La actividad mitótica baja hasta alcanzar la población definitiva de CL testiculares. La expresión de las enzimas responsables de la síntesis de testosterona continúa aumentando, lo que genera la producción de testosterona como principal esteroide. Morfológicamente poseen un retículo endoplásmico más prominente que las CL inmaduras y menor cantidad de inclusiones lipídicas (Zirkin y col, 2018). Estas características pueden observarse en la **figura 4**.

Las CL adultas no proliferan pero pueden regenerarse atravesando la misma secuencia de estadios a partir de precursores de tipo mesenquimáticos, si la población adulta original es eliminada (Teerds y Rijntjes, 2007).

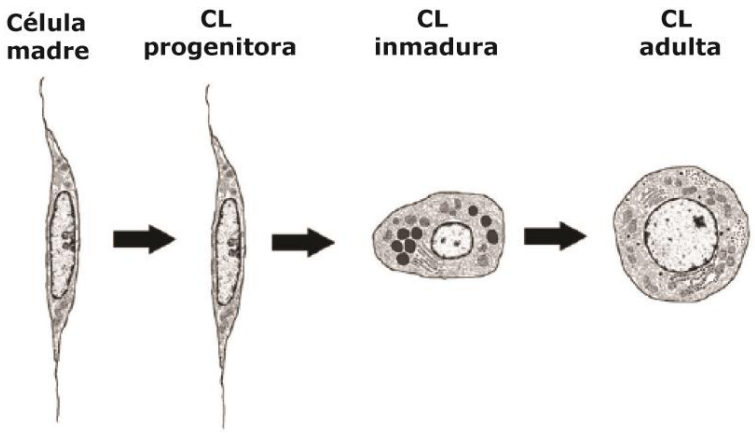


Figura 4. Esquema de la ontogenia de las CL adultas en rata. Figura representativa de las características estructurales durante el desarrollo de las CL. La actividad mitótica es muy alta en el segundo estadio, siendo baja o nula en los restantes. La síntesis de testosterona aumenta conforme maduran las células de Leydig, siendo máxima durante el último estadio. Esta síntesis coincide con la expresión de los receptores de LH presentes en la membrana plasmática celular. Tomado y modificado de Benton y col, 1995.

Si bien son fenotópicamente similares, a diferencia de las CL fetales, las CL adultas poseen menos gotas lipídicas en el citoplasma (Haider y col, 1995). Además se observa la expresión diferencial de enzimas esteroidogénicas específicas, por ejemplo 17β-HSD y 11β-HSD-1; pudiendo ser estas características utilizadas como una forma de distinguir ambas poblaciones (Baker y col, 1997; Haider y col, 1997).

1.3. Esteroidogénesis testicular.

Las hormonas esteroideas son las responsables de un gran número de procesos fisiológicos que incluyen, entre otros, el metabolismo de hidratos de carbono, la homeostasis de sodio y fluidos, la reproducción y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Sewer y Li, 2008). En esta sección abordaremos la síntesis de esteroides desarrollada en el testículo, pero cabe aclarar que existen otros órganos o tejidos capaces de hacerlo, como por ejemplo la glándula adrenal.

La biosíntesis de testosterona, el principal andrógeno producido por las CL, está principalmente bajo el control del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, particularmente mediado por la síntesis de LH, secretada por la hipófisis en respuesta a la estimulación con la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) proveniente del hipotálamo. A través de la unión específica con su receptor, LH promueve la producción de segundos mensajeros, siendo el AMPc el principal, que modula múltiples procesos, entre los cuales durante el proceso de esteroidogénesis se destacan dos: el transporte del colesterol para comenzar con la síntesis de esteroides y la regulación de la expresión de las enzimas necesarias para llevarla a cabo. En el primer caso, el colesterol proveniente de diversas fuentes (Figura 5) es movilizado hacia la célula esteroidogénica, hasta llegar al interior de la mitocondria. En segundo lugar, el AMPc modula la expresión de todas las enzimas esteroidogénicas y su activación (Payne y col, 2004). Este proceso lo realiza a

través de la activación de la proteína quinasa A (PKA), esta última responsable de fosforilar, promoviendo su activación, los factores de transcripción responsables de la expresión de dichas enzimas.

Debido a que controlan tan diversa cantidad de procesos, la síntesis de estas hormonas es finamente regulada por un conjunto de enzimas denominado superfamilia de Citocromos P450, que comprenden particularmente a mono-oxigenasas y esteroide-deshidrogenasas, compartimentalizadas dentro de la mitocondria y el retículo endoplasmático (Sewer y Li, 2008).

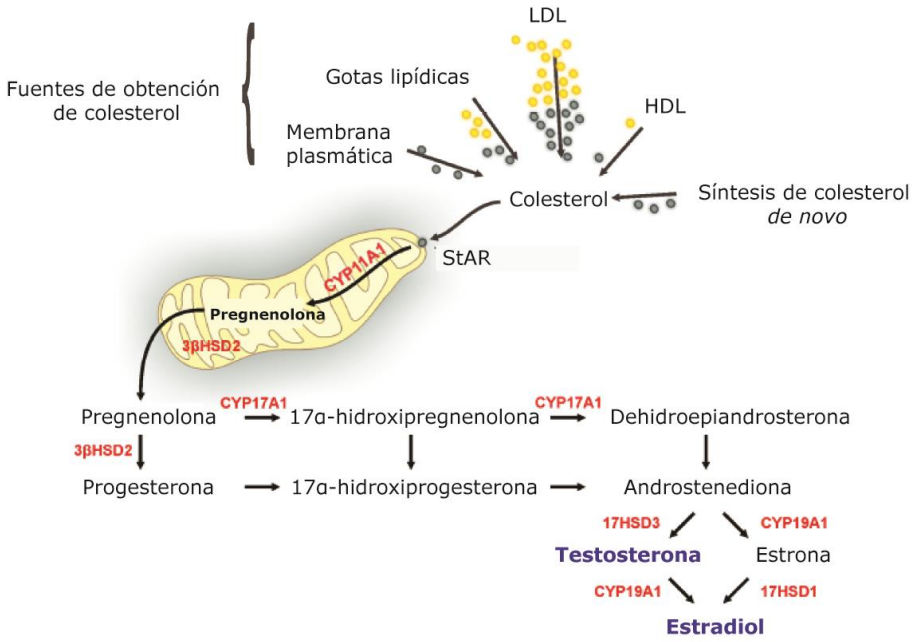


Figura 5. Esteroidogénesis testicular. Esquema representativo de los pasos necesarios para la síntesis de testosterona y estradiol en CL. LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad. En rojo se especifican las enzimas necesarias para la catálisis de cada hormona esteroidea. Tomado y modificado de Zirkin y col, 2018.

Para dar comienzo a la síntesis de esteroides, el colesterol es transportado hacia el interior de la mitocondria por medio de un complejo proteico en el que se destaca la proteína StAR (sigla proveniente de su nombre en inglés: *steroidogenic*

acute regulatory protein; Stocco, 2000). Culminado este transporte, el colesterol es convertido en pregnenolona a través de la escisión de su cadena lateral, proceso mediado por la enzima P450scc (de su nombre en inglés: *cholesterol side-chain cleavage P450*), que se ubica en la membrana interna mitocondrial, orientada hacia la matriz. Se considera que el transporte de colesterol hacia la mitocondria y su conversión a pregnenolona, son los pasos limitantes de la esteroidogénesis.

Seguidamente, la pregnenolona difunde hacia el retículo endoplasmático donde es convertida a progesterona (P4), a través de la acción de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 4-5 isomerasa (3β-HSD). A continuación la P4 es convertida a 17-hidroxiprogesterona, y a su vez a androstenediona, a través de la acción de 17-hidroxilasa/C17-20 liasa (P450c17). La androstenediona es luego transformada en testosterona a través de la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD, Hales y col, 2002). Si bien la testosterona es el producto mayoritario de la esteroidogénesis testicular, se ha publicado que en el testículo se expresa la enzima CYP19 (aromatasa), y que por lo tanto es un órgano capaz de sintetizar estrógenos a través de la aromatización de andrógenos (Inkster y col, 1995), dando como resultado estrona y estradiol.

En condiciones patológicas el proceso esteroidogénico puede estar interrumpido o sobreestimulado, debido a la falta de alguna de las enzimas o a su sobreexpresión, respectivamente.

La síntesis de testosterona ha sido ampliamente descripta, sin embargo recientemente se ha propuesto que su metabolito con mayor actividad, dihidrotestosterona (DHT), podría también sintetizarse a través de sustratos esteroideos diferentes a los mencionados en el párrafo anterior. A este mecanismo alternativo denominado "*backdoor*" se lo describió primeramente en mamíferos marsupiales (Shaw y col, 2006; Miller y col, 2019) y ha sido ratificado en humanos en pacientes con desórdenes del desarrollo sexual que presentan mutaciones en

las enzimas descriptas, como parte de este mecanismo novedoso (Biason-Lauber y col, 2013; Fluck y col, 2011). En la **figura 6** pueden observarse en color rojo a las enzimas alternativas que dan origen a DHT, en contraposición con el proceso de esteroidogénesis clásica.

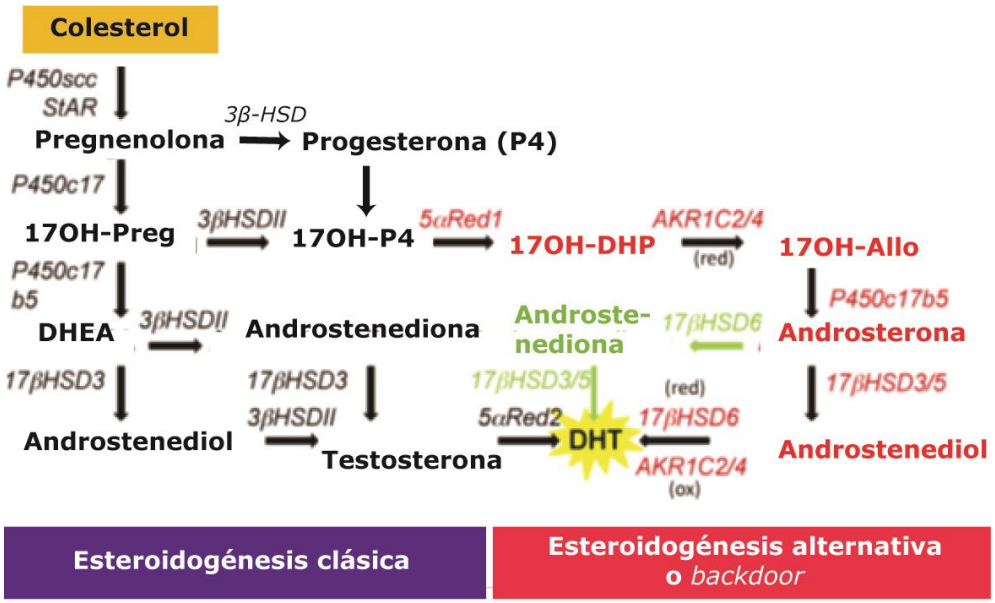


Figura 6. Síntesis alternativa de andrógenos. En color negro se describe la sucesión clásica de reacciones que da origen andrógenos testiculares, y en color rojo se describe la sucesión de reacciones enzimáticas alternativa. DHT: dihidrotestosterona; DHP: dihidroxiprogesterona; Allo: alopregnenolona; DHEA: ehidroepiandrosterona. Tomado y adaptado de Flück y Pandey, 2014.

Una desregulación y activación temprana de la síntesis de testosterona da como resultado la presencia de pubertad precoz, la cual se evidencia por el agrandamiento de los órganos reproductores masculinos y la presencia de vello púbico antes de los 9 años de edad. A la pubertad precoz propiamente dicha se la define en función del aumento de GnRH hipotalámico, lo cual se traduce en una gran síntesis de testosterona testicular. Cuando la fuente de esteroides es

independiente de la activación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, se la define como pseudo pubertad precoz (Alagha y col, 2019).

2. Patologías asociadas a las CL.

2.1. Hiperplasia de CL.

Consiste en la proliferación benigna de las CL testiculares. En este caso las CL se agrupan en nichos más grandes de lo habitual en el espacio intersticial, producto de una proliferación desmedida. Debido a que las CL son las únicas con receptores para LH, se considera que la aparición de esta patología está asociada a una desregulación en los niveles de LH o a una sobreactivación de su receptor. Generalmente se presenta de forma bilateral y conlleva a una desregulación endócrina sistémica, que en sus inicios produce pseudo pubertad precoz y en estado avanzado produce infertilidad (Bensol y col, 2003). A su vez, la estimulación excesiva mediada por LH produce también un aumento en la expresión de CYP19, con lo cual se observan niveles elevados de estradiol en los pacientes afectados.

2.2. Hipoplasia de CL.

En este caso el testículo se caracteriza por un desarrollo incompleto, con presencia de CL más pequeñas y una producción de andrógenos insuficiente. En general está asociado a desórdenes del desarrollo como la insensibilidad a los andrógenos, o con mutaciones inactivantes del receptor de LH, dando lugar a la aparición de pseudohermafroditismo (Laue y col, 1996). Se considera que es producto de una falla en la diferenciación de las CL fetales (Martínez-Mora y col, 1991).

2.3. CL ectópicas.

Las CL ectópicas se ubican fuera del intersticio testicular. Aparecen predominantemente en otras secciones del aparato reproductor masculino, generalmente dentro del túbulo seminífero u obstruyendo conductos deferentes; y también en ovario. Son producto de un disturbio en la señalización durante el desarrollo gonadal (Barsoum y col, 2009) y pueden conducir a infertilidad. La incidencia reportada va desde el 40% al 90% según la fuente, y al día de hoy no existen tratamientos para revertir los efectos secundarios causados por su presencia. A su vez, la importancia de identificar CL ectópicas reside en que pueden confundirse con un carcinoma prostático, melanoma o tumor de CL, todos potencialmente metastásicos (Jun y col, 2008). En la siguiente sección veremos que resulta importante diferenciarlos debido a que los últimos poseen una sobrevida muy corta.

2.4. Tumores de células de Leydig.

2.4.1. Aspectos generales e incidencia.

Los tumores de células de Leydig (TCL), también denominados Leydigiomas, son tumores endócrinos presentes predominantemente en el intersticio testicular, pero en bibliografía se han encontrado numerosos reportes de casos clínicos que dan cuenta que existe también una alta incidencia de este tipo de tumores en ovario, siendo menor en cordón espermático y glándula adrenal (Lanzafame y col, 2004; Pollock y col, 1986). Según reportes de casos clínicos, aproximadamente del 2 al 4% de los tumores testiculares corresponde a TCL, sin embargo, el reciente avance en técnicas de diagnóstico por imágenes sugiere que su incidencia está siendo subestimada, dado que los TCL representarían aproximadamente un 15% del total de tumores del testículo (Leonhartsberger y col, 2011). Más aún, este tipo de técnicas tampoco resulta infalible dado que se ha publicado que para que un

TCL sea encontrado por ese método es necesario que el paciente sea inyectado con un contraste endovenoso, dificultando aún más el diagnóstico de los TCL. Además, se considera que las lesiones benignas no están registradas correctamente debido a un sesgo de la práctica médica asociado al reporte de casos malignos solamente, motivo por el cual se estaría subestimando aún más la incidencia de estos tumores (Ahmed y col, 2010).

Los TCL se caracterizan por presentar dos picos de incidencia, uno a edades tempranas, en pacientes pediátricos de 5 a 10 años de edad, y otro en pacientes adultos de 25 a 35 años (Ahmed y col, 2010). Se hace especial hincapié en estos dos picos de incidencia debido a que se considera que los tumores prepuberales se comportan de manera distinta a los tumores puberales y adultos. Esto se evidencia en que se esperaría una distribución normal de la incidencia, con los pacientes pediátricos en un extremo de la curva, y los adultos en el otro, y sin embargo en este caso estamos en presencia de una distribución bimodal. Además, poseen histología, epidemiología y consecuencias fisiológicas características, y, por lo tanto, los tratamientos deben ser específicos. De hecho, a diferencia del resto de los tumores testiculares prepuberales, cuyo pico de incidencia es antes de los 3 años de edad, los TCL aparecen más tarde. En la clínica se recomienda el tratamiento de los tumores testiculares pediátricos como una entidad separada del resto, motivo por el cual en el año 1980 se creó el "Registro de tumores prepuberales testiculares" en la Unidad de Urología de la Academia Americana de Pediatría (Ross, 2009).

Respecto a la incidencia mencionada, se considera que existe un mayor número de casos en la población perteneciente al primer pico, aproximadamente del 20-30 % (Ruf y col, 2020). A nivel nacional, la Dirección de Estadísticas e Información en Salud del Ministerio de Salud de la Nación (http://www.deis.msal.gov.ar) ha reportado a la fecha un creciente aumento en el

número de egresos y defunciones causadas por tumores testiculares en establecimientos hospitalarios argentinos, lo cual sugiere la necesidad de prestar mayor atención a este tipo de neoplasias; y lo mismo ha sido observado a nivel mundial (Vega y col, 2012; Gheorghisan-Galateanu, 2014). En coincidencia, se ha registrado un aumento constante en el número de publicaciones acerca de TCL a lo largo de los últimos años (**Figura 7**).

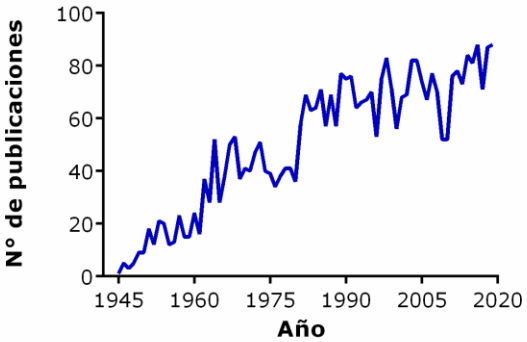


Figura 7. Aumento en el número de publicaciones relacionadas con TCL a la fecha. Nótese como sube de forma constante la cantidad de publicaciones relacionadas a esta patología, habiéndose alcanzado durante el último año 88 trabajos al respecto. Fuente: PubMed: "Tumores de células de Leydig".

2.4.2. Manifestaciones clínicas de los TCL

Los TCL pediátricos se presentan como tumores indoloros, generalmente palpables, con síntomas como pseudo pubertad precoz y altos niveles de 17-cetoesteroides. Del 10 al 15% de estos pacientes puede presentar signos de feminización, generalmente ginecomastia (Ahmed y col, 2010).

En adultos se caracterizan por presentar oligozoospermia (densidad de espermatozoides en el eyaculado menor a 15 x 10^6/mL), azoospermia (carencia de espermatozoides en el eyaculado), pérdida de la libido, ginecomastia, desórdenes endócrinos, infertilidad y/o atrofia testicular (Kim y col, 1985, Ruf y col, 2020).

2.4.3. Diagnóstico histopatológico

Los TCL se presentan generalmente circunscriptos en nódulos amarillentos y están compuestos por células grandes poligonales con abundante citoplasma eosinófilo. El 40% de los casos presenta cristales de Reinke, característica utilizada para diferenciarlos de otro tipo de tumores. Presentan expresión positiva para calretinina, vimentina e inhibina (Ahmed y col, 2010).

Los TCL malignos presentan también citoplasmas eosinófilos, pero con núcleos con marcado pleomorfismo, nucleolo evidente, alto índice mitótico y células multinucleadas; pueden contener extensas zonas de necrosis (Entezari y col, 2012), márgenes infiltrantes y mayor tamaño (Heer y col, 2010). Se considera TCL maligno a aquel que cumple con al menos dos de estos criterios de inclusión (Ruf y col, 2020).

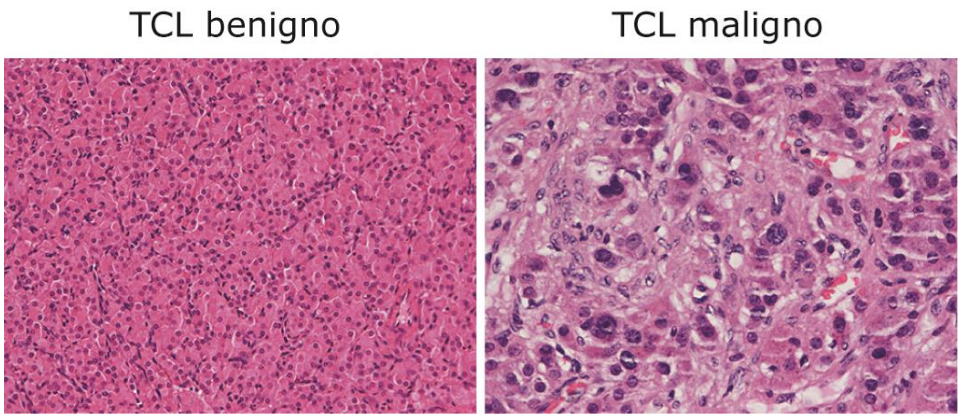


Figura 8. Aspecto general de los TCL. Comparación entre fenotipo benigno (izquierda) y fenotipo maligno (derecha). Puede observarse en el fenotipo maligno la aparición de células pleomórficas, núcleos grandes, células multinucledas y mayor invasión de la vasculatura; a diferencia del TCL benigno en donde la estructura es ordenada y las células comparten características similares: misma relación entre citoplasma y núcleo. Tomado de Heer y col, 2010.

2.4.4. Etiología

Si bien la etiología precisa de los TCL es aún desconocida, su aparición se ha relacionado con la sobreexpresión de la enzima CYP19, por consiguiente con altos niveles de E2; y la secreción constitutiva del factor de crecimiento símil insulina tipo 1 (IGF-1). Ambos factores estarían involucrados en un aumento de la proliferación celular (Sirianni y col, 2007). Además, se ha reportado muy recientemente una relación causal entre estos tumores y el uso de anabólicos esteroides (Belli y col, 2013, Salerno y col, 2018). En línea con estas evidencias, Sirianni y colaboradores han demostrado utilizando la línea de CL de rata R2C, que las altas concentraciones de andrógenos proveen el sustrato a ser metabolizado a estrógenos por parte de las CL tumorales. La aromatización de los andrógenos modificaría notablemente las concentraciones sistémicas de estradiol, que pueden iniciar o sostener el fenotipo tumoral de los TCL, tanto a través de su receptores canónicos nucleares, y la unión directa al ADN, como a través de sus receptores de membrana y la posterior transducción de la señal (Chimento y col, 2013). En el año 2000, Fowler y colaboradores demostraron que un modelo murino con sobreexpresión de CYP19 desarrolló TCL. Esto coincide con lo descripto en los años 50s, retomado en el año 1975 por Kurland y colaboradores, quienes observaron que una inyección de estrógenos promovió la malignización de las CL. Este efecto estrogénico se vería potenciado en ratones con testículos criptórquidos y estaría mediado por el metabolito activo 17β-estradiol (Huseby y col, 1980). Este año se ha reportado que el 30% de los casos con TCL presentan esteroides elevados (Ruf y col, 2020).

Se ha demostrado también que los andrógenos tendrían un efecto directo sobre la proliferación de los TCL al activar su propio receptor (Pomara y col, 2016).

Respecto a la señalización a través de LH, en el año 2011, Boot y colaboradores describieron que una mutación activante del receptor de esta

hormona dio como resultado la aparición de TCL e hiperplasias de células de Leydig. A la fecha se conocen más de 20 mutaciones inactivantes de dicho receptor (Jahan y col, 2019).

Complicando aún más el panorama, se ha relacionado la aparición de TCL con otras patologías subyacentes. Se han reportado casos de hiperplasia adrenal congénita con eventual aparición de TCL en pacientes prepuberales. Particularmente, en un caso reportado de dos hermanos con ambas patologías se observó deficiencia de la enzima 11β-hidroxilasa. Ante la falta de esta enzima se produce una superproducción de ACTH (hormona adrenocorticotropa) que conlleva un exceso en la síntesis de andrógenos. Se le atribuye a ese exceso de andrógenos la aparición de TCL (Entezari y col 2012).

A su vez, se han reportado casos de asociación con criptorquidia (Granados Loarca y col, 2005), síndrome de Klinefelter (Aguirre y col, 2006; Soria y col, 1999), y esclerosis tuberosa (Rado Velázquez y col, 2009). Se ha relacionado también el desarrollo de TCL con infección por VIH (Sánchez-Chapado y col, 1995).

2.4.5. Estrategias terapéuticas

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

Se ha reportado que un 12,5% de los TCL maligniza en pacientes adultos (Kim y col, 1985; Conkey y col, 2005), ocasionando tumores resistentes a la radio y a la quimioterapia, lo cual conlleva a que los pacientes posean una sobrevida promedio de **solamente dos años** (Shinn y col, 2010).[1] Además, se ha descripto que ambas terapias aumentan la incidencia de otros tumores a largo plazo (Hayes-Lattin y col, 2009), pudiendo aparecer hasta 35 años después que el tumor primario. También producen infertilidad parcial o total, dependiendo de la dosis utilizada (Chimento y col, 2013). Se ha publicado que la combinación de rutina de quimioterápicos, compuesta por etopósido, bleomicina y cisplatino, resulta en un menor porcentaje de recuperación de los pacientes en cuanto a los niveles de LH y la síntesis de esteroides, componentes imprescindibles para el adecuado funcionamiento del sistema reproductor, incluso en presencia de terapias hormonales de reemplazo (Bandak y col, 2018).

En la mayoría de los casos de malignización de los TCL, se procede a la resección de los nódulos linfáticos retroperitoneales, generalmente los primeros en ser afectados, pero aun así la sobrevida se mantiene muy baja (Geminiani y col, 2015). Además de los nódulos linfáticos, afectados en el 72% de los casos, los órganos comúnmente afectados en el caso de TCL malignos son los pulmones, hígado, hueso y riñón (Bokemeyer y col, 1993).

Se ha reportado que en pacientes pediátricos los síntomas asociados a la síntesis hormonal desmedida no son eficientemente revertidos, aún después de la resección quirúrgica total, debido a que el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal ya ha sido activado (Ahmed y col, 2010). Esto podría estar relacionado con que los tratamientos suelen ser menos agresivos que en pacientes adultos, dado que se prioriza impedir la morbilidad a largo plazo, particularmente la relacionada con infertilidad. A su vez, está bien establecido que los testículos prepuberales son muy

[1] Otra serie de reportes sitúan a la incidencia de TCL malignos en un 23% respecto al total de TCL (Cheville y col, 1998); e incluso se ha descripto hasta un 51% de incidencia (Farkas y col, 2000).

susceptibles a los tratamientos con quimioterapia y radioterapia debido a la constante proliferación de las células que lo componen (Chimento y col, 2013).

Respecto a los avances en el desarrollo de terapias alternativas a las conocidas, en 2005, Basciani y colaboradores evaluaron el efecto de mesilato de imatinib (un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de c-kit y PDGFR) sobre la proliferación de las líneas de CL tumorales MA-10 y LC-540. Si bien imatinib inhibió la proliferación e indujo apoptosis en ambas líneas celulares *in vitro*, los estudios *in vivo* en ratones portadores de TCL demostraron reaparición del tumor una vez suspendido el tratamiento con la droga (Basciani y col, 2005). Además, se ha reportado que el tratamiento de ratas y ratones con imatinib modifica el correcto desarrollo de células germinales, afectando el desarrollo testicular normal (Nurmio y col, 2007; Kheradmand y col 2017).

En cuanto a los factores de crecimiento citados en el apartado de "etiología", se han realizado ensayos clínicos en fase 1 y en fase 3 con diferentes anticuerpos anti IGF-1R. En el primer caso no se observaron diferencias respecto al grupo control y en el segundo caso, el compuesto tuvo que ser removido de la clínica por cuestiones de seguridad. Respecto a la síntesis de E2, los inhibidores de CYP19 o los antiestrógenos utilizados comúnmente para el tratamiento de distintos tipos de cáncer han demostrado generar resistencia en el largo plazo (Chimento y col, 2013).

Sirianni y colaboradores describieron también la sobreexpresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) en CL tumorales R2C (Sirianni y col, 2009), responsable de la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2), que en estas células conllevaría un aumento en la expresión de CYP19, incrementándose la conversión de testosterona en E2, y por ende la proliferación celular; y propusieron el uso de inhibidores de esta enzima como adyuvantes en el tratamiento de los TCL. Sin embargo, se ha sugerido que los inhibidores de COX-2 inducen apoptosis de células

germinales (Kubota y col, 2013), y se han publicado estudios que evidencian el riesgo cardiovascular que conlleva el uso de los mismos (Grau de Castro y col, 2015).

Más recientemente, Catalano y colaboradores reportaron la expresión del receptor nuclear farnesoide X (FXR) en CL tumorales R2C, y demostraron en un modelo xenográfico de TCL que el tratamiento *in vivo* con GW4064, un agonista sintético de FXR, resulta en una marcada regresión tumoral (Catalano y col, 2013). Si bien estos autores sostienen que la activación de FXR podría representar una estrategia prometedora para el tratamiento de los TCL, otros autores señalan que FXR cumple un papel en el control del proceso espermatogénico, regulando la proliferación de células germinales primordiales y las espermatogonias (Alfaro y col, 2002). No puede descartarse entonces que el efecto pro-apoptótico de GW4064 se extienda a la línea germinal.

Finalmente, se ha reportado que la activación del receptor de glucocorticoides mediada por dexametasona (DEX) inhibiría el crecimiento de TCL (Panza y col, 2016), sugiriéndolo como potencial blanco terapéutico. Sin embargo se ha demostrado que DEX posee una función deletérea sobre la proliferación de células peritubulares (Weber y col, 2009), lo cual va en detrimento de la integridad testicular.

3. Aspectos básicos relacionados con la biología tumoral.

3.1. Modulación de la proliferación celular e inhibición de apoptosis.

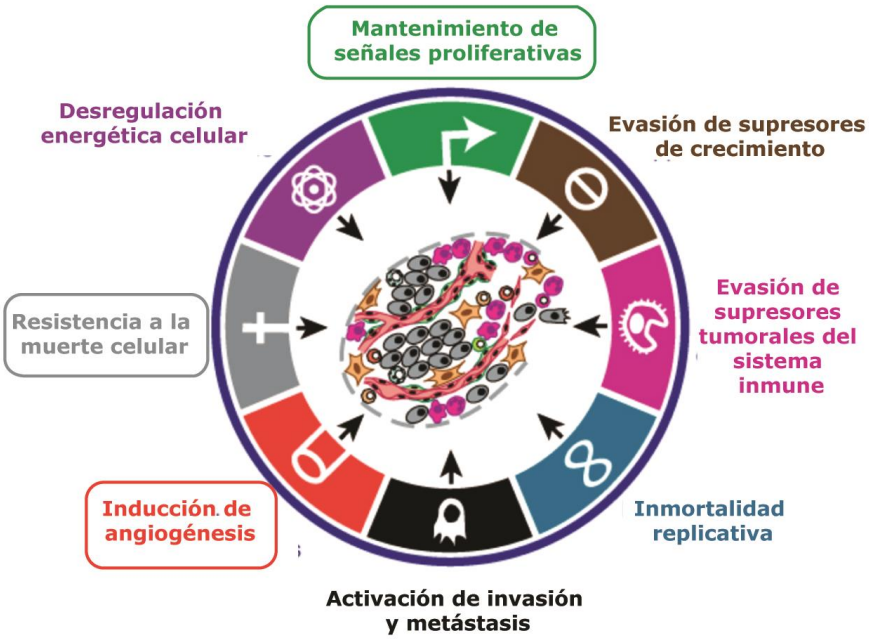
Aunque la etiología y los factores de riesgo de los distintos tipos de tumores son completamente heterogéneos, se puede establecer que todos comparten la habilidad para aumentar la proliferación descontroladamente y sostenerla en el tiempo. En condiciones normales los tejidos regulan cuidadosamente su

proliferación a través de ciclos de crecimiento y división celular (Hanahan y Weinberg, 2011). Sin embargo, las células tumorales, a través de la modificación de los mecanismos de homeostasis, regulan su propio crecimiento, particularmente modificando la expresión de receptores de factores de crecimiento y sintetizando sus ligandos (Witsch y col, 2010). Como estrategia utilizan mecanismos redundantes responsables de la tumorigénesis que se asocian con un proceso evolutivo en el cual las células mutan constantemente, perdiendo funciones supresoras, y el ambiente selecciona el fenotipo cuyas vías de señalización **retroalimenten positivamente** el crecimiento celular. Un ejemplo de este tipo de mecanismos es el aumento de la expresión IGF-1 y de su receptor de membrana (IGF1R), que poseen un rol importante durante el desarrollo tumoral (Weroha y col, 2012) dado que la activación de IGF1R inhibe la expresión de genes supresores tumorales como p27, estimulando así señales antiapoptóticas. De forma complementaria, utilizan a las células normales circundantes para proveerse de factores mitogénicos. Eventualmente dejan de necesitar tal provisión, ya que activan vías de crecimiento en forma constitutiva, de manera tal de independizarse de los ligandos (Hanahan y Weinberg, 2011. Una estrategia para detener el crecimiento tumoral es evitar que estas vías de regulación produzcan su efecto proliferativo utilizando terapias dirigidas a evitar la transducción de la señal ejercida por los factores de crecimiento. En uno de los modelos de estudio de esta tesis, las CL R2C, se encuentra constitutivamente activa la vía de síntesis de estradiol, siendo independiente de su estimulación río arriba. Lo mismo sucede con la vía de IGF-1. Ambas señales son utilizadas como factores de crecimiento autócrino por las CL tumorales.

3.2. Modulación del proceso de neo-angiogénesis tumoral.

Otro de los procesos imprescindibles durante el desarrollo tumoral es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proceso

denominado angiogénesis, destinado a la irrigación y oxigenación de tumores sólidos en crecimiento, y a proveerles un sistema de eliminación de metabolitos tóxicos (Yadav y col, 2015). Se ha demostrado que los tumores son incapaces de crecer más de 2 o 3 mm de diámetro en ausencia de vasos sanguíneos (Folkman y col, 1995), lo cual genera una situación de hipoxia. Ante este estímulo, factores de crecimiento son liberados por parte de las células tumorales a los tejidos circundantes para activar genes relacionados al proceso de angiogénesis y en respuesta liberar factores como VEGF y EGF. Estos factores modificarían las poblaciones celulares intratumorales hacia un fenotipo de células formadoras de vasos sanguíneos (Bussolino y col, 1997). Dada la importancia de este proceso, hoy en día se utilizan de forma terapéutica moléculas capaces de inhibir la formación de vasos sanguíneos, ya sea evitando la secreción de factores angiogénicos por parte de las células tumorales, o impidiendo que los factores secretados se unan a sus receptores. De este modo se inhiben los primeros pasos del proceso de angiogénesis, como ser la degradación de la membrana basal para que las células endoteliales puedan proliferar, induciendo su apoptosis (Singh y col, 1996).



(Página anterior) Figura 8. Esquema de los pilares imprescindibles para el desarrollo y la progresión tumoral. Tomado y modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

En este trabajo abordaremos el estudio de factores de crecimiento presentes en los TCL, capaces de regular procesos de proliferación celular, apoptosis y angiogénesis; tres pilares fundamentales de la biología tumoral, remarcados en la figura 8.

4. Histamina

4.1. Generalidades

2-(4-imidazolil)-etilamina, conocida comúnmente como histamina (HA), es una amina biógena con múltiples funciones en el organismo, tanto a nivel fisiológico como patológico. Si bien se ha descripto principalmente su rol como neurotransmisor y como factor involucrado en los procesos inflamatorios relacionados a alergias como urticarias y asma; es también responsable de la correcta función digestiva, vasodilatación, contracción de músculo liso, de modular finamente la respuesta inmune tanto innata como adaptativa y de modular procesos de regeneración tisular (Haas y col, 2008; Jutel y col, 2001; Leurs y col, 2005; Schubert y col, 2008). Está relacionada también con procesos de proliferación normal en glándula mamaria, útero y piel (Falus y col, 2011).

En células hematopoyéticas ejerce un efecto diferencial sobre la proliferación de precursores de granulocitos. También es responsable de la proliferación y la migración de fibroblastos en los procesos fibróticos (Falus y col, 2011). Incluso se la ha relacionado con el mantenimiento de ritmos circadianos (Mochizuki y col, 1992). Si bien hay información ambigua, se ha descripto que la HA modula también procesos de formación ósea (Matuszewaska y col, 2018) y

recientemente se la ha asociado a la patogénesis de hipersensibilidad visceral (Xu y col, 2020).

A la fecha se han descripto más de veinte procesos modulados por HA, confiriéndole de este modo un gran efecto pleiotrópico. La importancia biológica de esta amina se refleja en las numerosas publicaciones relacionadas con su estudio, y que dieron origen a la redacción incluso de libros completos al respecto (Ganellin y Parsons, 1982; Hattori y Seifert, 2017; Leurs y Timmerman, 1998; Thurmond, 2011; Khardori y col, 2010; Stark y col, 2013). Dada su potente actividad a bajas concentraciones se propone que es necesario un estricto control de sus receptores a nivel fisiológico.

Además de su rol como modulador de procesos fisiológicos, se ha reportado que la HA es capaz de regular procesos de tumorigénesis; teniendo así un rol importante en la etiopatogenia tumoral. En la sección 4.6. se aborda este aspecto.

4.2. Síntesis y degradación

Alrededor del año 1910 se describió la existencia de bacterias capaces de fabricar HA a partir de la descarboxilación del aminoácido esencial L-histidina. Para ese entonces se consideraba que la HA era una vitamina fabricada de forma exógena y por lo tanto era imprescindible ingerirla. Esta hipótesis fue refutada en el año 1937 (Holtz y Heise, 1937) al encontrar en mamíferos la expresión de histidina descarboxilasa (HDC), única enzima capaz de catalizar la conversión hacia HA. Finalmente en el año 1956, Waton y colaboradores fueron capaces de probar *in vitro* la descarboxilación que da lugar a la síntesis de HA (Figura 9).

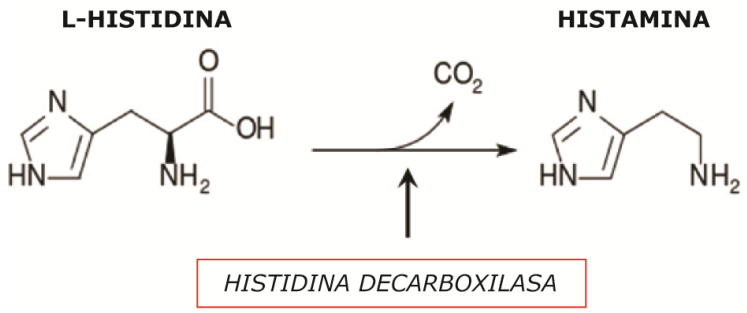


Figura 9: Síntesis de HA. HDC es la única enzima capaz de sintetizar HA, y ejerce su función a través de un único paso, la descarboxilación del aminoácido L-Histidina.

El gen de HDC codifica para una proteína de 74 kDa que luego de ser procesada post-traduccionalmente, por degradación proteolítica, da lugar a una proteína también funcional de 53-55 kDa, presente en el citoplasma. La estructura funcional de HDC consiste en un dímero compuesto por dos subunidades iguales de 53 kDa, el cual presenta alta homología entre especies. Para poder catalizar la síntesis de HA, HDC utiliza como co-enzima al piridoxal 5´-fosfato (PLP).

Dependiendo el tipo celular, la expresión de HDC puede ser constitutiva o inducible. El primer caso se observa solamente en mastocitos, basófilos y neuronas histaminérgicas (Tanaka e Ichikawa, 2010). Dentro del conjunto de órganos con HDC inducible se encuentra el sistema digestivo, en donde se ha comprobado que la gastrina promueve la expresión de HDC (Dimaline and Sandvik, 1991). A su vez, su expresión está modulada epigenéticamente, dependiendo del grado de metilación del ADN y de acetilación de histonas (Ai y col, 2006).

En el año 2010 se estableció un modelo de ratones noqueados para HDC (HDC-KO, $HDC^{-/-}$) que permitió echar luz sobre los algunos procesos modulados por HA. Se observó que estos ratones tenían problemas para la secreción de ácido gástrico y para la diferenciación del linaje hematopoyético (Ohtsu y col, 2010). En nuestro laboratorio pudimos comprobar que esta mutación da lugar a una

deficiencia en la síntesis de esteroides por parte de las CL, lo cual se traduce a nivel reproductivo en camadas menos numerosas (Mondillo y col, 2007).

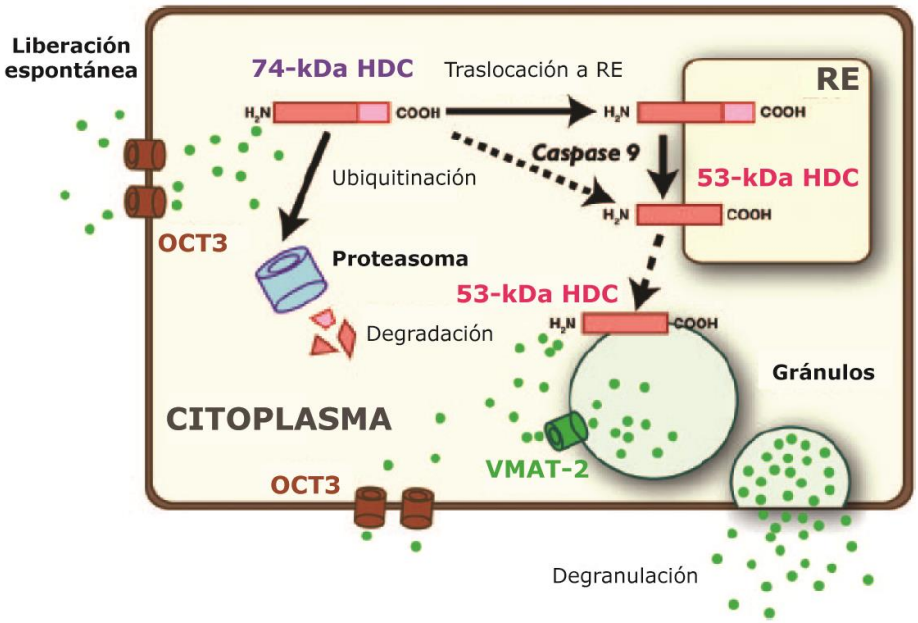


Figura 10. Regulación de la síntesis de HA a través del procesamiento post-traduccional de HDC. HDC se sintetiza con un peso molecular final de 74-kDa. Es transportada al retículo endoplasmático (RE) en donde es procesada por la enizima caspasa 9 dando como producto final su forma activa de 53-kDa. La forma sin clivar va a degradación a través del sistema de proteasoma.

Luego de su síntesis en el citoplasma, la HA puede acumularse en gránulos intracelulares o ser liberada inmediatamente. En mastocitos, basófilos, células enterocromafines y neuronas histaminérgicas, la HA es liberada de forma masiva a través de la secreción de dichos gránulos intracelulares (**Figura 10**). La HA entra en los gránulos a través del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2) y es liberada al medio extracelular tras la activación mediada por inmunoglobulinas tipo E (IgE). A su vez, las IgE son activadas por la proteína liberadora de HA (HRF, de su sigla en inglés: *Histamine releasing factor*). Se

considera a HRF una proteína citoprotectora y antiapoptótica. En estos tipos celulares, en donde existe la degranulación, predomina la forma de HDC clivada (Hattori y col, 2017; Ichikawa y col, 2010).

Por el contrario, en linfocitos, macrófagos y en células epiteliales, una vez sintetizada, la HA es inmediatamente liberada a través del transportador de cationes orgánicos (OCT), conocidos por su alta capacidad de transporte a pesar de no tener alta afinidad por la HA. En estos tipos celulares predomina la forma no clivada de HDC (Ichikawa y col, 2010).

Una vez liberada, el destino de la HA puede seguir dos vías metabólicas diferentes. En primer lugar la enzima histamina-N-metil transferasa (HNMT), proteína citosólica soluble, cuya expresión se describió en riñón, hígado, bazo, colon, próstata y ovario; cataliza la transferencia de un grupo metilo al segundo grupo amino de la HA, dando lugar a la 1-metil-HA. Este paso se considera inactivante para la HA debido a que los cuatro subtipos de receptores son notablemente menos afines por el metabolito metilado que por su precursor. A continuación la 1-metil-HA es convertida en 1-metilimidazol-4-acetaldehído por la enzima monoamino oxidasa (MAO), para finalmente ser transformado en ácido 1 – metilimidazol-4-acético. Este último paso es catalizado por la enzima dependiente de NADP aldehído deshidrogenasa. Este proceso ocurre principalmente a nivel del Sistema nervioso (Bähre y Kaever, 2017) y el metabolito final es excretado en orina.

A nivel periférico, la HA es metabolizada por deaminación oxidativa, proceso mediado por la enzima diamino oxidasa (DAO), dando como resultado la formación de imidazol-4-acetaldehído, que es rápidamente oxidado a ácido imidazol-4-acético. Este último es catalizado por la enzima, aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD. Finalmente, el último paso en la inactivación de la HA es una ribosilación, dando como resultado ácido 1-ribosilimidazol-4-acético, mediado por

la enzima imidazolacetato-fosforibosildifosfato ligasa. Este producto se excreta por orina. A diferencia de la especificidad de la HNMT, la DAO es responsable de la deaminación de diferentes sustratos, entre ellos HA. Es una glicoproteína soluble que se almacena en vesículas asociadas a la membrana plasmática de células epiteliales y es secretada a la circulación en respuesta a un estímulo. Se expresa principalmente en hígado y riñón.

4.3. Receptores a HA

La HA ejerce su función a través de cuatro subtipos de receptores específicos. Todos ellos son proteínas de siete pasos de membrana y están asociados a una proteína G (GPCR). Este tipo de receptores comparten las mismas características: poseen un dominio extracelular N terminal, un dominio intracelular C terminal, y pasos de membrana tipo hélices interconectados por "bucles" intra y extracelulares. Al igual que todos los receptores de aminas, los cuatro subtipos poseen el residuo ácido aspártico en el dominio tres transmembrana, que se relaciona directamente con la unión a la cadena lateral de la HA. La concentración de HA necesaria para activar cada subtipo de receptor es diferente, lo cual le confiere la gran variedad de funciones descriptas en párrafos previos. El rol que tendrá la HA sobre los diferentes tipos celulares dependerá entonces de la expresión relativa que la célula posea de cada uno y de la afinidad de la HA por ellos en cada contexto en particular. La HA posee mayor afinidad por los receptores tipo 3 y tipo 4.

En nuestro laboratorio hemos descripto que la HA modula positivamente la expresión de al menos 3 de sus 4 receptores en células de Leydig tumorales (datos no publicados), siendo predominante el aumento de los subtipos 1 y 2.

4.3.1. Receptor a HA tipo 1 (H1R)

Descubierto en el año 1910, el receptor H1R se caracteriza por estar asociado a una proteína G del tipo $G_{q/11}$, $G_{i/o}$ en algunos sistemas, y a la familia de proteínas G pequeñas de forma indirecta río abajo de su activación (Panula y col, 2015). El primer caso es el que predomina, dando como resultado la activación por fosforilación de la fosfolipasa C, quien luego catalizará la formación de fosfatidil-4,5,-bifosfato a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), dando como resultado la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Simons y Simons, 2011) y la entrada de Ca^{2+}. Se expresa en múltiples tipos celulares, entre ellos: hepatocitos, células endoteliales, condrocitos, neuronas, células dendríticas, neutrófilos, glándula adrenal y células del sistema reproductor masculino (Mondillo y col, 2018).

En el cerebro de mamíferos, glándula adrenal y células CHO, la activación del H1R estimula además a la adenilato ciclasa (AC), aumentando los niveles de AMPc intracelulares (Marley y col, 1991); segundo mensajero asociado predominantemente al receptor a HA subtipo H2R, como veremos en la siguiente sección.

Mediante la técnica de inmunoprecipitación y ensayos de mutagénesis, se ha observado que los H1R pueden tener una conformación de monómeros o de oligómeros, predominantemente dímeros (Bakker y col, 2004).

Se ha reportado también que posee una regulación cruzada con agonistas para el receptor de glucorticoides (Zappia y col, 2015).

4.3.2. Receptor a HA tipo 2 (H2R)

El receptor H2R fue descubierto en los 1970s siendo descripto como modulador de la contracción muscular y de la secreción de ácido gástrico (Powell and Brody, 1976). Se expresa en cerebro y estómago predominantemente; y en

menor proporción en músculo liso, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B (Jutel y col, 2001 y 2009), glándula adrenal y testículo (Pagotto y col, 2014; Mondillo y col, 2005; Mondillo y col, 2018). Posee una alta homología con el H1R, pero en este caso está asociado a una proteína Gs, por lo tanto estimula a la AC, aumentando así la síntesis de AMPc como segundo mensajero (Panula y col, 2015).

Al igual que los H1R, en algunos tipos celulares, los H2R están asociados también a proteínas $G_{q/11}$, dando como resultado un aumento en los IP_3 y en los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Estas evidencias dan cuenta de una posible activación cruzada de las vías de transducción de señales, que veremos más adelante puede ser producto de la heterodimerización entre receptores. Para detener la señal activante, se ha demostrado la desensibilización del receptor por internalización, a través de clatrina, dinamina y β-arrestina (Fernández y col, 2008).

Ratones deficientes en H2R tienen trastornos cognitivos, anormalidades en la respuesta a estímulos nocivos, y problemas en la función gástrica e inmune (Panula y col, 2015).

4.3.3. Receptor a HA tipo 3 (H3R)

Al tercer subtipo de receptor a HA se lo describió por primera vez asociado a neuronas en los años 80s (Arrang y col, 1983) y en la actualidad se comprobó que predominantemente se expresa en sistema nervioso central, en intestino y en células pancreáticas α y β. Posee muy baja homología con los receptores H1R y H2R. Se encuentra sumamente conservado entre especies, alcanzando un 92% de identidad de secuencia. A su vez posee isoformas producto de *splicing* alternativo. Algunas de ellas poseen igual o mayor actividad que el receptor de membrana, aun siendo solubles, y se las relaciona a actividad constitutiva y caminos de

señalización diferentes a los canónicos, actuando frecuentemente como dominantes negativos.

H3R se halla asociado a una proteína $G_{i/o}$, cuya activación resulta en una disminución de los niveles de AMPc y una activación de las vías de transducción de las MAPK (de su sigla en inglés: "*mitogen-activated protein kinase*").

Este receptor puede homo o heterodimerizar con otros receptores de siete pasos de membrana, particularmente con el receptor D1 a dopamina (Ferrada y col, 2008 y 2009).

4.3.4. Receptor a HA tipo 4 (H4R)

Es el miembro más reciente del grupo de receptores a HA, descripto por primera vez en el año 2000 (Nakamura et al., 2000). Se expresa predominantemente en células del linaje hematopoyético: basófilos, mastocitos, eosinófilos y células dendríticas. También ha sido descripto en pulmón, intestino delgado, corazón, hígado, cerebro, epidermis (Panula y col, 2015). En nuestro laboratorio hemos reportado la expresión de este receptor en testículo, tanto normal como neoplásico (Abiuso y col, 2018). En casi la totalidad de las publicaciones referidas a su función se lo considera un mediador de la quimiotaxis y liberación de citoquinas. Recientemente se lo ha relacionado con la modulación de arresto celular y la inhibición de la proliferación celular en múltiples modelos tumorales (Massari y col, 2018).

Posee características compartidas con el receptor H3R en cuanto a secuencia génica, estructura secundaria proteica, *splicing* alternativo responsable de múltiples isoformas, y el hecho de que puede dimerizar u oligomerizar. En este caso las isoformas que posee no unen a HA o a agonistas específicos, sino que han demostrado regular negativamente la actividad canónica del receptor,

particularmente la forma soluble (Panula y col, 2015). A su vez se ha reportado que este receptor puede ser glicosilado.

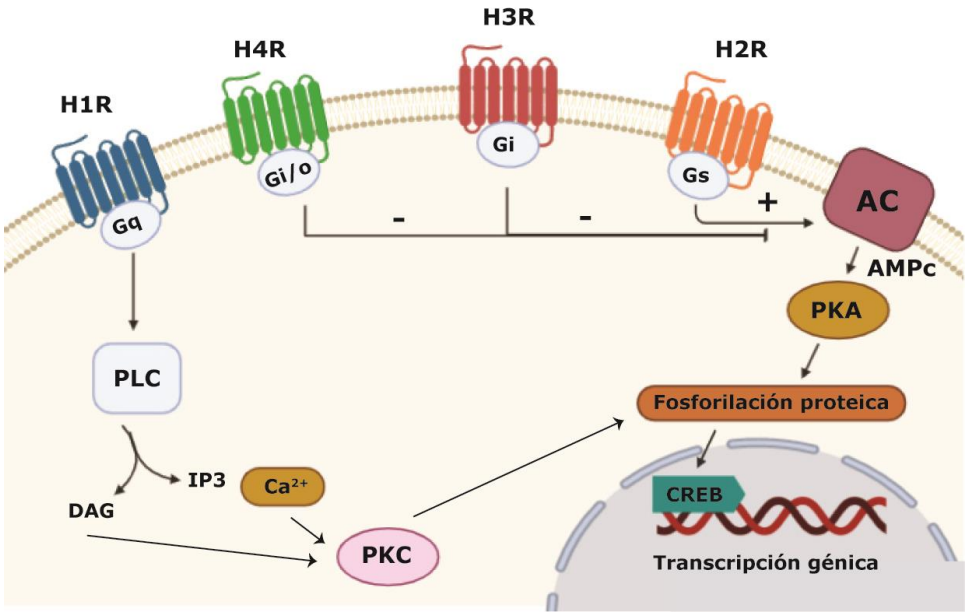


Figura 11. Esquema representativo de los cuatro subtipos de receptores a HA, H1R-H4R y las vías de transducción más frecuentemente asociadas a cada uno. H1R-H4R: Receptores a HA 1-4. AC: Adenilato ciclasa. PLC: fosfolipasa C; PKC, PKA: fosfolipasas C y A, respectivamente. CREB: proteína de unión al ADN dependiente de AMPc.

4.4. Internalización de receptores

Como ya mencionamos, la HA ejerce sus efectos a través de sus receptores específicos, proceso que es detenido por la desensibilización por internalización de dichos receptores para evitar una sobreestimulación. Se ha reportado que H1R y H2R operarían de forma coordinada y tendrían un rol modulatorio cruzado para determinar el tipo de señal a transducir. Es decir que, si bien comúnmente se asocian a la activación de proteínas Gq, estimulando la producción de inositoles fosfato; y Gs, aumentando la producción de AMPc, respectivamente ; se ha reportado que su activación con agonistas específicos puede detonar la transducción de otras vías de señalización (Davio y col, 1995;). En dicho trabajo se

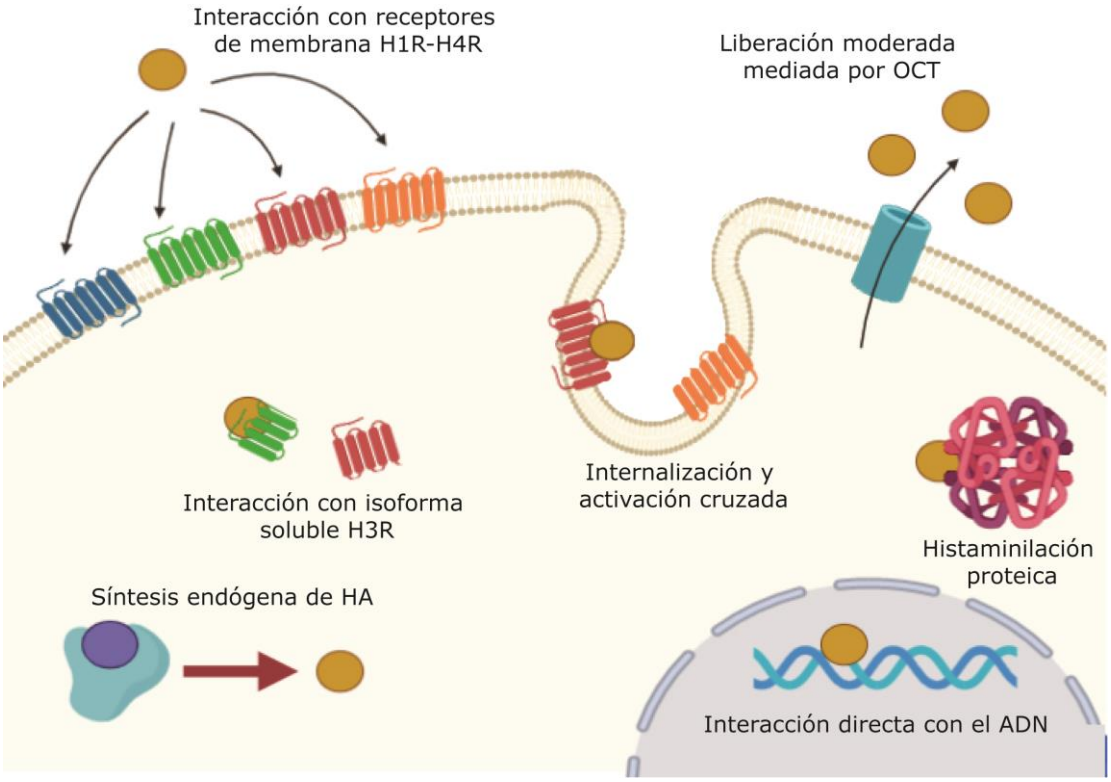
observó que la activación del receptor a HA, H1R, produjo un aumento de los niveles de AMPc, así como la activación del receptor H2R produjo un aumento en los niveles de inositoles fosfato. A su vez, mediante la técnica de FRET, Alonso y colaboradores han descripto la co-localización, heterodimerización y co-internalización de ambos receptores ante su estimulación (Alonso y col, 2013). Este mecanismo da cuenta de la importancia del estudio del sistema histaminérgico como un todo, no siendo suficiente el estudio individual de uno de sus receptores. Por otro lado refuerzan la importancia de la inhibición de la síntesis de HA como potencial estrategia terapéutica a fin de independizarse de la composición de receptores presentes en la célula blanco.

4.5. Histaminilación

El proceso de histaminilación es una modificación post-traduccional de las proteínas que consiste en la unión covalente de HA a residuos glutamina. El proceso es catalizado por la enzima transglutaminasa 2 (TGM-2) en presencia de Ca^{2+} como co-factor y de altas concentraciones de HA citoplasmática o vesicular. A la fecha se ha descripto que este proceso ocurre solamente en mastocitos y que algunas de las proteínas modificadas de este modo serían Gαo, Gαq y Cdc42; involucradas en el transporte de HA. Otro de los blancos de esta modificación es VMAT-2, que tal cual mencionamos anteriormente, es responsable del ingreso de HA hacia los gránulos de secreción. Esta modificación confiere activación constitutiva y da cuenta de un proceso de autorregulación (Vowinckel y col, 2012).

Otra de las aminas que se ha descripto que se une covalentemente a proteínas por acción de la transglutaminasa es la serotonina. Esta modificación estaría involucrada en funciones fisiológicas como la activación plaquetaria, la liberación de insulina, la contracción de músculo liso y la regulación de la localización de los transportadores de serotonina. Esto último refuerza la idea de

que el mecanismo de monoaminilación de proteínas posea fines autorregulatorios (Muma y col, 2015).[2]



Página anterior. Figura 12. Funciones de la HA. En el esquema se resumen las funciones conocidas de la HA a nivel intracelular, tanto como su salida al espacio extracelular.

4.6. Histamina en la progresión tumoral

La asociación entre la HA y tumores malignos fue propuesta por primera vez en el año 1968 por Khalson y Rosegreen, para luego ser corroborada en los 80´s. Utilizado un inhibidor irreversible de su síntesis en un modelo de tumor hepático desarrollado en rata, y carcinoma pulmonar en ratón, se observó una disminución del crecimiento de las células tumorales. Se ha descripto también que múltiples

[2] Algunos autores han reportado la interacción de la HA con el ADN nuclear o su localización en la fracción subcelular correspondiente al núcleo (Young y col, 1971; Ruiz-Chica y col, 2006). Si bien esa interacción directa podría no ser funcional, esto no ha sido corroborado en la actualidad. A su vez existen trabajos que reportan alta afinidad de la HA por la estructura del ADN (Cernigoj y col, 2013; Cruz y col, 2014).

tumores poseen sobreexpresión de HDC y altos niveles de histamina endógena. A su vez, tejidos normales con alta tasa de proliferación expresan altos niveles de esta enzima, por ejemplo tejidos fetales y células responsables del cierre de heridas (Bartholeyns & Bouclier, 1984).

De todos los procesos relacionados con el crecimiento tumoral, se ha reportado que la HA puede modular proliferación celular, migración, diferenciación, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune (Rivera y col, 2000; Ghosh y col, 2002, Medina & Rivera, 2010). El patrón de expresión de los receptores a HA que median estos procesos se ha visto modificado en tejidos neoplásicos en comparación con tejidos normales (Coruzzi y col, 2012).

A su vez, la HA ha sido relacionada con el síndrome carcinoide. Este tipo de síndrome se denomina paraneoplásico debido que aparece como consecuencia secundaria a la presencia de un tumor. Generalmente está asociado a la liberación de monoaminas por parte de los tumores. De forma complementaria a los síntomas ocasionados por la patología de origen, el paciente experimenta diarrea, hipotensión, taquicardia, vasoconstricción, broncoconstricción, disnea, fibrosis retroperitoneal e incluso falla cardíaca. Se considera que el 19% de la población con cáncer experimenta síndrome carcinoide, y los tratamientos utilizados a la fecha presentan síntomas refractarios demostrando una eficiencia parcial (Celis Ferrari y col, 2018).

4.7. Inhibidores de la síntesis de HA

4.7.1. Galato de epigalocatequina

Conocido comúnmente como EGCG, la epigalocatequina 3-galato es un éster conformado por la unión de ácido gálico y epigalocatequina. Es el componente mayoritario del té verde, *Camellia sinensis,* y se le han atribuido múltiples funciones beneficiosas relacionadas con su consumo habitual debido a su alta

actividad biológica. A la fecha existen 106 ensayos clínicos en curso o terminados con este compuesto como tratamiento específico para diversas patologías (Fuente: *clinicaltrials.gov*). A su vez, se ha observado un constante aumento en el número de publicaciones relacionadas con este compuesto (**Figura 13**). En lo que a cáncer se refiere, se ha descripto que el EGCG es efectivo tanto *in vitro* como *in vivo* para inhibir moléculas relacionadas a la progresión tumoral y procesos relacionados con la misma, como inducción de arresto celular, apoptosis y angiogénesis; a la vez que inhibe procesos de migración y metástasis (Rady y col, 2018).

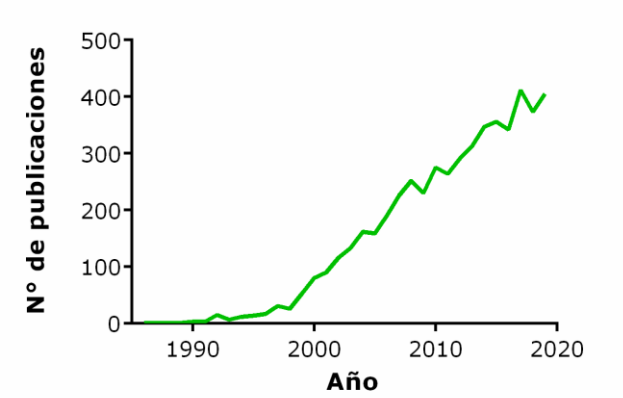


Figura 13. Gráfico representativo del aumento en el número de publicaciones relacionadas con EGCG. Durante el último año se publicaron al menos 405 trabajos en donde se utiliza a este compuesto. Fuente: PubMed: "EGCG".

Se ha descripto que el EGCG es capaz de inhibir la actividad de HDC tanto *in vitro* como *in vivo* (Rodríguez-Caso y col, 2003ª, Nitta y col, 2007), sin cambiar sus niveles de expresión proteica. Se considera que la inhibición de su actividad está relacionada con la interacción entre el EGCG y el cofactor de HDC, PLP, evitando su unión al sitio catalítico. Si bien no comparten estructuras similares con su sustrato clásico (**Figura 14, A; Figura 9**), el EGCG se uniría al sitio activo de HDC produciéndole un cambio conformacional. Esto coincide con lo reportado para el inhibidor "suicida" específico para HDC, α-fluorometilhistidina. Pequeñas modificaciones en su sitio activo le conferirían a HDC menos estabilidad y una

conformación inactiva (Rodríguez-Caso y col, 2003b). Se ha reportado que esta unión podría ser de tipo covalente, al igual que la de α-fluorometilhistidina, dando como resultado una modificación estructural de HDC (Bhatacharjee y col, 1990), o a través de puentes de hidrógeno. Según análisis computacionales, la interacción entre HDC y EGCG ocurriría rápidamente, e impediría la unión a sus ligandos – L-histidina y α-fluorometilhistidina – al como consecuencia de la oclusión y disminución de tamaño del bolsillo catalítico (Rodríguez-Caso y col, 2003b).

Se ha reportado muy recientemente que el EGCG ejerce un efecto protector frente a la apoptosis inducida por radiación ionizante en células germinales murinas normales *in vivo*, a la vez que inhibe la esteroidogénesis en CL, características que resaltan su potencial en caso de ser utilizado para el tratamiento de neoplasias (Ding y col, 2005).

4.7.2. α-metil-DL-histidina (α-MHD)

Este inhibidor de origen sintético se une al sitio catalítico de HDC de forma competitiva con su ligando endógeno, L-histidina; evitando la síntesis de HA. Ambos sustratos poseen una estructura muy similar, diferenciándose solamente en la adición de un grupo metilo en el segundo carbono de la cadena lateral (**Figura 14, B; Figura 9**). Se propone que su unión podría ser del tipo covalente al igual que su predecesor, α-fluorometilhistidina. Diversas publicaciones reportan su efecto negativo sobre la proliferación de colangiocarcinoma inhibiendo el eje HDC - síntesis de HA – expresión de VEGF (Francis y col, 2012; Graf y col, 2014, Johnson y col, 2016); así como su uso de rutina en experimentos *in vitro* e *in vivo* para inhibir eficazmente la síntesis de HA (Gasheva y col, 2019; Nizamutdinova y col, 2017).

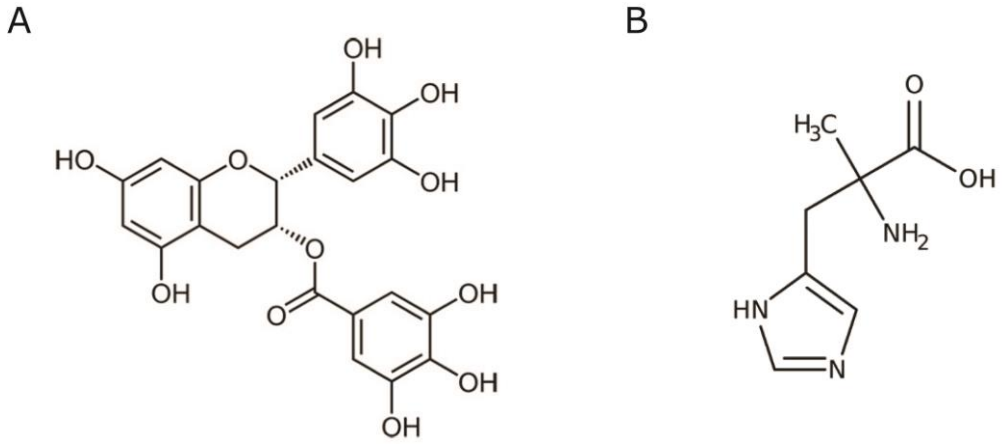


Figura 14. Estructura química de inhibidores de HDC. **A**. EGCG. **B**. α-MHD.

5. Antecedentes del laboratorio que dan origen a la hipótesis de trabajo.

5.1. Experimentos *in vitro* en CL tumorales en comparación con CL normales.

En nuestro laboratorio describimos por primera vez la expresión de receptores histaminérgicos de membrana en CL normales y tumorales murinas (Mondillo y col, 2005; Mondillo y col, 2009; Abiuso y col, 2014), confirmándose posteriormente estos hallazgos en CL humanas y de otras especies por nuestro grupo y otros (Albrecht y col, 2005; Mondillo y col, 2014; Khan y col, 2007). También demostramos que la HA es capaz de modular la esteroidogénesis aguda en dichas células, de una forma bifásica y dependiente de la concentración (Mondillo y col, 2005). Experimentos adicionales en ratones noqueados (KO) para el gen de HDC que realizamos en colaboración con el grupo del Dr. Falus (Departamento de Genética, Biología Celular e Inmunobiología, Universidad Semmelweis de Medicina, Budapest, Hungría) permitieron corroborar estos resultados, evidenciando además una importante disminución de la capacidad esteroidogénica en las CL de ratones HDC-KO en comparación con las CL de ratones de genotipo salvaje (Mondillo y col, 2007). Más aún, los ratones HDC-KO

presentaron testículos de tamaño significativamente menor a los de ratones de genotipo salvaje tanto en edad adulta como prepuberal, y severas alternaciones en la morfología de las CL desde los 7 días de edad, cuando los testículos no

Más recientemente, estudiamos el contenido de HA por inmunohistoquímica y la expresión de HDC por Western blot en testículos de ratas de distintas edades, encontrando en ambos casos una disminución conforme aumenta la edad (**Figura 15**), concomitantemente con un incremento en los niveles séricos de testosterona (Datos no mostrados). En concordancia con lo observado en ratones HDC-KO, tanto el contenido testicular de HA como la expresión de HDC fueron significativamente mayores a los 7 días de edad, sugiriendo que la HA cumpliría un papel importante en etapas muy tempranas del desarrollo testicular, mientras que en etapas posteriores su síntesis se hallaría negativamente regulada; demostrando así la existencia de un sistema histaminérgico funcional en el testículo.

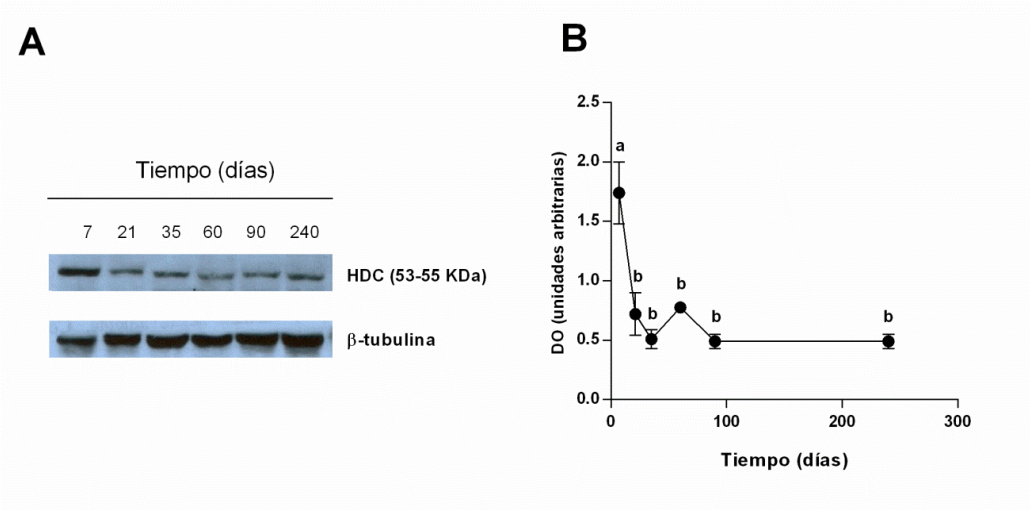


Figura 15. Expresión de HDC durante la ontogenia testicular en rata. A. Western blot utilizando anticuerpo específico anti HDC en comparación con β-Tubulina como control de carga, para lisados testiculares desde la edad de 7 días hasta la edad de 240 días. **B**. Cuantificación de las bandas de la figura A utilizando el programa Image J. Cada punto representa la media ±EE y diferentes letras representan diferencias significativas con un p valor menor a 0,05. DO: densidad óptica.

Posteriormente, reportamos que la HA estimula la proliferación de las CL tumorales de ratón MA-10, pero no tiene efecto proliferativo en CL normales (Pagotto y col, 2012). Este efecto estaría mediado por el receptor H2R. Asimismo, reportamos la sobreexpresión de HDC en las CL tumorales MA-10, en contraposición con los bajos niveles de expresión de la enzima que presentan las CL normales o incluso el testículo total (**Figura 16**). Cabe aclarar que, dada la muy baja tasa de proliferación de las CL normales adultas, para estos experimentos se emplearon cultivos de CL normales inmaduras, aisladas y purificadas a partir de testículos de ratas de 35 días de edad, las cuales fueron capaces de responder al estímulo mitogénico de hCG e IGF-1, pero no a HA. Se obtuvieron resultados similares empleando CL normales progenitoras, obtenidas a partir de testículos de ratas de 21 días de edad.

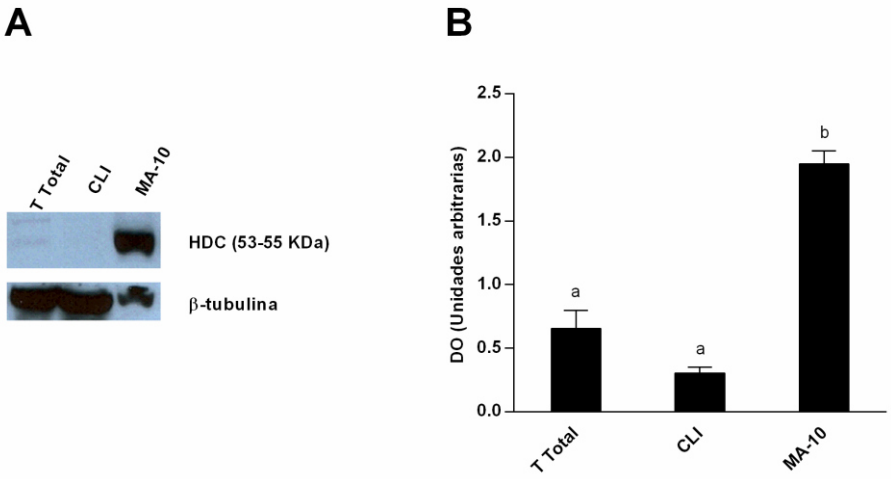


Figura 16. Expresión de HDC en testículo total de rata de 35 días de edad, CL inmaduras y CL MA-10. A. Western blot utilizando anticuerpo específico anti-HDC en comparación con B-Tubulina como control de carga. **B.** Cuantificación de las bandas de la figura A utilizando el programa Image J. DO: densidad óptica. Cada banda representa la media ± EE, diferentes letras indican diferencias significativas con p menor a 0,05.

Sumado a los resultados descriptos hasta aquí, hemos reportado que el EGCG es capaz de inhibir la proliferación de las CL tumorales MA-10 (Pagotto y col, 2012).

Dado que las CL tumorales MA-10 no sintetizan testosterona ni estradiol como esteroides mayoritarios (**Figura 17**), pues presentan una deficiencia en la actividad de la enzima P-450-17α-hidroxilasa/17-20-liasa (Ascoli y col, 1981), por lo que el principal esteroide producido es progesterona en lugar de testosterona, en este trabajo extendimos nuestros experimentos a la línea de CL tumorales R2C. Como mencionamos previamente, se trata de una línea desarrollada a partir de un tumor de CL de rata, en la cual la enzima PKA está constitutivamente activa, por lo que no necesita la estimulación de LH/hCG para producir esteroides (Sirianni y col, 2007). Además, presenta sobreexpresión de CYP19, lo cual conlleva un aumento en la síntesis y liberación de E2, que a su vez tiene un efecto estimulatorio sobre la proliferación celular. Este fenotipo sería muy similar al observado en un modelo de TCL *in vivo*, y también permitiría explicar la ginecomastia que presentan los pacientes con TCL.

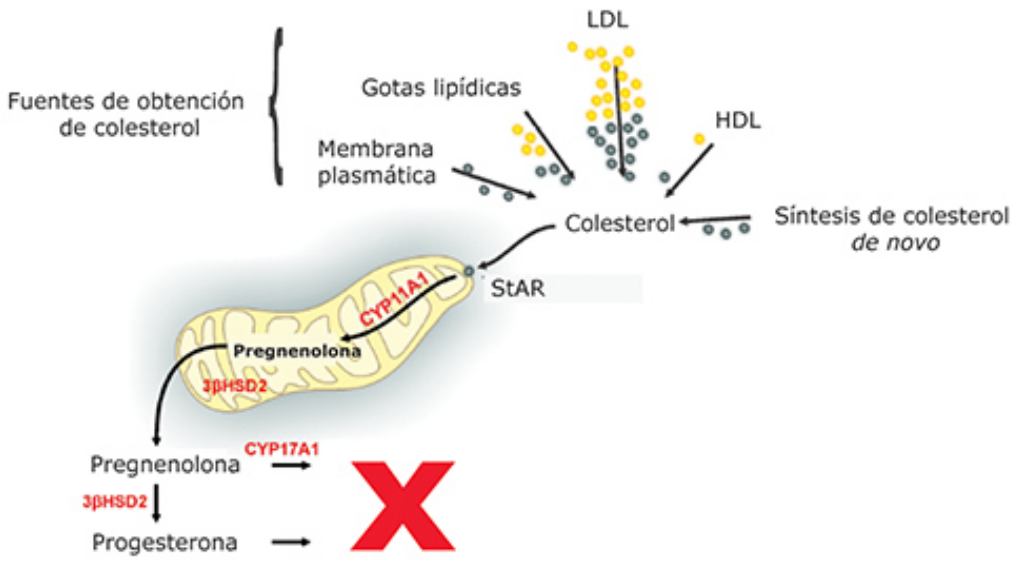


Figura 17. Esteroidogénesis testicular en CL MA-10. Esquema representativo de los pasos necesarios para la síntesis de progesterona en CL MA-10. LDL: lipoproteínas de baja

densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad. En rojo se especifican las enzimas necesarias para la catálisis de cada hormona esteroidea.

5.2. Caracterización del perfil de expresión proteico en pacientes pediátricos con TCL.

De forma complementaria se caracterizó el perfil de expresión proteico en cortes de TCL testicular pertenecientes a tres pacientes pediátricos (**Figura 18**). Por un lado, pudimos observar que estos tumores se caracterizan por una sobreexpresión de CYP19, y de los dos subtipos de receptores de estradiol, ER-α y ER-β. Podemos inferir entonces que estos tumores podrían utilizar al estradiol sintetizado como factor de crecimiento. Por el contrario, no se observó expresión del receptor de andrógenos (AR). En concordancia con lo descripto anteriormente, pudimos observar una alta expresión del receptor de IGF-1, lo cual coincide con la noción de la utilización de IGF-1 por este tipo de tumores. Se verificó que fuesen Leydigiomas mediante la marcación específica con la enzima P450scc, responsable del inicio de la síntesis de esteroides.

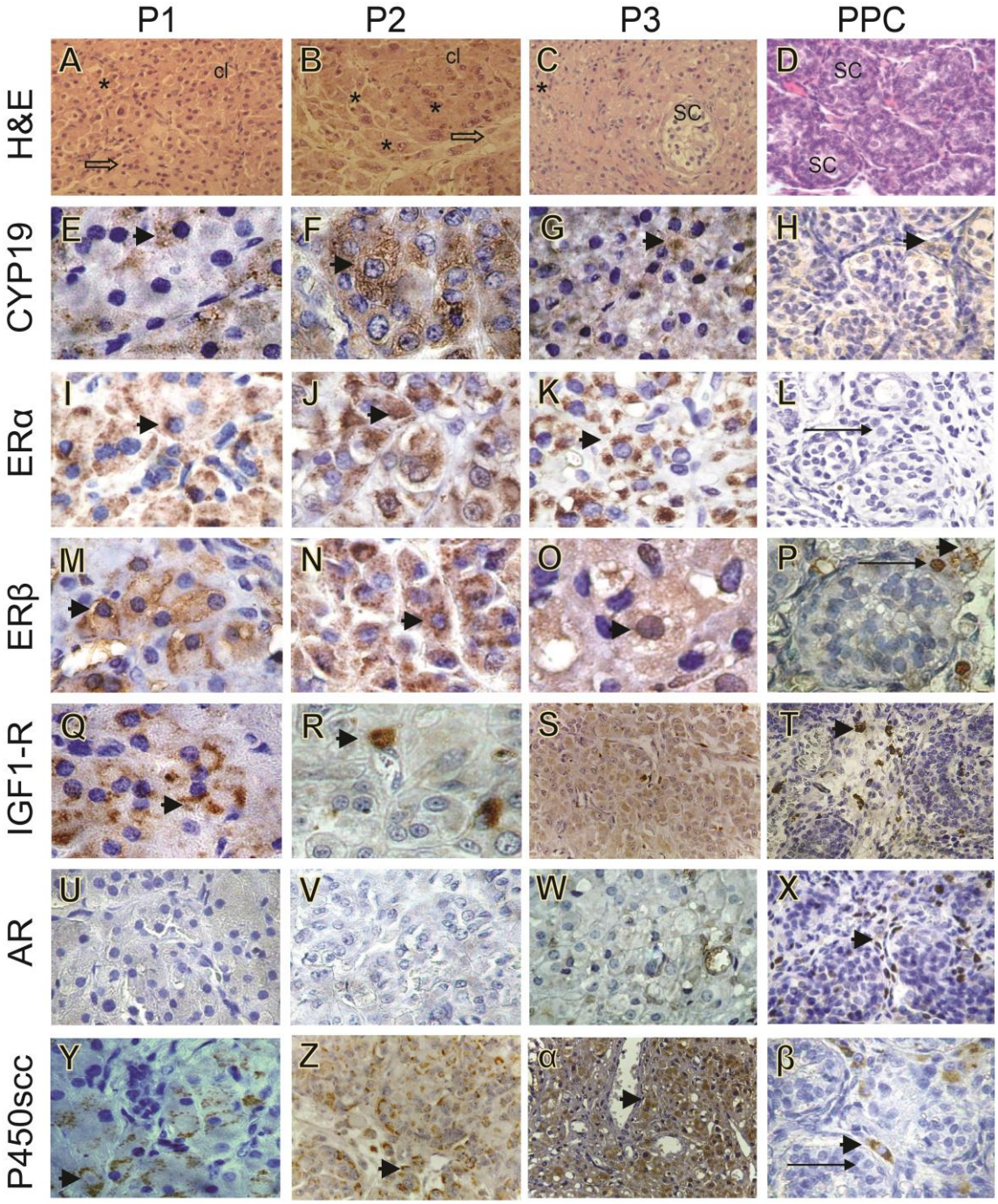
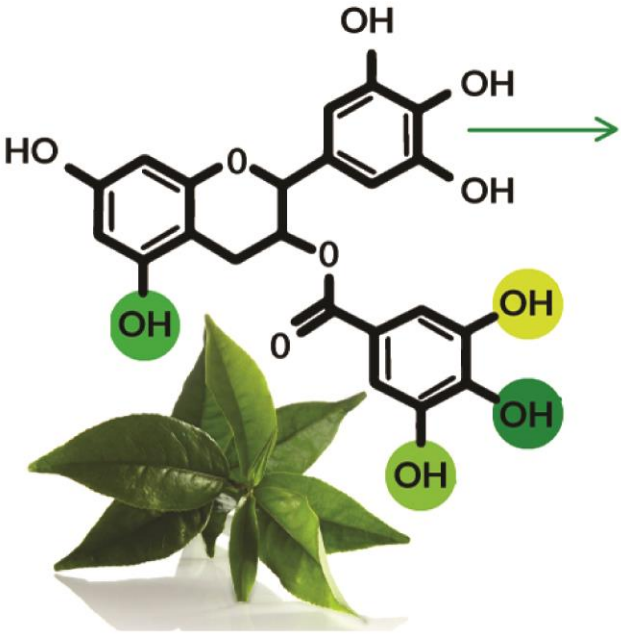


Figura 17. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de ERα, ERβ, CYP19, IGF-1R, AR, P450scc y HRH4, en testículos pre-puberales humanos normales *vs.* TCL. Secciones fijadas en formol e incluidas en parafina de 7 µm de espesor de paciente normal (PPC) y pacientes con TCL (P1, P2 y P3) fueron sometidas a IHQ para revelar proteínas específicas y visualizadas usando DAB. Las secciones fueron contracoloreadas con hematoxilina. Suero normal fue utilizado como control negativo para cada anticuerpo en lugar de anticuerpo primario. No se vio reactividad en esas secciones. **A-D**. Hematoxilina y eosina para aspecto general. **Paneles E, F, G y H.** Alta expresión de CYP19 en TCL y en control normal. **Paneles I, J y K.** Expresión positiva en citoplasma de ER-α en todos los

TCL. **Panel L**. No se observó expresión del receptor ER-α en el paciente control. **Paneles M, N, O y P.** Expresión positiva de ER b en pacientes con TCL y en paciente control. **Paneles Q, R, S y T.** Expresión positiva de IGF-1 en los tres tumores de CL y en el control. **Paneles U, V y W.** No se observó expresión positiva de AR (receptor de andrógenos) en los TCL. **Panel X**. Expresión positiva de AR en células del intersticio testicular y en peritubulares, pero no en CL en paciente control. **Paneles Y, Z, α y β.** Expresión positiva de P450scc en los tres pacientes con TCL y en el paciente control. Las cabezas de flecha indican células positivas y las flechas largas indican células negativas. Fotografías C, D, L, H, S, T, W, Z y α fueron obtenidas a una magnificación de 40 x; fotografías A y B a 64 x; G, P, U, V, X y β, a 100 x y E, F, I, J, K, M, N, O, Q, e Y, a 160 x, en microscopio Carl Zeiss Axiovision.



Hipótesis y objetivos

Construcción de la hipótesis

El presente trabajo de tesis se apoya principalmente en los estudios previos de nuestro laboratorio descriptos en la introducción, y en bibliografía relacionada, de otros grupos de investigación. Teniendo en cuenta dichos estudios, se construyó la hipótesis de trabajo sobre la base de los siguientes hallazgos puntuales:

1) Se ha reportado aumento en el contenido endógeno de HA y sobreexpresión de HDC en numerosas neoplasias humanas y tumores experimentales inducidos en roedores, para los que se ha descripto que la HA actuaría como factor de crecimiento, modulando también la neoangiogénesis y la respuesta inmune antitumoral.

2) Nuestro laboratorio ha demostrado que la HA estimula la proliferación de CL tumorales murinas a través de receptores histaminérgicos de membrana, pero no tiene efecto proliferativo en CL normales. Además, hemos observado sobreexpresión de HDC en CL tumorales, en contraposición con los bajos niveles de la enzima que presentan las CL normales

3) En nuestro laboratorio hemos demostrado que el EGCG, un compuesto natural derivado del té verde con potente actividad como inhibidor de HDC, disminuye significativamente la proliferación de las CL tumorales. Sumado a ello, se ha reportado muy recientemente que este polifenol ejerce un efecto protector frente a la apoptosis inducida por radiación ionizante en células germinales murinas normales *in vivo*, a la vez que inhibe la esteroidogénesis en CL.

HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo propone que la histamina actúa como factor de crecimiento autócrino en las células de Leydig tumorales, y por lo tanto la inhibición de su síntesis modulará negativamente a uno o más de los mecanismos responsables del desarrollo tumoral, disminuyendo el crecimiento del tumor y los síntomas asociados al mismo.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio del rol de la histamina como factor de crecimiento autócrino en células de Leydig tumorales, evaluando su capacidad de modular la proliferación celular y la angiogénesis**;** y también el bloqueo de su síntesis como potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de los tumores de células de Leydig.

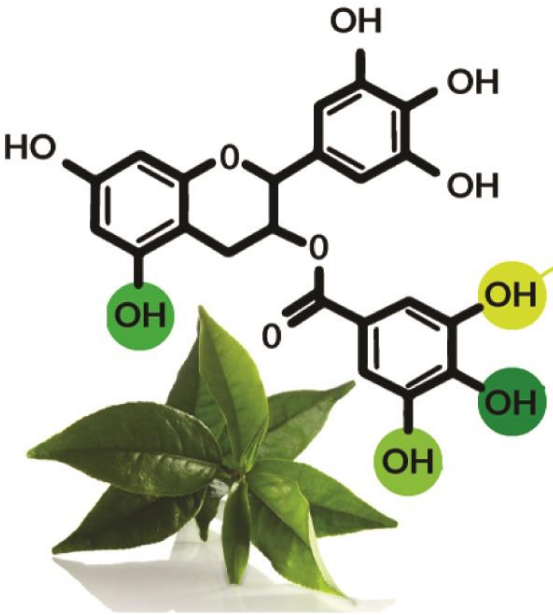
Objetivos Específicos

- Profundizar los estudios acerca de la estimulación de la proliferación celular por HA en las CL tumorales *in vitro* y estudiar en estas células la expresión de la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC), única enzima productora de HA en mamíferos.

- Evaluar la relevancia clínica del estudio de HDC como blanco terapéutico en los TCL investigando la expresión de dicha enzima en testículos de pacientes pediátricos con TCL, en comparación con testículos sanos pertenecientes a niños de la misma edad.

- Estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de HA, utilizando inhibidores de HDC, sobre la proliferación de las CL tumorales, la síntesis de esteroides y la producción de factores angiogénicos *in vitro*.

- Investigar el efecto del tratamiento con inhibidores de HDC, sobre el crecimiento de los tumores de CL, la síntesis de esteroides y la producción de factores angiogénicos *in vivo.*



Metodología

1. Material clínico

Las muestras de pacientes pediátricos fueron provistas por las Dras. Alicia Belgorosky y Esperanza Berensztein, del Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan". Se trabajó con material de pacientes pertenecientes a los distintos estadios del desarrollo gonadal (Ver Tabla M1), fallecidos a raíz de patologías no endócrinas o metabólicas, para utilizar como controles; y con biopsias de tumores de CL, de Sertoli, de células germinales e hiperplasias de CL. Se obtuvo el consentimiento informado firmado por los padres de los pacientes antes de las cirugías o de las necropsias. El diseño del estudio, los protocolos para la recolección de información y el consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan". El empleo de muestras humanas se adecuó a lo establecido en la declaración de Helsinki.

Tabla M1. Clasificación según estadios de desarrollo gonadal.

Grupo	Nomenclatura	Edad	Características testiculares
Fetal	G0	Intrauterino	Células de Leydig Fetales y túbulos seminíferos inmaduros
Neonatal	G1	< 1 mes	Células de Leydig Fetales y túbulos seminíferos inmaduros
Infantil	G2	1 a 12 meses	Activación post-natal de células de Leydig Inmaduras. Túbulos seminíferos en formación
Juvenil	G3	1 a 12 años	Ausencia de células de Leydig maduras y túbulos seminíferos en formación.
Puberal	G4	12 a 14 años	Células de Leydig y túbulos seminíferos maduros. Espermatocitos en meiosis

2. Modelos experimentales

2.1. Células de Leydig MA-10.

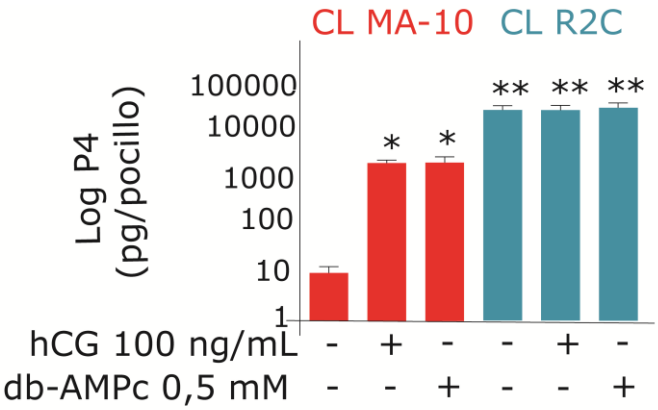
Las células Leydig tumorales de ratón MA-10, desarrolladas por el Dr. Mario Áscoli en 1981 (Departamento de Farmacología, Universidad de Iowa, Ciudad de Iowa, IA, EEUU) y gentilmente donadas a nuestro laboratorio, fueron mantenidas en cultivo en frascos T75 en medio de cultivo DMEM/Ham F-12 (DMEM/F12, Gibco, Thermo Fischer Scientific) con la adición de HEPES 4,76 g/L, bicarbonato de sodio 1,2 g/L, gentamicina 1 mL/L y 15% de suero de caballo (Gibco, Thermo Fisher Scientific), a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO_2. Para levantar las células y sembrar las placas, las células fueron tripsinizadas usando Tripsina-EDTA 0,25%. Se realizó una curva de crecimiento para evaluar el tiempo de duplicación. La regresión no lineal de la curva dio como resultado un t = 15,73 h. En función de este dato se eligieron los tiempos de incubación para los ensayos realizados.

2.2. Células de Leydig R2C.

Las células de Leydig tumorales de rata R2C se adquirieron a la empresa ATCC (número de catálogo: 58649146). Fueron mantenidas en cultivo en medio F12 Nutrient Mixture/HAM (Ham´s F12, Gibco, Thermo Fisher Scientific), conteniendo 1,2 g/L de bicarbonato de sodio, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 ug/mL; suplementado con 12,5% de suero de caballo (Gibco, Thermo Fisher) y 2,5% (Natocor, Argentina) de suero fetal bovino (medio completo). Se crecieron a 37 °C en estufa con atmósfera de CO_2 al 5%. Para levantar las células se utilizó Tripsina-EDTA 0,25%. Se realizó una curva de crecimiento para evaluar el tiempo de duplicación, y la regresión no lineal dio como resultado un t = 27,97 h. En función de este dato se eligieron los tiempos de incubación para los ensayos realizados.

Es importante destacar que las dos líneas de CL tumorales no presentan el mismo comportamiento respecto a la síntesis de hormonas. Las CL MA-10

responden a la estimulación con hCG/LH, y sintetizan progesterona como esteroide mayoritario. Por el contrario, las CL R2C presentan esteroidogénesis constitutivamente activada, independiente de la estimulación mediada por hCG/LH, y sintetizan testosterona y estradiol como esteroides mayoritarios debido a la sobreexpresión de aromatasa. Como se muestra en la **figura M1**, las CL R2C sintetizan niveles sumamente elevados de esteroides respecto a las CL MA-10.



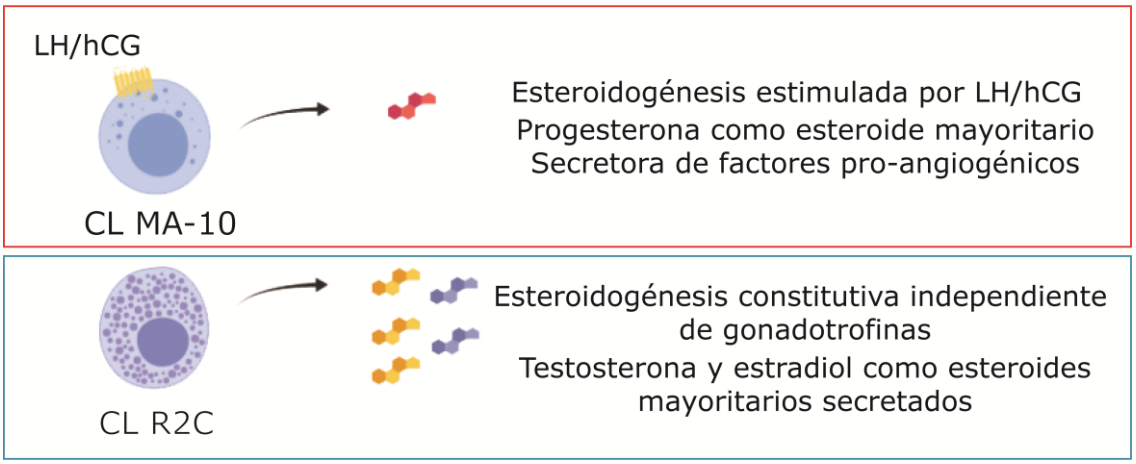


Figura M1. Diferencias entre MA-10 y R2C respecto a la síntesis de esteroides. Las células MA-10 sintetizan esteroides tras la activación del receptor de LH mediante LH o hCG y progesterona es el mayoritario. Las CL R2C no necesitan la activación del receptor de LH para la síntesis de esteroides pues poseen activación constitutiva de la vía de PKA. Sintetizan como esteroides mayoritarios testosterona y estradiol, este último debido a una sobreexpresión de aromatasa. **A.** Niveles de progesterona liberados al medio de incubación tras 24 h de tratamiento. Se expresa en logaritmo debido a las grandes diferencias en el nivel basal de las MA-10 respecto del nivel basal de las R2C. Se utilizó hCG o db-AMPc para estimular la esteroidogénesis. **B.** Resumen de las principales diferencias entre ambos modelos de Leydigioma.

2.3. Células HUVEC.

Las células de endotelio de vena umbilical humana (HUVEC) gentilmente donadas por el Dr. Luis Haro Durand (Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IBYME-CONICET), fueron cultivadas en medio M199 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero fetal bovino, gentamicina 50 mg/mL y VEGF 10 ng/mL, y mantenidas a 37 °C en atmósfera con 5% de CO_2 en frascos T75. Para su siembra en placas de 96 pocillos, fueron procesadas usando Tripsina-EDTA 0,25%. Los tiempos de tratamiento fueron elegidos en función de experimentos previos del laboratorio de origen.

2.4. Ratones C57BL/6 x BALB/c.

Se utilizaron ratones macho de 5 - 6 semanas de edad de la progenie obtenida a partir de la cruza entre hembras C57BL/6 y machos BALB/c, que en este trabajo denominaremos F1. Los ratones F1 fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, bajo las normas aprobadas por su comité de ética basadas en la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH), y donados gentilmente a nuestro laboratorio por las Dras. Patricia Cuasnicú (Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Fertilización, IBYME-CONICET) y Fernanda Parborell (Laboratorio de Estudios de Fisiopatología de Ovario, IBYME-CONIET). Los ratones fueron alimentados con dieta normal *ad libitum*.

2.5. Ratones Swiss$^{Nu/Nu}$.

Se adquirieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, ratones Swiss con la mutación Nu/Nu (Swiss$^{Nu/Un}$), de cinco a seis semanas de edad. Esta mutación les confiere un sistema inmune solamente innato, por lo que se caracterizan por la falta de una

respuesta adaptativa eficiente. Esta característica permite que se les inoculen células con un origen genético distinto y no sean rechazadas. Los utilizamos para poder establecer TCL a partir de las células R2C de rata. Los ratones Nude fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, bajo las normas aprobadas por su comité de ética basadas en la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) y alimentados *ad libitum*. Debido a que son propensos a las infecciones oculares se evitó que estén en contacto con viruta de madera, empleando marlo en su lugar.

3. Reactivos generales

La gonadotrofina coriónica humana (hCG) fue provista por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, Bethesda, MD, EEUU). Di-butiril-AMPc (db-AMPc), HEPES, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), ortovanadato de sodio, leupeptina, aprotinina, pepstatina, espermina, espermidina, fluoruro de sodio, carbón activado, anhídrido acético, Tris hidroximetil aminoetano (Trizma base), albúmina sérica bovina (BSA), azida sódica, ácido etilen-2-glicol-2-etilaminotetracético (EGTA), ácido etilen- diamino – tetracético, (EDTA), ácido tricloro acético (TCA), y Ponceau S fueron comprados a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). El dextrano T-70 y la gelatina para RIA de esteroides fueron de Pharmacia (Amersham-Pharmacia, Reino Unido) y Panreac Química S.A. (Barcelona, España), respectivamente. El carboplatino (cis-di-amino (1, 1-ciclobutanodicarboxilato) platino II) fue donado por el Dr. Ramiro Vázquez (Laboratorio de Terapéutica Experimental, Instituto de Investigación Oncológica, Bellinzona, Suiza). El inhibidor sintético α-MHD (DL-α-metilhistidina dihidrocloruro) y la HA (histamina dihidrocloruro) fueron comprados a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas,

EEUU). El EGCG (galato de epigalocatequina) fue comprado en Abcam (Cambridge, Reino Unido).

[1,2,6,7-^{3}H]-Progesterona, [1β-^{3}H]-Androstenediona, [6,7-^{3}H]-Estradiol y [^{3}H]-Timidina fueron comprados en Perkin Elmer (Perkin Elmer Life and Analytical Siencies, Boston, MA, EEU). El anticuerpo anti estradiol fue donado por Victoria Lux-Lantos (Laboratorio de Neuroendocrinología, IBYME – CONICET).

Los anticuerpos secundarios anti-Ratón, anti-Conejo y anti-Cabra, tanto biotinilados como asociados a HRP, fueron comprados en Vector Laboratories (Burlingame, CA, EEUU).

Todos los medios de cultivo y suplementos enumerados en la sección 2 de Materiales y Métodos, fueron obtenidos en Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU). El material plástico se obtuvo de Corning (Corning, NY, EEUU) y BD Biosciences (NJ, EEUU).

4. Métodos

4.1. Inmunohistoquímica

Cortes de 7 µm de espesor, fijados en formol 4% v/v en PBS e incluidos en parafina, fueron utilizados para el revelado de proteínas específicas empleando un kit de amplificación de estreptavidina-biotina-peroxidasa (DAKO Catalyzed Signal Amplification System, HRP, Dako, CA, EEUU). Los cortes fueron incubados con un bloqueo de proteínas, provisto por el kit, y de peróxido de hidrógeno para evitar marcas inespecíficas, y a continuación con los anticuerpos primarios de interés (en solución de BSA 1% en TBS tween 0,1%), durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Seguidamente fueron incubados durante 15 minutos con los anticuerpos secundarios biotinilados según la especie que correspondiera (Ver Tabla M2

anticuerpos). Como controles negativos, se utilizaron sueros normales de la misma especie que el anticuerpo primario. Al finalizar el protocolo los cortes fueron deshidratados a través del pasaje por alcoholes crecientes y dos tandas de tolueno para su inclusión en medio de montaje anhidro (DPX). Se tomaron fotografías con los objetivos 10x, 20x, 40x y 100x en el microscopio óptico Leica DM (Wetzlar, Alemania). Las barras de referencia fueron calculadas automáticamente usando el programa LAS EZ de Leica.

Para el cálculo de los niveles de p27 tumoral en los experimentos *in vivo*, se contó el número de núcleos por área en 10 fotografías por tratamiento elegidas al azar, obtenidas con un aumento de 40x, utilizando el programa ImageJ. Para el cálculo de la marca positiva para endotelio en los ensayos tendiendes a evaluar la angiogénesis *in vivo*, se utilizó el programa Image Pro Plus en 10 fotografías por tratamiento seleccionadas al azar, obtenidas con el objetivo de 20x.

4.2. Anticuerpos

Tabla M2. Lista de anticuerpos utilizados en IHQ, ICQ y WB.

Nombre	Especie	Concentración	Proveedor
HDC	Conejo	1/100 IHQ, ICQ 1/1000 WB	Santa Cruz (sc-68940)
HA	Conejo	1/50	Sigma (H7403)
P27	Ratón	1/50	Santa Cruz (sc-1641)
StAR	Conejo	1/50	Santa Cruz (sc-25806)
CYP19	Cabra	1/50	Santa Cruz (sc-14245)
VMAT-2	Ratón	1/50	Santa Cruz (sc-374079)
P53	Ratón	1/50	Santa cruz (sc-126)
P21	Ratón	1/50	Santa Cruz (sc-6246)
11β-HSD	Conejo	1/50	Santa Cruz (sc-20175)

c-kit	Conejo	1/50	Santa Cruz (sc-5535)
CD68	Ratón	1/50	Dako - Clone PG-M1 0876
Iba-1	Conejo	1/50	Wako (019-19741)
RE-β	Cabra	1/100	Santa Cruz (sc-6820)
β-tubulina	Ratón	1/4000 WB	Sigma (T-8328)
Calretinina	Ratón	1/100	Santa Cruz (sc-365956)

4.3. Cultivo primario de tumores de células de Leydig humanos.

Muestras de tumores de tres pacientes pediátricos (P1, P2 y P4) fueron disgregadas, digeridas con colagenasa, sembradas en DMEM-Ham´s F12 con 10% de suero fetal bovino y suplementadas con Vitamina C 5 mg/mL y Vitamina E 0,2 ug/mL. Se cultivaron durante dos días y se lavaron para remover las células no adheridas. Se renovó el medio cada 48 h durante 6 días. El día 8 se colectaron los medios condicionados para el tratamiento de las células endoteliales HUVEC, a fin de realizar la evaluación de angiogénesis *in vitro*, y se preservaron a -20 °C.

4.4. Evaluación de angiogénesis *in vitro.*

El medio condicionado para el tratamiento de las HUVEC fue obtenido a partir de CL R2C sembradas en placas de 6 pocillos, en una densidad de 5 x 10^5 células por pocillo, en un volumen final de 1 ml de medio completo. Se mantuvieron en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 durante 72 h y a continuación se agregaron los tratamientos en medio fresco, solo o suplementado con α-MHD 10 μM, durante 48 h adicionales. Se recuperaron los medios y se guardaron a -20 °C.

Las HUVEC fueron incubadas durante 48 h en placas de 96 pocillos con 100 μl de los medios condicionados (ya sea por las R2C o por los tumores de paciente pediátricos) o 100 μl de los siguientes tratamientos: HA (10^{-5} a 10^{-9} M), IGF-1 100

ng/ml y E2 10 μM. Al cabo de las primeras 24 h se agregó al medio un pulso de 0,25 μCi de [^{3}H]-Timidina. El procedimiento para cosechar las células fue el mismo que el descripto en la sección 4.5. Como control negativo se utilizó el medio habitual de las HUVEC: M199. Como control positivo se utilizó VEGF humano en concentración de 1 ng/ml, en M199. Como control del experimento se utilizó el mismo medio en el que fueron cultivados los distintos tipos celulares, pero sin que haya estado en contacto con células: Ham´s F12 con suero de caballo 12,5% y suero fetal bovino 2,5%, en el caso de las R2C; y DMEM-Ham´s F12 con 10% de suero fetal bovino, en el caso de los tumores provenientes de pacientes; pero

4.5. Proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada por los métodos de incorporación de [^{3}H]-Timidina, por el método colorímétrico WST-1 (Roche, Basiela, Suiza) y por el método indirecto de detección de proteínas por Sulforrodamina B.

En el primer caso, 5 x 10^3 células MA-10 por pocillo fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos en medio completo. Al cabo de 48 h se reemplazó el medio por el mismo medio, pero sin suero (medio de hambreo) con el objetivo de que las células se encuentren en la misma fase del ciclo celular, y se mantuvieron en esas condiciones durante 24 h. Las células fueron incubadas durante 48 h en presencia de los tratamientos en medio fresco, según especifica cada figura, en las mismas condiciones de hambreo. Durante las últimas 8 horas se agregó un pulso de [^{3}H]-Timidina (0,25 mCi/mL) al medio. Al finalizar, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, fijadas con etanol y cosechadas utilizando filtros de fibra de vidrio capaces de retener el ADN. La señal en cada filtro se amplificó utilizando líquido de centelleo (Optiphase Hisafe III scintillation liquid; Wallac, Gaithersburg, MD, EEUU) y se midió radiactividad en contador de centelleo (Tri-carb 1600TR; Packard, Meriden, CT, EEUU). En el caso de las CL R2C el procedimiento fue el mismo pero en condiciones de cultivo con medio completo

durante todo el protocolo debido a que no son capaces de resistir la deprivación de suero por tiempos prolongados.

Para los ensayos con WST-1 los períodos de incubación fueron los mismos pero a punto final se incubaron las células con 10 µl del reactivo colorimétrico durante 2 h y se midió absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA Multiscan FC (Thermo Scientific).

En cuanto a los ensayos con Sulforrodamina B, las células fueron tratadas del mismo modo que en los otros dos casos. A punto final se hicieron dos lavados con PBS, se agregaron 100 µl de TCA 50% p/v para precipitar todas las proteínas de cada pocillo, y la placa se incubó durante 1 h a 4 °C. A continuación, la placa se lavó cuatro veces con agua corriente y se realizó una incubación con sulforrodamina 0,04% en ácido acético 1% durante una hora a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se hicieron cuatro lavados con ácido acético 1%. Las células adheridas a la placa con la sulforrodamina B incorporada se resuspendieron en Tris base 10 mM y se midió absorbancia a 590 nm.

4.6. Inmunocitoquímica

Células de Leydig R2C (5 x 10^3) fueron sembradas en vidrios de 12 mm de diámetro (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania) colocados en placas de 24 pocillos como soporte. Las células permanecieron durante 1 h bajo flujo laminar, en una gota de 80 µl de medio completo para que se adhieran. A continuación, el volumen de medio en cada pocillo se llevó a un 1 mL, y las células crecieron en este medio. Al cabo de 72 h fueron fijadas y permeabilizadas con metanol durante 10 minutos. La marcación con anticuerpos específicos fue realizada con el mismo protocolo que se describe en la sección 4.1.: ‘’Inmunohistoquímica’’.

4.7. Western blot

4.7.1. Aislamiento de proteínas

Células R2C (5 x 10^5) fueron sembradas en placas de 6 pocillos en medio de cultivo completo hasta crecer a un 70% de confluencia. A continuación, se las trató durante 48 h en medio completo. Las células fueron despegadas mecánicamente en 80 µl de buffer de lisis por pocillo conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas (Tris-HCl 10 mM, pH 8, Tritón X-100 1%, EGTA 0,5 mM, leupeptina 5 µg/ml, NaF 25 mM, ortovanadato de sodio 25 mM, PMSF 400 µM, pepstatina 5 ug/ml y aprotinina 5 ug/ml). Los tubos se agitaron con *vortex*, y para terminar de fragmentar las células se realizaron 10 pasajes a través de una jeringa de tuberculina (27G). Se centrifugaron los tubos a 12000 g en centrífuga refrigerada para eliminar los restos celulares y se conservó el sobrenadante a -20 °C.

4.7.2. Determinación de proteínas totales por el método de Bradford

Se empleó BSA como estándar a fin de realizar una curva de concentraciones para la determinación de la cantidad de proteínas por pocillo, empleando un método colorimétrico (Bradford 1976).

4.7.3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida

Utilizando un soporte plástico (Bio-Rad, CA, EEUU) se armaron geles de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE). Los extractos previamente incubados en una solución de Tris-HCl 0,06 M; pH 6,8, glicerol 25 % V/V, SDS 2 % P/V, azul de bromofenol 0,01 % P/V y β-mercaptoetanol 5 % V/V, fueron sembrados en los geles y sometidos a electroforesis. Al finalizar la corrida, fueron transferidos con el sistema Semi-seco (Bio-Rad, CA, EEUU) a membranas de PVDF (Thermo Scientific)

de 0,45 µm previamente activadas durante 10 segundos con metanol. Se verificó la trasferencia de las proteínas utilizando Rojo Ponceau.

4.7.4. Revelado de proteínas específicas

Las membranas de PVDF fueron bloqueadas con una solución de leche 5% v/v en PBS-tween 0,1 % v/v y a continuación incubadas con el anticuerpo anti-HDC hecho en conejo (Ver tabla de anticuerpos) en una concentración 1/1000 en PBS-tween 0,1% v/v durante toda la noche. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-conejo ligado a HRP 1/4000 durante 1 h, y como control de carga se empleó β-tubulina. Para el revelado se utilizó ECL (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU), y se empleó en el equipo G:BOX Chemi (Syngene, Frederick, MD, EEUU). La densitometría de las bandas obtenidas se llevó a cabo utilizando el programa Image J y estas fueron relativizadas al control de carga.

4.8. Determinación de los niveles de ARN mensajero en CL R2C.

4.8.1. Aislamiento de ARN.

Se sembraron 5 x 10^5 células en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 72 h hasta que alcanzaron un 60-70% de confluencia aproximadamente. En ese momento fueron incubadas con los distintos tratamientos según se especifica en las figuras, durante 48 h en medio completo. Se levantaron las células previo lavado con PBS utilizando 500 µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) por pocillo y se llevó a cabo el protocolo sugerido por el proveedor para la extracción de ARN total. Se cuantificó la cantidad de ARN utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se conservó a -70 °C resuspendido en agua libre de ARNasas.

4.8.2. Retrotranscripción (RT) para la obtención de ADNc.

Se obtuvo ADNc a partir de las muestras de ARN total utilizando el kit de SuperScript II (Thermo Fischer Scientific) de acuerdo a las especificaciones del vendedor, empleando 1 µg de ARN. Se incubó el ARN con Oligo dT en agua libre de ARNsas y se desnaturalizaron las muestras incubando a 65 °C durante 5 minutos. Luego se agregó el buffer de reacción con dNTPs, inhibidores de ARNsas y transcriptasa reversa, y se realizó una incubación durante 60 min a 42 °C. La reacción se inactivó a 70 °C durante 5 min. El ADNc se conservó a -20 °C.

4.8.3. PCR en tiempo real

Se utilizó SYBR Green Master Mix (Roche, Basilea, Suiza) para realizar la reacción en cadena de polimerasa del siguiente modo: Se incubó 1 µl de la muestra obtenida por retrotranscripción, junto a 1,5 µl de *primer forward*, 1,5 µl de *primer reverse* (ambos en concentración final de 300 nM para los mensajeros de interés y 900 nM para los de GAPDH utilizado como *housekeeping)*, 5 µl de la *Master Mix*, llevando a 10 µl finales con agua autoclavada. Se realizaron controles negativos sin *primers,* y controles negativos sin muestra. Los parámetros para la reacción fueron: un ciclo de 95°C durante 15 minutos, seguido de 50 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 60 segundos, y 72 °C durante 33 segundos. Los datos fueron colectados en la fase de extensión de 72 °C. Para verificar la presencia de un producto único se realizó una curva de disociación al final de la reacción. Los *primers* utilizados que se especifican en la tabla M3, se obtuvieron a partir de bibliografía y se corroboraron utilizando el programa BLAST de NCBI. Para la reacción se utilizó el equipo StepOne (Applied Biosystems).

Tabla M3. Secuencias de *primers* utilizadas para la amplificación del ARN mensajero de interés durante la PCR en tiempo real.

Mensajero	Forward	Reverse
CYP19	5′- GAG AAA CTG GAA GAC TGT ATG GAT -3′	5′- ACT GAT TCA CGT TCT CCT TTG TCA -3′
HDC	5´-TAG GTG ACG GGA GTC TTC AAT C-3´	5´- ATG GGC TTA CTT CCC TCA AGA T -3´
TGM-2	5′-CCA ACT ACA ACT CGG CCC AT-3′	5′-CTG GTC ATC CAC GAC TCC AC-3′
GAPDH	5′- GGG TGT GAA CCA CGA GAA AT -3′	5′- ACT GTG GTC ATG AGC CCT TC -3′

4.9. Cuantificación de histamina en medio de cultivo y en plasma de ratón.

Un millón de células de ambas líneas, MA-10 y R2C, se sembraron en placas p100 en medio completo y crecieron hasta llegar a confluencia. Para cuantificar los niveles de HA liberados al medio de incubación, los medios condicionados por las células MA-10 y R2C fueron trasvasados a la placa de 96 pocillos de un kit comercial para el dosaje de HA (Histamine ELISA kit, ab-213975, abcam, Cambridge, Reino Unido) El mismo protocolo se llevó a cabo en muestras de plasma obtenidas por decapitación de ratones C57BL/6 machos de 9 semanas de edad, para ser utilizadas como control positivo. Se midió la absorbancia del kit colorimétrico y se contrastó con una curva de calibración proporcionada por el fabricante. Debido a que la HA se degrada con rapidez, estos ensayos fueron realizados con la muestra fresca sin congelar, y se reforzó el análisis colocando muestras de HA de concentración conocida como control complementario. Cabe

destacar que la presencia de Histidina en el medio de incubación no afectó los resultados, dado que el kit no presenta reacción cruzada entre HA y su precursor.

4.10. Cuantificación de progesterona y estradiol por Radioinmunoensayo (RIA) en medios de cultivo de MA-10 y R2C.

En el caso de las MA-10, 2 x 10^4 células fueron sembradas en placas de 12 pocillos en medio completo. Al cabo de 72 h fueron hambreadas durante 24 h más. Se trataron las células durante 5 o 24 h según se especifica en cada figura, para el estudio de esteroidogénesis estimulada por LH/hCG o dbAMPc. En el caso de las CL R2C, 20000 células por pocillo fueron sembradas en placas de 12 pocillos en medio completo. Los tratamientos fueron realizados en ausencia de hambreo, es decir también en medio completo, según se específica en cada figura, durante 24 y 48 h. A punto final se recuperaron los medios de cultivo en cada caso y se llevó a cabo la técnica de RIA (Charreau y col, 1981). La cuantificación de los esteroides se realizó por duplicado utilizando anticuerpos específicos previamente titulados para determinarla dilución óptima a usar, correspondiente a aproximadamente un 30% de unión de la hormona tritiada. Brevemente, alícuotas de 100 µl del medio de incubación (sin diluir en el caso de las MA-10 control, diluído 1:10 en el caso del tratamiento con hCG y diluído 1:40 en el caso del tratamiento con db-AMPc; y diluído 1:100 para todos los tratamientos en el caso de las R2C) fueron transferidos a tubos de plástico, donde se agregaron 200 µl 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 µl de hormona tritiada y 100 µl de anticuerpo. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche 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 les agregó 1,5 ml de líquido de centelleo. La radioactividad de los mismos se determinó utilizando un contador de centelleo líquido (Tri-carb 1600TR; Packard, Meriden, CT, EEUU). El rango la curva de calibración del ensayo fue de 25 a 1600 pg/tubo para progesterona, y de 1,75 a 900 pg/tubo para estradiol (volumen final/tubo: 500 µl).

4.11. Ensayo de actividad de aromatasa

Se evaluó la capacidad de los tratamientos de inhibir de forma directa la actividad de aromatasa. Para ello las células R2C fueron sembradas en placas de 24 pocillos, a razón de 1 x 10^5 células por pocillo, y al cabo de 72 h se incubaron en medio completo con los tratamientos durante 48 h. Durante las últimas 4 horas de incubación se agregó 1β-^{3}[H]-Androstenediona (0,67 µCi) para ser utilizada como sustrato de la enzima. Dada la posición del sustituyente tritiado en la molécula, al ser aromatizada a estrona, libera agua tritiada, por lo tanto, se puede medir la cantidad de agua radiactiva como producto final. A mayor aromatización, mayor cantidad de agua tritiada. La reacción se detuvo precipitando las proteínas, mediante el agregado de TCA al 30% p/v, y las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos. Se colocó 2,5 veces de cloroformo para extraer del sobrenadante la androstenediona remanente y mantener solo la radiactividad del agua tritiada en la fase acuosa. Se agregó luego carbón (Norit A; 5 % p/v)-dextrano (dextrano 70; 0,5% p/v) en la fase acuosa para terminar de extraer el esteroide remanente. Se centrifugó a 1700 g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales de conteo con 1 ml de líquido de centelleo. Se midió radiactividad utilizando un contador de centelleo líquido Tri-carb 1600TR (Packard, Meriden, CT, EEUU). Se utilizó como control la incubación

con Letrozole 10 μM debido a que es inhibidor específico de la actividad de aromatasa.

4.12. Evaluación de angiogénesis *in vivo*. Ensayo CAM.

El medio condicionado para el tratamiento de las CAM fue obtenido a partir de CL R2C sembradas en placas de 6 en una densidad de 5 x 10^5 células por pocillo en un volumen final de 1 ml de medio completo. Se mantuvieron en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 durante 72 h y a continuación se colocaron los tratamientos en medio fresco solo o suplementado con α-MHD 10 μM durante 48 h. Los medios fueron colectados y conservados a -20 °C.

Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la proliferación de los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea (CAM) de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix*) de acuerdo a lo descripto por Parsons-Wingerter y col. Huevos de codorniz fertilizados con un día de puesta fueron incubados *in ovo* durante 2 días en estufa a 37 °C. A continuación se realizó el *exovo* (obtención de embriones vivos a través de una pequeña abertura en la cáscara del huevo) y se trasladaron a placas de 6 pocillos, esterilizadas, como soporte (Ver figura M2). Se incubó a los embriones durante 5 días más en las mismas condiciones. Cumplido ese tiempo, los embriones fueron incubados con discos de papel absorbente embebidos en los tratamientos según especifica la figura, y mantenidos a 37 °C durante 48 h más. Cumplido ese tiempo fueron sacrificados por congelamiento (-20 °C) y fijados con 2 mL de una solución de 4% formalina y 2% glutaraldehído v/v en PBS. Los discos fueron retirados y observados bajo lupa estereoscópica para la obtención de fotografías con una magnificación de 20x. En cada disco se cuantificó el número de bifurcaciones por vaso y la cantidad de vasos entrantes en el disco de papel, utilizando el programa ImageJ y el área del disco (5 mm de diámetro) como referencia.

Figura M2: Fotografía representativa de la disposición de los tratamientos sobre los embriones de codorniz. De lado izquierdo se observan tres discos de papel de filtro dispuestos sobre los vasos de la CAM evitando la zona del embrión. Del lado derecho se observa un embrión sin tratar de 10 días de crecimiento. Los discos de papel fueron embebidos en medios de cultivo condicionados durante 48 h *in vitro* por las CL R2C en presencia y ausencia del tratamiento con α-MHD. Como control se utilizó medio de cultivo de R2C en ausencia de células.

5. Experimentos *in vivo* en los modelos murinos de Leydigioma

5.1. Protocolo de inyección y obtención de muestras

Ratones de las cepas especificadas en 2.4. y 2.5. fueron mantenidos en un ambiente de 22 °C y humedad controlada, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Las células se inocularon según se especifica en la figura de forma subcutánea en ambos flancos, utilizando agujas de calibre 27G. Al cabo de 12 a 14 días, cuando se establecieron los tumores de aproximadamente 50 mm^3, comenzamos los tratamientos. El carboplatino fue disuelto en solución fisiológica con dextrosa 5% p/v para una mejor estabilidad del compuesto y mantenido fuera del alcance de la luz. Se inyectaron 100 µl de carboplatino en forma intraperitoneal semanalmente con jeringas de tuberculina de calibre 27G. El EGCG y el α-MHD fueron inyectados en forma intraperitoneal tres veces por semana según especifica el esquema, en

100 µl, con jeringas de tuberculina de calibre 27G. Ambos tratamientos fueron disueltos en PBS y se protegieron de la luz. Los ratones control recibieron inyecciones de dextrosa 5% y de PBS según el mismo esquema de administración.

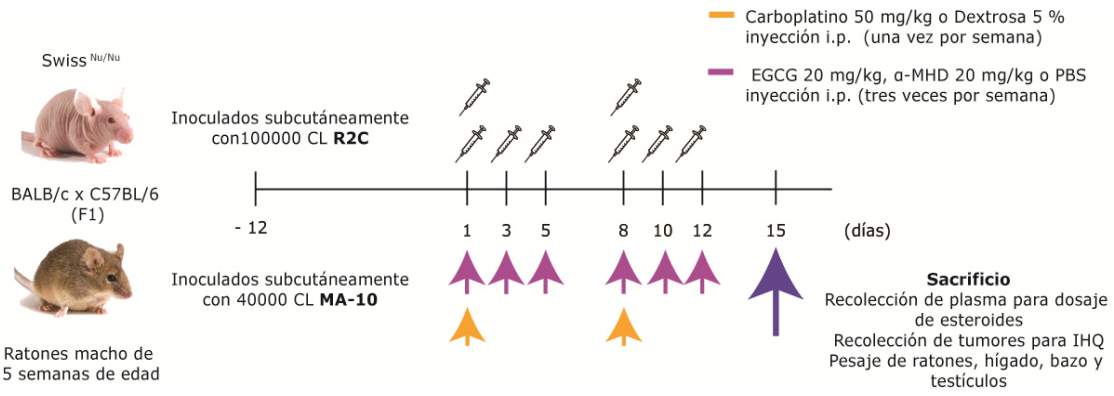


Figura M3. Esquema de administración para los experimentos *in vivo*. El color de las flechas corresponde al color de referencia de los compuestos.

La determinación de las dosis a inyectar se realizó a partir de ensayos pre-clínicos disponibles en la bibliografía, y se corroboraron a través de la aplicación de la conversión de valores de EC50 *in vitro* a valores *in vivo* según: "Guidance document on using *in vitro* data to estimate *in vivo* starting doses for acute toxicity" del NIH, donde a partir del análisis de 347 compuestos obtienen la siguiente ecuación: log (LD50 [mmol/kg]) = 0,435 x log (IC50 [mmol/l]) + 0,625.

El tamaño tumoral fue medido con calibre usando el largo y el ancho de cada tumor durante los días de inyección, y se estimó el total a través de la ecuación Ancho^2 x Largo/2. A punto final los tumores fueron pesados. Para el cálculo del peso corporal se pesó cada ratón y a ese valor se le restó el peso de ambos tumores. Para el cálculo de los índices somáticos se pesaron hígado, bazo y testículos. Cada índice corresponde a la relación entre el peso del órgano y el peso corporal de cada ratón por 100. Muestras de tumores y testículos para cada

tratamiento fueron fijados con formol 4% v/v en PBS durante 24 horas y luego trasvasados a alcohol 70° como conservante, e incluidos en parafina.

Se obtuvieron muestras de sangre por decapitación en EDTA 500 mM para la extracción de plasma a fin de cuantificar progesterona, testosterona o estradiol según corresponda.

5.2. Determinación de los niveles de progesterona, testosterona y estradiol en plasma.

La progesterona plasmática se determinó en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan por inmunoensayo automatizado con marca quimioluminiscente en Plataforma Immulite XPi – Siemens. Este método no cruza con otros progestágenos.

La testosterona se determinó utilizando el kit ACTIVE Free Testosterone RIA (DSL-4900) Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) y los niveles de radiactividad se cuantificaron en un contador Beckman Gamma 4000.

El estradiol se determinó utilizando un kit de ELISA (EIA-2693, DRG Instruments GmbH).

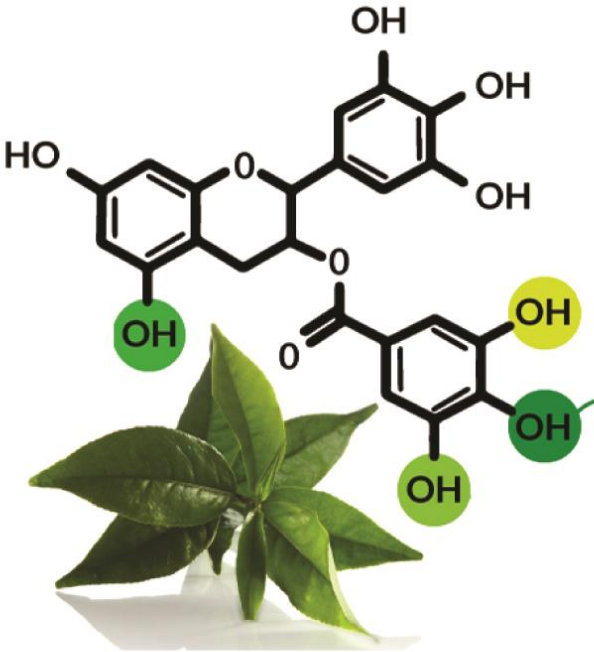
5.3. Determinación de apoptosis mediante la técnica de TUNEL

Cortes de tumores de 7 µm de espesor incluidos en parafina fueron procesados según las especificaciones del kit de TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System) para la evaluación de núcleos apoptóticos. Como control positivo se utilizó DNAasa I (3U/ml). Brevemente, los cortes fueron desparafinados e hidratados en alcoholes sucesivos y re-fijados con paraformaldehído. Utilizando proteinasa K se permeabilizaron durante 10 minutos para no afectar la integridad

del tejido. A continuación, se incubaron con los reactivos provistos en el kit. El fundamento de la técnica es el reemplazo por nucleótidos asociados a biotina en el extremo 3'-OH libre utilizando la enzima transferasa terminal (TdT), para evaluar sitios donde el ADN esté fragmentado. Para el revelado se utilizó DAB. Finalmente, los cortes se deshidrataron y se incluyeron en medio de montaje anhidro (DPX). Se tomaron fotos de las zonas con núcleos TUNEL positivo.

6. Análisis Estadístico

En análisis estadístico fue realizado con el programa Graph Pad Prism (Versión 6.01, GraphPad Software, Inc). Los experimentos *in vitro* fueron sometidos al análisis de ANOVA de una vía seguido de contraste de Tukey para múltiples comparaciones. Para comparar medias de solamente dos grupos se empleó la prueba t de Student. Los experimentos *in vivo* se analizaron a través de un ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguido del test de Holm-Sidak para múltiples comparaciones. En el caso de las áreas bajo la curva el análisis se realizó por ANOVA de una vía, al igual que los experimentos *in vitro*. Las curvas de crecimiento se ajustaron a una regresión no lineal y se puso a prueba la hipótesis de que todas ajusten a la misma curva. Del rechazo de esa hipótesis se obtuvo una curva para cada tratamiento y su correspondiente tiempo de duplicación. En todos los casos un valor de p menor a 0,05 fue considerado significativo.



Resultados

Capítulo 1.

De la histamina y su rol como factor de crecimiento en células de Leydig tumorales *in vitro*.

Objetivos específicos de este capítulo

- Estudiar la expresión de HDC en TCL pediátricos.
- Investigar los efectos de la HA sobre la proliferación y la capacidad proangiogénica de las CL tumorales *in vitro*.
- Evaluar la inhibición farmacológica de HDC como potencial estrategia para disminuir el crecimiento de CL tumorales *in vitro*.

1.1. Expresión de HDC en niños durante el desarrollo gonadal normal y en pacientes pediátricos con tumores de células de Leydig.

En colaboración con las Dras. Alicia Belgorosky y Esperanza Berensztein, del Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, estudiamos la expresión de HDC en testículos pertenecientes a pacientes pediátricos. Ante la falta de bibliografía acerca de la expresión de HDC durante el desarrollo gonadal humano, y teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro laboratorio que señalaban que la HA cumple un papel como modulador de la funcionalidad de las células de Leydig, (Mondillo y col, 2005; Pagotto y col, 2012; Abiuso y col, 2014), se investigó la expresión de dicha enzima en distintos estadios de maduración gonadal por inmunohistoquímica.

El estudio se realizó para los cinco estadios del desarrollo propuestos por Berensztein y col. (Berensztein y col, 2006) (G0 – G4, Ver Tabla M1, Sección Materiales y Métodos). Como resultado del mismo, observamos marcación positiva para HDC en los estadios G0, G1 y G4 (**Figura R1** y resumen en Tabla R1). En el estadio G0 se observó marca positiva intensa en las CL fetales, responsables de la síntesis de testosterona intrauterina. En G1 observamos marcación positiva en lo que se consideran nichos remanentes de células de Leydig fetales, que desaparecen conforme se desarrolla el testículo. Estas observaciones coinciden con un reporte previo de nuestro grupo, en el que describimos que hay alta expresión de HDC en testículos de ratas de 7 días, que luego disminuye con la edad (Pagotto y col, 2012). En G2 y G3 la inmunomarca para

HDC fue negativa en el intersticio testicular. Finalmente, observamos marcación positiva en CL maduras en el estadio G4.

Tabla R1. Marcación de HDC en los cinco estadios de desarrollo testicular humano.

Estadio	**G0**	**G1**	**G2**	**G3**	**G4**
Marcación para HDC	Positiva en CL fetales	Positiva en CL fetales remanentes	Negativa	Negativa	Positiva en CL puberales

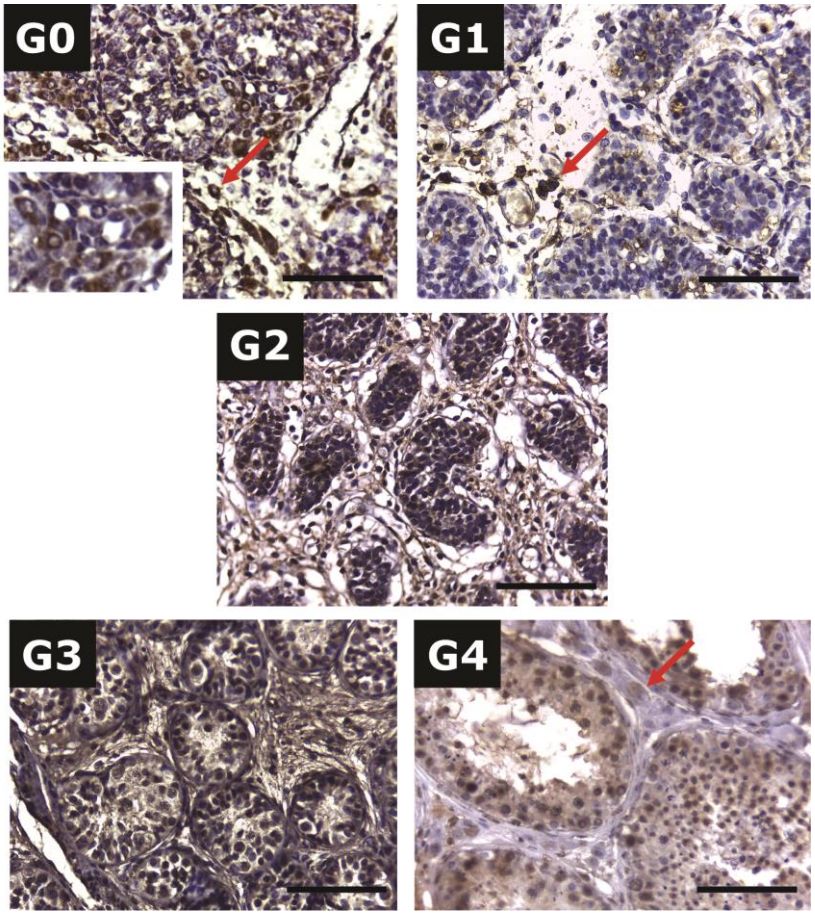
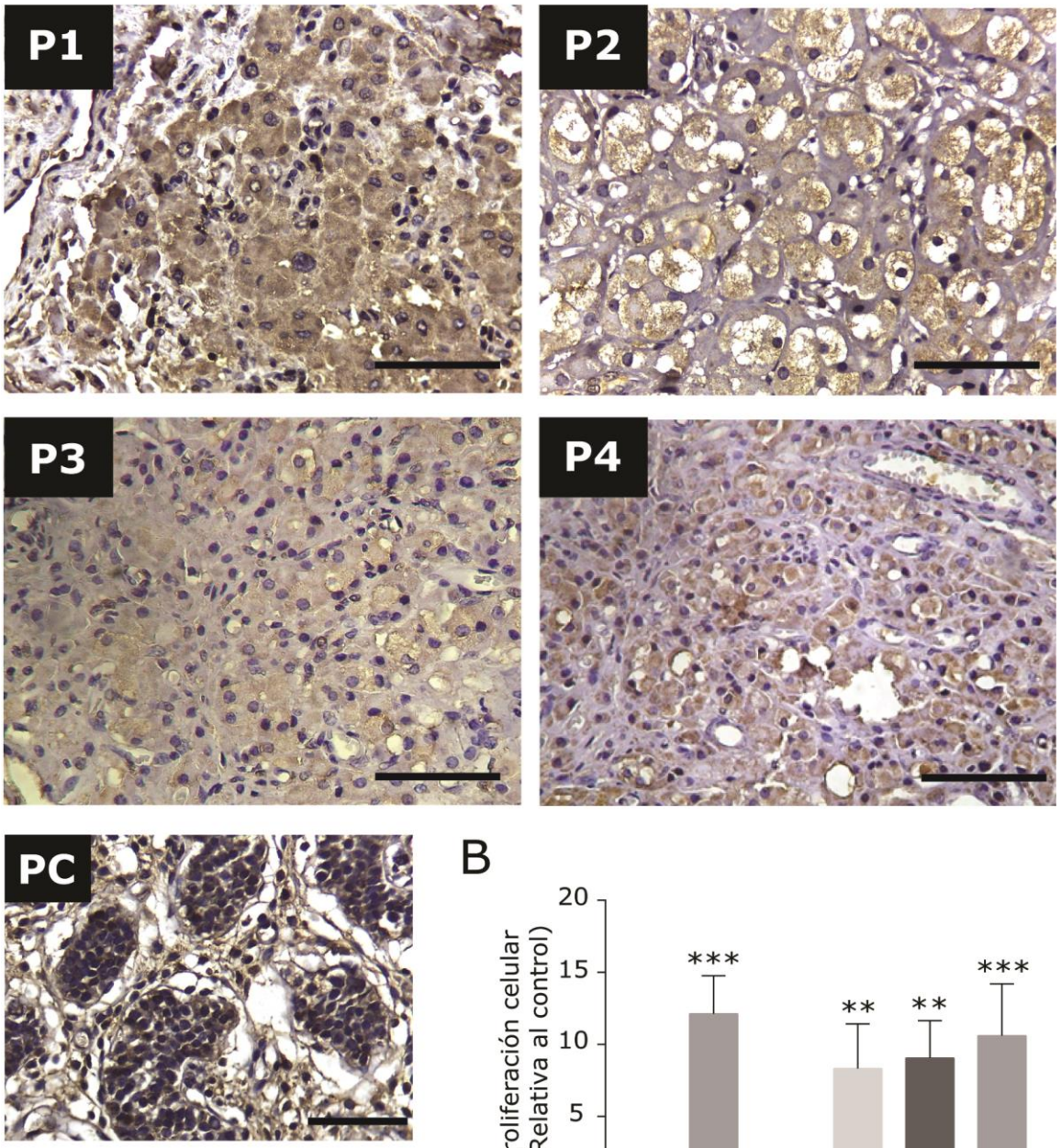


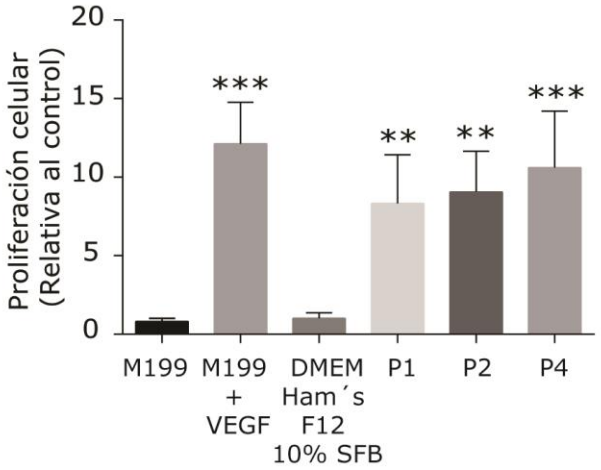
Figura R1. Expresión de HDC durante la ontogenia testicular humana. Inmunohistoquímica realizada en cortes incluidos en parafina de 7 µm de ancho para evaluar la expresión de HDC en testículos pertenecientes a niños en cada etapa del desarrollo gonadal (G0-G4, ver Materiales y Métodos). Las muestras se obtuvieron a partir de pacientes pediátricos con patologías no endócrinas ni metabólicas. Las flechas rojas indican marca positiva. La barra negra indica 50 µM.

Al día de hoy poco se sabe respecto al origen de los TCL. Se considera que podría estar asociado a altos niveles de CYP19 o mutaciones activantes de LH, pero no todos los TCL presentan estos fenotipos. Dadas las evidencias que indican la sobreexpresión de HDC en distintos tipos de tumores, en este trabajo decidimos investigar si HDC podría estar relacionada con el desarrollo de TCL en niños, evaluando su expresión en cortes de testículos de pacientes pediátricos con TCL (n = 4), también por inmunohistoquímica. Dicha expresión se comparó con tejido testicular normal perteneciente a niños de la misma edad que los patológicos (Etapa G3, juvenil, Ver Tabla M1, Materiales y Métodos). Se observó elevada expresión de HDC en todos los tumores analizados. En contraposición, la expresión fue negativa en los controles en la zona del intersticio testicular donde se encuentran las células de Leydig en desarrollo (**Figura R2, A**). Adicionalmente, decidimos estudiar si los tumores de dichos pacientes eran capaces de liberar factores proangiogénicos en condiciones de cultivo celular, considerando a la angiogénesis como uno de los pilares imprescindibles durante el desarrollo tumoral. Para ello, los tumores fueron disgregados con colagenasa y cultivados en medio óptimo para su crecimiento (según lo especificado en Materiales y Métodos). Los sobrenadantes recuperados fueron utilizados para evaluar la proliferación de células de endotelio de vena umbilical humana (HUVEC), modelo ampliamente utilizado para estudiar la vasculatura *in vitro* dado que las HUVEC necesitan como condición *sine qua non* la presencia de factores pro-angiogénicos para proliferar (Haro Durand y col, 2014). Pudimos observar que los medios condicionados obtenidos a partir de los tumores de CL fueron capaces de estimular la proliferación de las HUVEC en aproximadamente un 90%, sin la necesidad del agregado habitual de factores de crecimiento que requieren estas células (**Figura R2, B**).

A


P1
P2
P3
P4
PC

B


Proliferación celular
(Relativa al control)
20
15
10
5
0
***
**
**
***
M199
M199 + VEGF
DMEM Ham´s F12 10% SFB
P1
P2
P4

(Página anterior) Figura R2. Expresión de HDC y modulación de la angiogénesis en pacientes pediátricos con TCL. A. Inmunohistoquímica realizada en cortes de 7 µm de ancho incluidos en parafina para evaluar la expresión de HDC en pacientes con TCL (P1-P4) *vs.* paciente control perteneciente al mismo período de desarrollo gonadal (PC, paciente control). Se utilizó suero normal de conejo como control negativo. La barra negra indica 50 µM. **B.** Evaluación de la proliferación de células HUVEC *in vitro* utilizando como parámetro la incorporación de [^{3}H]-Timidina. Las células fueron incubadas durante 48 h con los medios condicionados P1, P2 y P4, y durante las últimas 24 h se agregó la [^{3}H]-Timidina. M199 es el medio de cultivo utilizado de rutina para las HUVEC; M199 + VEGF 1 ng/mL se utilizó como control positivo de la proliferación celular; Ham´s F12 con SFB (Suero fetal bovino) al 10% fue el medio en el que se realizaron los cultivos primarios de los TCL, y que en este caso fue tomado como control para relativizar la proliferación en presencia de medios condicionados (P1, P2 y P4). Las barras de error representan la media ± EE. **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$, a través de ANOVA de una vía.

Seguidamente, extendimos el estudio de la expresión de HDC a otras patologías originadas en órganos reproductores de pacientes pediátricos. Se analizaron tumores de células de Sertoli, que, al igual que los TCL, son poco frecuentes, pero pueden aparecer tanto en testículo como en ovario, y generalmente son confundidos con seminomas debido a que comparten como principal característica histológica un citoplasma claro (Henley y col, 2002). Además, frecuentemente se presentan asociados a células de Leydig neoplásicas, y en ese caso se los denomina tumores de Sertoli-Leydig. Debido a que se originan en el sistema reproductor, la cirugía conservativa es la primera elección, acompañada de adyuvancia post-operatoria con quimioterapia. Aproximadamente el 5% de estos tumores presentan recurrencia luego del tratamiento convencional (Gui y col, 2012). Debido a esto resulta necesario el estudio de posibles estrategias para disminuir el tamaño tumoral antes de la cirugía, a fin de generar tumores más pequeños, que al ser removidos dañen lo menos posible el tejido circundante.

Por otro lado, se analizaron hiperplasias de células de Leydig, debido a que su presencia genera desórdenes endócrinos análogos a los producidos por los TCL: ginecomastia y pseudo pubertad precoz (Tazi y col, 2008), y poseen marcadores en común con los TCL (Newman y col, 2019). A su vez, tanto los TCL como las hiperplasias

de CL se presentan como consecuencia de elevados niveles de LH. Considerando estas evidencias, podría pensarse en revertir la proliferación patológica de las hiperplasias de células de Leydig utilizando estrategias similares a las que expondremos para TCL.

Por último, se analizaron tumores germinales. Esta familia de tumores es de especial interés debido a que son los más comunes en el testículo, y la neoplasia con más incidencia en hombres entre 15 y 44 años de edad (Batool y col, 2019). Según la Asociación Europea de Urología, del 15 al 30% de estos tumores presentan recaídas luego de la primera terapia y requieren tratamientos accesorios, que al momento son limitados. Por otro lado, presentan los mismos efectos secundarios asociados a la quimio y radioterapia mencionados en la introducción para los TCL.

Se observó marcación positiva para HDC en tumores de Sertoli e hiperplasias de células de Leydig. En tumores germinales observamos marca tanto en el tumor mismo como en el infiltrado linfocitario (**Figura R3**).

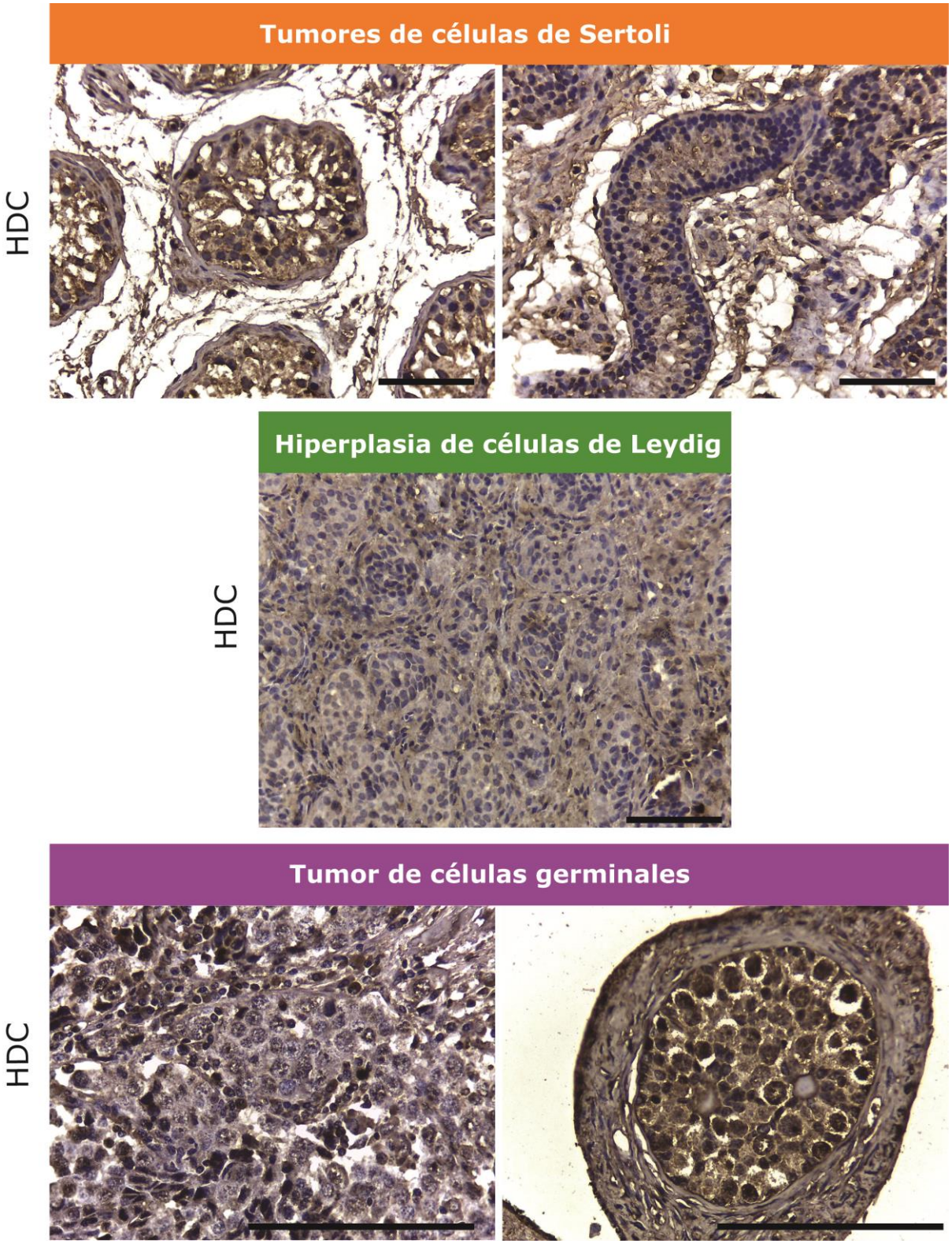


Figura R3. Expresión de HDC en tumores de células de Sertoli, hiperplasia de células de Leydig y tumores de células germinales. IHQ realizadas en cortes de testículos pediátricos humanos utilizando anticuerpo específico anti-TGM-2. Contratinción realizada con hematoxilina. La barra negra representa 50 µm. n = 2 para tumores de Sertoli y tumores germinales, n = 1 para hiperplasia de Leydig.

1.2.1. La HA como moduladora de la proliferación en CL tumorales

Al día de hoy existe amplia evidencia empírica acerca de la capacidad de la HA para modular la proliferación de células normales y malignas (Medina 2010), a través de diversos mecanismos asociados a la activación de sus receptores de membrana H1R-H4R, como ser la modulación de los niveles de VEGF, la liberación de IP_3/Ca^{2+}, activación de proteínas G, modulación del segundo mensajero AMPc, y otros. Se sabe que la mayoría de las líneas de células malignas y tumores experimentales expresan HDC y contienen altas concentraciones de HA endógena. Además, la concentración de HA es mayor en diversos tumores humanos (melanoma, colon y cáncer de mama, entre otros) en comparación con el tejido normal circundante (Kennedy y col, 2012, Massari y col, 2018), y se ha demostrado que numerosas líneas celulares de cáncer humano, así como los tejidos tumorales, expresan al menos uno de los cuatro subtipos de receptores de HA descriptos. En nuestro laboratorio reportamos que la HA estimula la proliferación de las CL tumorales MA-10, en contraposición con lo observado en cultivos primarios de CL inmaduras y progenitoras, que no responden al estímulo proliferativo de HA (Pagotto y col, 2012).

Dado que en la clínica se observan distintos fenotipos de TCL (ver Introducción), decidimos realizar nuestros estudios en dos líneas de CL tumorales, utilizados por otros grupos para el estudio de Leydigiomas. Las CL tumorales MA-10, dependientes de gonadotrofinas para sintetizar esteroides al igual que las células de Leydig normales, pero que a diferencia de estas sintetizan progesterona como esteroide mayoritario; y las CL tumorales R2C, que presentan esteroidogénesis constitutiva **independiente** del estímulo gonadotrófico y sobrexpresan CYP19, sintetizando como esteroide mayoritario estradiol. Cabe destacar que, como se indicó en la introducción, uno de los fenotipos más frecuentes en la clínica se caracteriza por la aparición de ginecomastia, producto de niveles aberrantes de estradiol plasmático en pacientes con TCL.

En este trabajo observamos que, al igual que habíamos descripto previamente en el laboratorio para las CL MA-10, la HA es capaz de estimular la proliferación de las CL R2C de forma concentración-dependiente (**Figura R4, A**). Este efecto resultó aún mayor que el observado en presencia de IGF-1, que había sido señalado previamente por otros autores como factor de crecimiento autocrino en esta línea celular (Sirianni y col, 2007) (**Figura R4, B**). Utilizando la técnica de inmunocitoquímica, verificamos la expresión de HDC en las CL R2C (**Figura R4, C**), y la misma aumentó en presencia de IGF-1 aproximadamente un 70% (**Figura R4, D**). A su vez, la inhibición específica de HDC utilizando α-MHD disminuyó la proliferación de las CL R2C. A continuación, para verificar que dicha disminución se debía efectivamente a una merma en la producción de HA, se realizó un experimento de reversión agregando HA en el medio de incubación luego del tratamiento con α-MHD. Brevemente, se realizó una comparación de número de células en los pocillos control sin tratamiento, los pocillos correspondientes al tratamiento con el inhibidor de HDC y los pocillos correspondientes al tratamiento con el inhibidor de HDC más un pulso de HA posterior a fin de restaurar los niveles de esta amina en el medio de cultivo. Como resultado de este experimento, observamos que, al revertir la inhibición de HDC agregando HA en el medio de cultivo, el número de células se recuperó y fue comparable al control (**Figura R4, E**). Finalmente, comparamos los niveles de expresión de HDC en los dos modelos de CL tumorales, y resultaron similares (**Figura R4, F**).

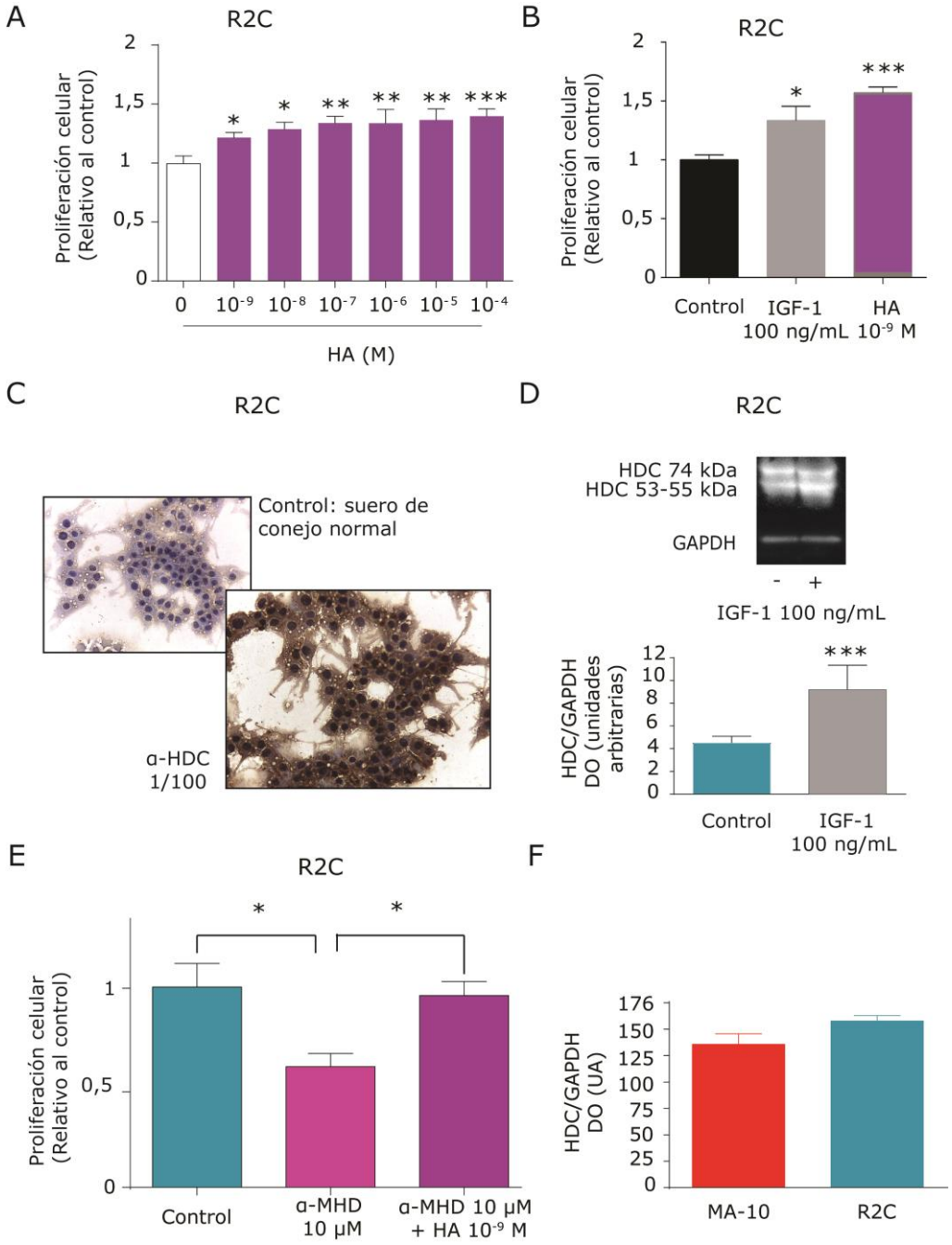
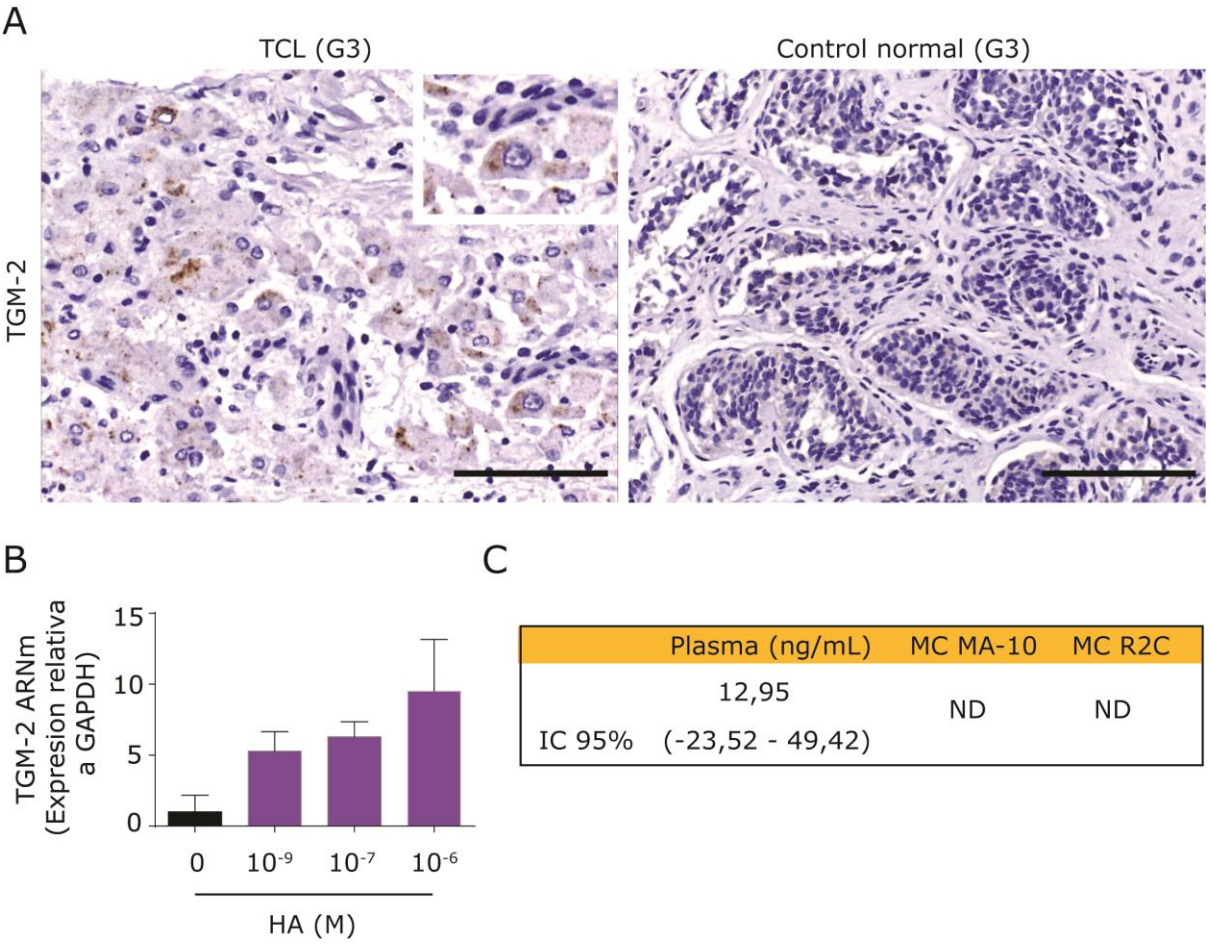


Figura R4. Modulación de la proliferación mediada por HA y expresión de HDC en CL tumorales R2C. A y B. Análisis de la proliferación celular de R2C en presencia de concentraciones crecientes de HA (10^{-9} – 10^{-4} M) y de IGF-1. Las células fueron incubadas con HA o IGF-1 en medio completo durante 48 h, tal como se especifica en la figura. Se analizó la incorporación de [^{3}H]-Timidina durante las últimas 8 horas de incubación. **C. Expresión de HDC en CL R2C**. Se utilizó la técnica de inmunocitoquímica en células que fueron fijadas y permeabilizadas con metanol, luego incubadas con anticuerpo anti-HDC hecho en conejo (ver tabla de anticuerpos en Materiales y métodos) y reveladas usando DAB. **D. Modulación de la expresión de HDC en CL R2C mediada por IGF-1.** Las células fueron incubadas durante 48 h en medio completo con IGF-1 100 ng/mL y luego se las procesó para extracción de proteínas para

Western Blot. El histograma representa la densitometría de las bandas reveladas respecto a GAPDH como control de carga. **E.** Se evaluó la inhibición de HDC sobre la proliferación de CL R2C y la reversión al reponer el medio con HA. La columna central indica la proliferación de células incubadas durante 48 h con el inhibidor específico de HDC, α-MHD, en medio completo; y la columna de la derecha representa una incubación de 72 h con el inhibidor y durante las últimas 24 h con un pulso de HA para revertir el efecto. **F.** Densitometría de las bandas de Western Blot para el análisis de la expresión de HDC en R2C a comparación de MA-10. DO: Densidad óptica. UA: Unidades arbitrarias. Las barras de error representan la media ± EE.*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, contrastados través de ANOVA de una vía en el caso de múltiples comparaciones y con t de Student en el caso de una sola comparación.

1.2.2. Estudio de la expresión de TGM-2 en TCL.

En función de lo descripto en la Introducción respecto a los múltiples mecanismos de la HA para ejercer sus funciones, nos preguntamos si en este tipo de tumores la HA sería liberada al medio de cultivo para luego ejercer sus acciones través de sus receptores específicos, o si sería retenida en el interior de la célula. Utilizando cortes de TCL pertenecientes a un niño en etapa G3, pudimos observar expresión positiva de la enzima TGM-2, en contraposición con la expresión negativa observada en un control normal del mismo estadio de desarrollo gonadal (**Figura R5, A**). Cabe recordar que TGM-2 es una enzima capaz de histaminilar residuos proteicos. Por otro lado, al intentar dosar los niveles de HA liberados al medio de cultivo empleando un Kit comercial, tanto en CL MA-10 como en CL R2C los valores no entraron, por defecto, dentro del rango de detección del reactivo. Como control positivo se empleó plasma de ratón C57BL/6 (**Figura R5, B**). Este resultado permite especular que la HA no estaría siendo liberada en forma masiva al espacio extracelular en ninguno de los modelos de CL tumorales en cultivo, por lo que no puede descartarse que tenga una función intracelular.

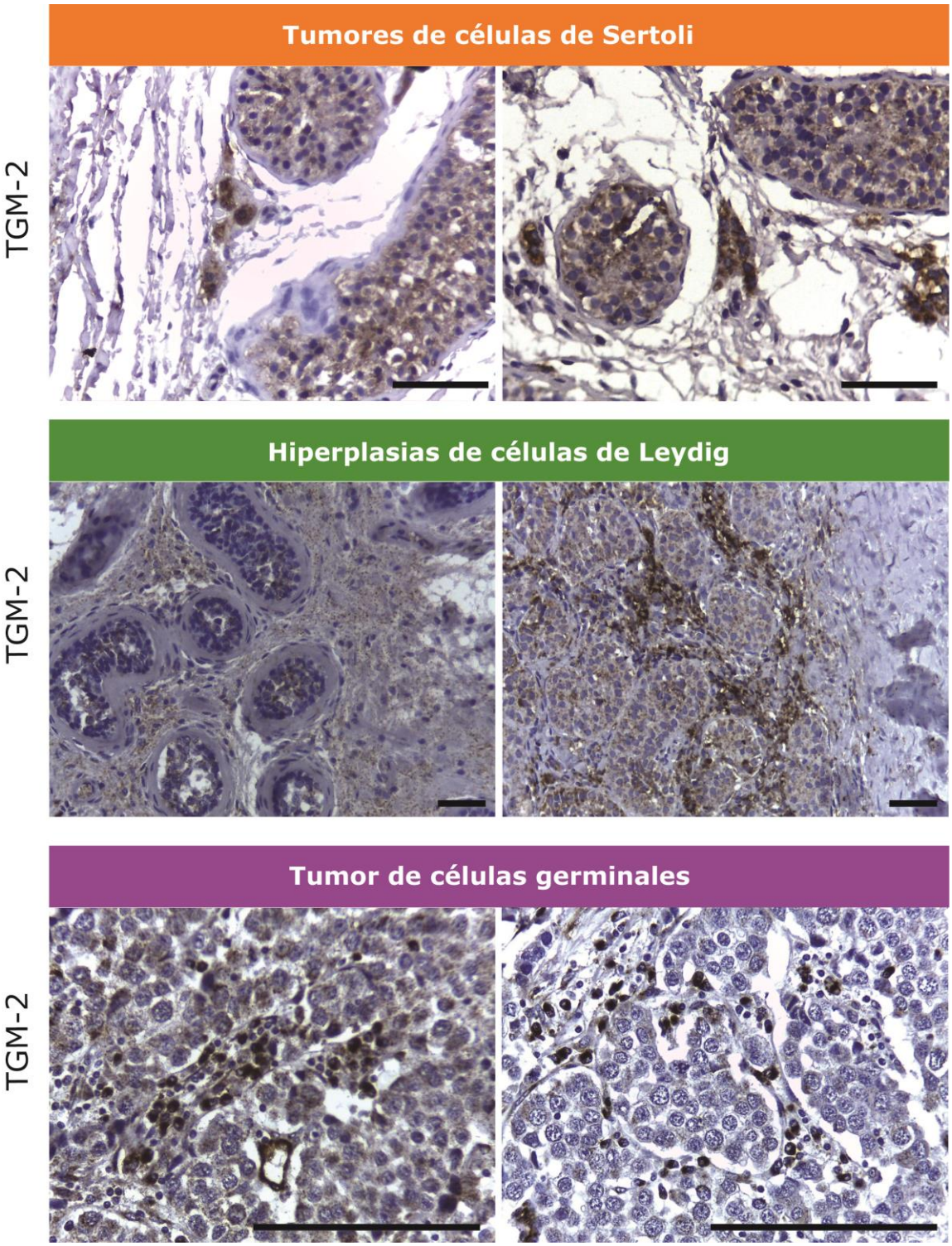


	Plasma (ng/mL)	MC MA-10	MC R2C
IC 95%	12,95 (-23,52 - 49,42)	ND	ND

Figura R5. Expresión de TGM-2 en TCL humano y en CL R2C y liberación de HA por parte de las CL MA-10 y R2C. **A.** Inmunohistoquímica realizada en cortes incluidos en parafina de 7 µm de ancho para evaluar la expresión de TGM-2 en paciente con TCL (P4) *vs.* paciente control del mismo período de desarrollo gonadal (G3). La barra negra indica 50 µM. **B.** CL R2C fueron incubadas durante 24 h en medio completo, tratadas según indica la figura y procesadas para extracción de ARN y posterior determinación de los niveles de ARNm por q-PCR. Los valores obtenidos de la normalización respecto a la expresión de GAPDH se expresan definiendo el control no tratado como 1. **C.** Liberación de HA al medio extracelular. Utilizando un kit comercial para la detección de HA se dosaron los niveles plasmáticos en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad y en medios de cultivo condicionados por las CL MA-10 y R2C. ND hace referencia a valores de absorbancia obtenidos por fuera del rango de detección del kit. IC: Intervalo de confianza. MC: medio condicionado.

Al igual que describimos para HDC, extendimos el estudio de TGM-2 a otras patologías testiculares presentes en pacientes pediátricos. Se observó alta expresión en las CL asociadas al tumor de Sertoli y moderada expresión en el tumor propiamente

dicho. En cuanto a la expresión en hiperplasias de CL, se observó alta expresión en los dos pacientes analizados, particularmente en las CL. Finalmente, se observó alta expresión en células infiltrantes linfocitarias en tumores de células germinales (**Figura R6**).



(Página anterior) Figura R6. Expresión de TGM-2 en tumores de células de Sertoli, hiperplasias de células de Leydig y tumores de células germinales. IHQ realizadas en cortes de testículos pediátricos humanos utilizando anticuerpo específico anti-TGM-2. Contratinción realizada con hematoxilina. La barra negra representa 50 µm. n = 2 para cada patología.

1.3. Inhibición de la síntesis de HA como estrategia para disminuir el crecimiento de las CL tumorales.

En base a los resultados de la sección anterior en donde pudimos corroborar el efecto de la HA como factor de crecimiento en los modelos experimentales empleados, procedimos a inhibir su síntesis. HDC ha sido descripta como la única enzima responsable de la síntesis de HA en mamíferos (Moya-García y col, 2004). Utilizamos entonces α-metil-DL-histidina dihidrocloruro (α-MHD), de origen sintético, y galato de epigalocatequina (EGCG), de origen natural, como estrategia para inhibir farmacológicamente la producción de HA (Francis y col, 2011; Rodriguez-Caso y col, 2003).

En nuestro laboratorio ya habíamos reportado que el EGCG es capaz de inhibir la proliferación de las CL MA-10 de forma concentración-dependiente (Pagotto y col, 2012). En este caso, observamos que el α-MHD también es efectivo (**Figura R7, A**). Sumado a esto, ambos inhibidores fueron capaces de disminuir la proliferación de las CL R2C, también de forma concentración-dependiente (**Figura R7, B**). Dado que el tratamiento de rutina en la clínica para los TCL malignos son los compuestos derivados de platino (Bokemeyer y col, 1993; Chi y col, 2011), decidimos combinar ambos inhibidores con CP, para evaluar una posible potenciación del efecto del CP solo sobre la proliferación de las CL tumorales. La elección de CP en particular recayó en la evidencia publicada por diversos grupos acerca de una menor toxicidad a nivel sistémico que otros compuestos también derivados de platino, como por ejemplo el cisplatino, y de una eficacia comparable (Azouri y col, 1989; Lokich y col, 1998; De Castria y col, 2013). En nuestro

caso, no se observaron efectos aditivos ni sinérgicos *in vitro* para las combinaciones efectivas de los inhibidores de HDC con CP en la concentración utilizada (**Figura R7, C**).

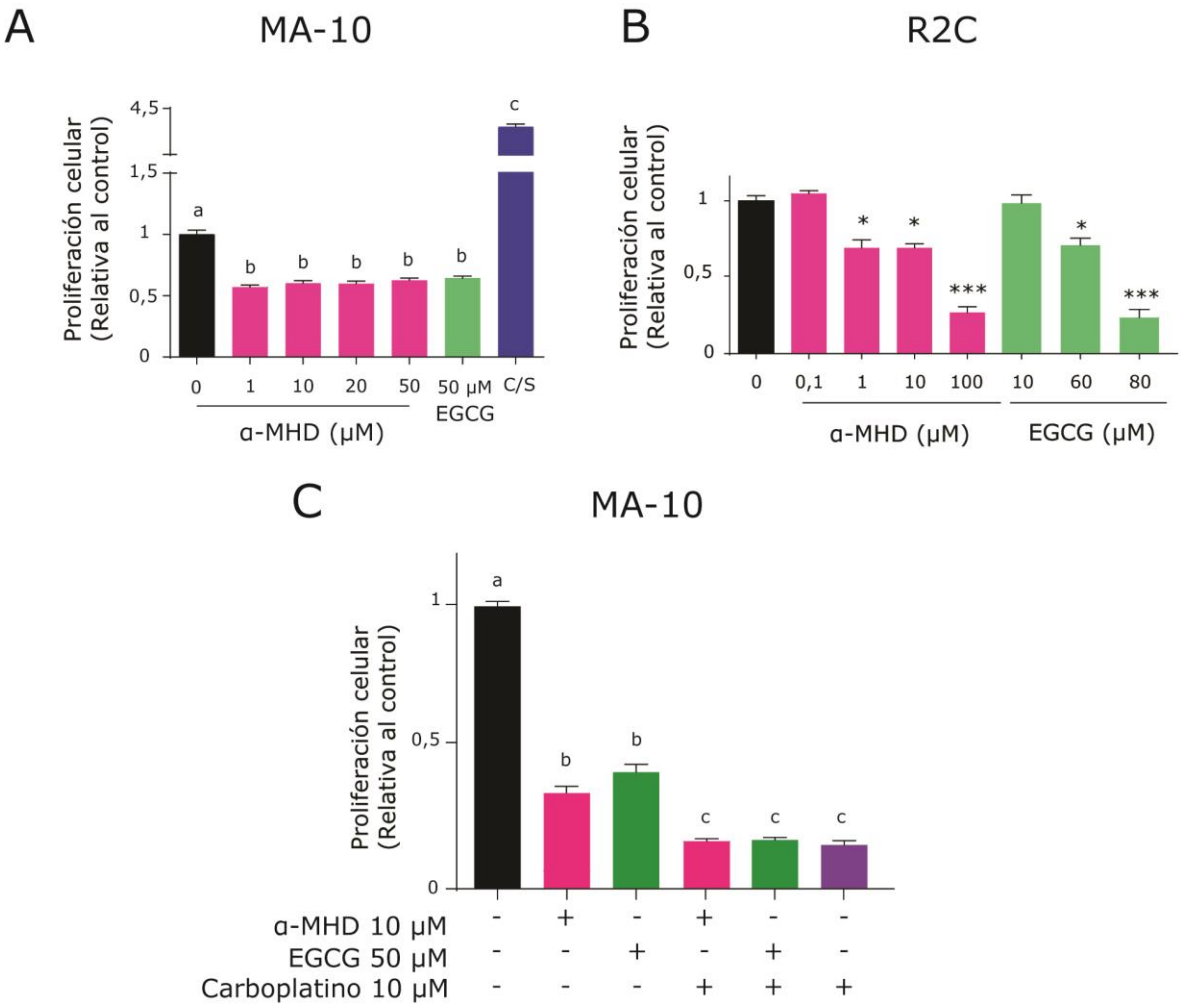


Figura R7. Inhibición de HDC en CL tumorales MA-10 y R2C. A. Las CL MA-10 fueron deprivadas de suero durante 24 h y luego durante 48 h fueron estimuladas con concentraciones crecientes de α-MHD o EGCG 50 μM en medio libre de suero, para evaluar proliferación celular por medio del método colorimétrico de WST-1. Como control de que las células no fueron afectadas por el hambreo, se las incubó durante 48 h con medio completo (C/S) para evaluar su recuperación. **B.** Las CL R2C fueron incubadas durante 48 h con α-MHD o EGCG en concentraciones crecientes en medio completo para luego evaluar proliferación celular como se especificó en A. **C.** Las CL MA-10 fueron crecidas del mismo modo que en A y tratadas con la combinación de α-MHD 10 μM o EGCG 50 μM con carboplatino 10 μM. Las barras de error representan la media ± EE. Diferentes letras representan diferencias entre grupos con un p valor menor a 0,001. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, contrastados través de ANOVA de una vía.

1.4. Modulación negativa de la síntesis de esteroides utilizando inhibidores de HDC.

En los tumores endócrinos, una característica principal es la secreción desmedida de esteroides a circulación. Como se ha descripto en la introducción, si bien la mayoría de los TLC resultan benignos, existen múltiples patologías asociadas a la desregulación endócrina que traen aparejada estos tumores. Teniendo en cuenta esto, evaluamos el efecto de la inhibición de HDC sobre la síntesis de esteroides *in vitro*. Tal como se indicó en la Introducción, las CL MA-10 poseen una deficiencia en la enzima 17α-hydroxilasa/C17–20 liasa, por lo cual producen progesterona como esteroide mayoritario, en lugar de testosterona (Ascoli M, 1981). En este modelo, tanto en presencia de α-MHD como de EGCG, se observó una disminución de la síntesis y secreción de progesterona al medio de cultivo (**Figura R8, A**). Debido a que las MA-10 sólo sintetizan esteroides cuando son estimuladas por hCG/LH o análogos permeables del segundo mensajero AMPc, todo el experimento se llevó a cabo en condiciones estimuladas por db-AMPc. En el caso de las CL R2C, el esteroide mayoritario es un estrógeno debido a que presentan sobreexpresión de CYP19, por ende la testosterona producida por la CL es aromatizada a estradiol. Por otro lado, son independientes de la estimulación de hCG/LH o AMPc para sintetizar esteroides; poseen esteroidogénesis constitutiva debido a que no expresan el modulador DAX-1 (Jo, 2004). Como resultado de estos ensayos, pudimos observar que en estas células, la inhibición de HDC disminuyó los niveles de progesterona y estradiol (**Figura R8, B**), y además disminuyó la expresión del mensajero de CYP19/CYP19 (**Figura R8, C**). No observamos diferencias respecto al control al evaluar el posible efecto directo de ambos inhibidores sobre la actividad de CYP19 (**Figura R8, D**). Estos resultados indican que la HA estaría involucrada en la modulación de la esteroidogénesis al menos río arriba de la síntesis de progesterona, sin afectar la actividad de CYP19.

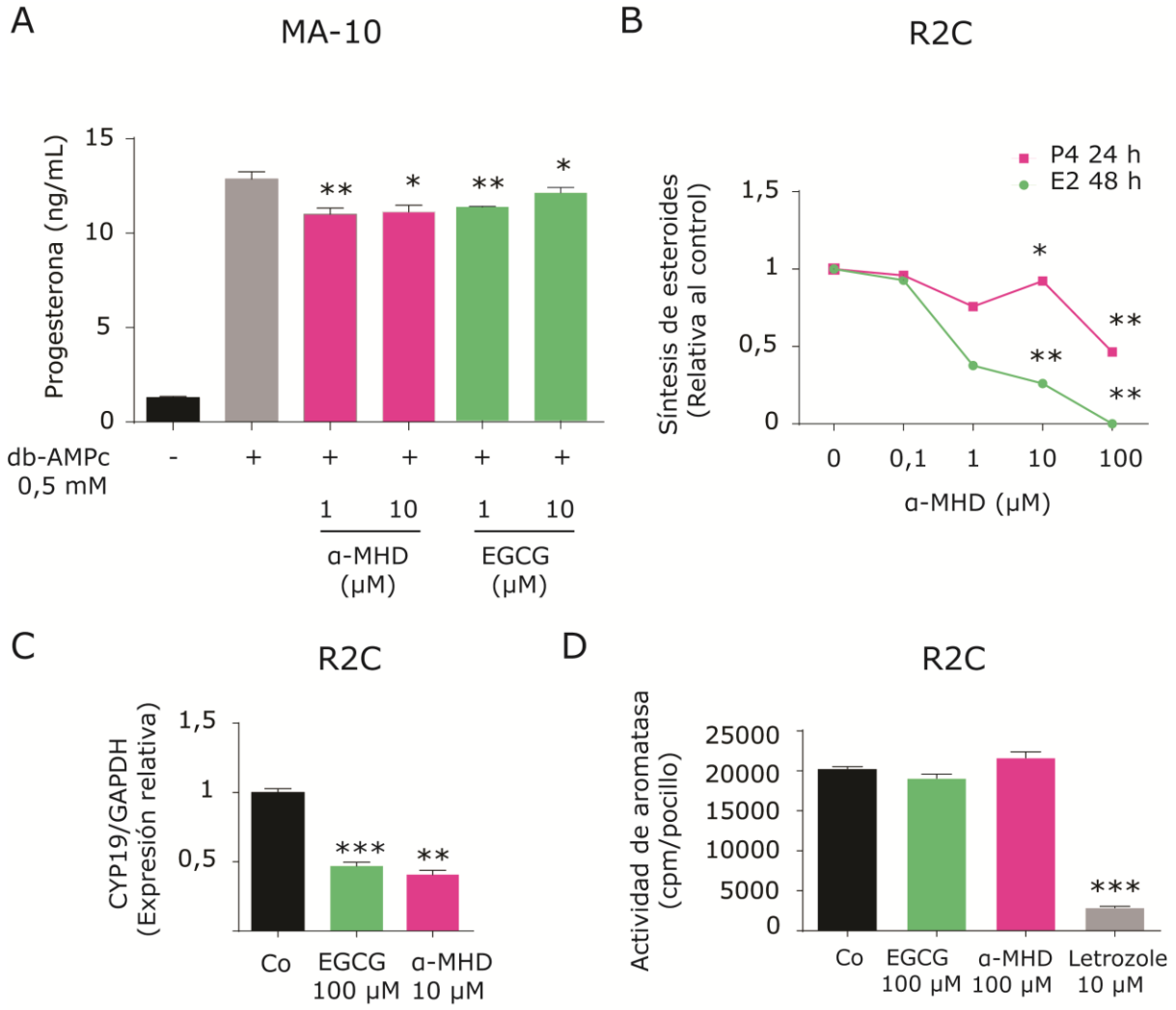


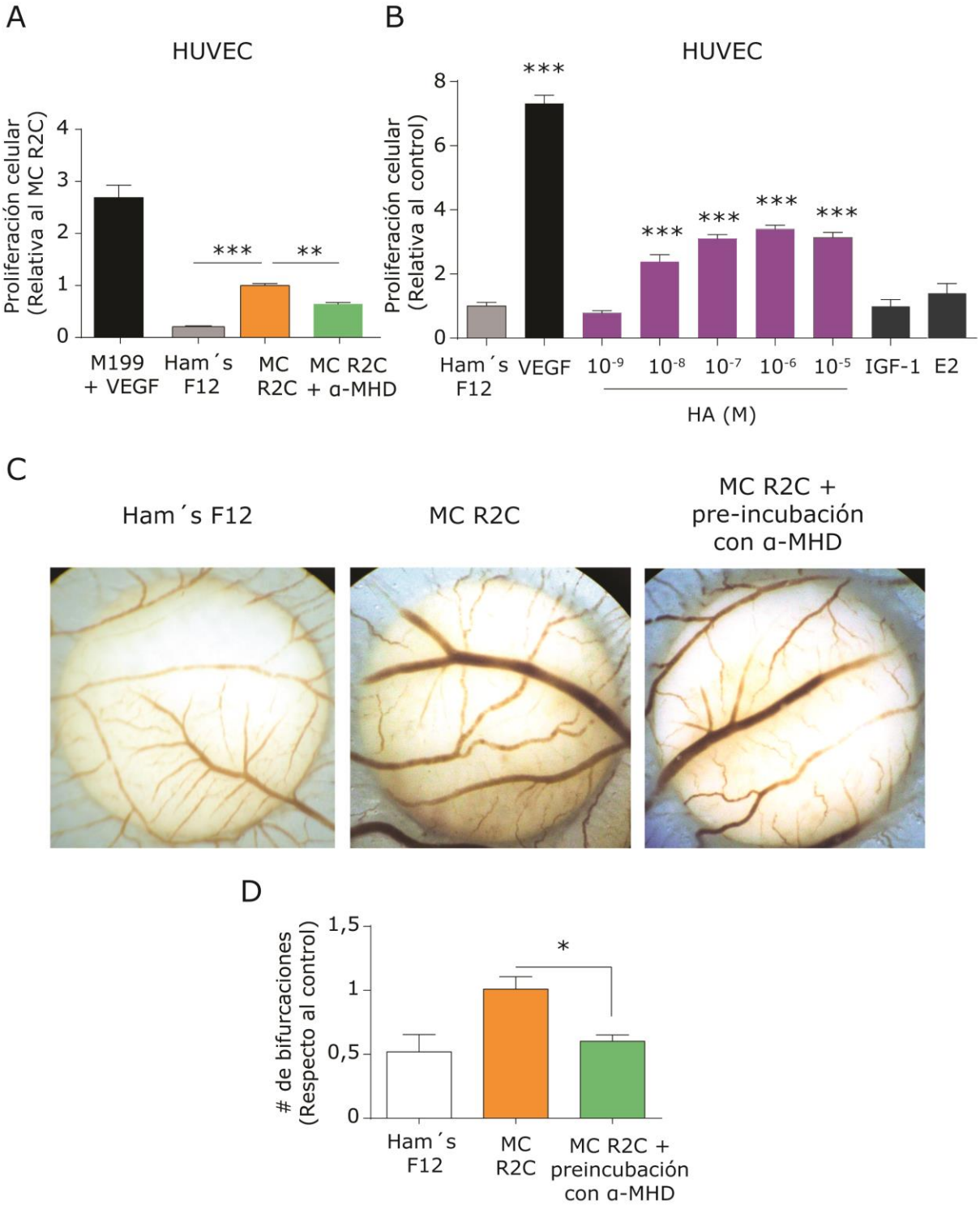
Figura R8. Disminución de la esteroidogénesis en CL tumorales tras el tratamiento con inhibidores de HDC. A. CL MA-10 fueron deprivadas de suero durante 24 h y tratadas con α-MHD o EGCG (1 – 10 μM) durante 5 h para evaluar esteroidogénesis aguda en los sobrenadantes. **B.** CL R2C fueron estimuladas durante 24 y 48 h con concentraciones crecientes de α-MHD para evaluar la síntesis de progesterona y de estradiol, respectivamente. **C.** CL R2C fueron tratadas durante 48 h y procesadas para la extracción de ARN para realizar una RT-qPCR en donde fueron evaluados los niveles del mensajero de CYP19. Como gen de referencia se utilizó GAPDH para relativizar. **D.** CL R2C fueron tratadas durante 43 h con EGCG y α-MHD (100 μM). Durante las últimas 4 h de tratamiento, para completar 48 h, fueron incubadas en presencia de [^{3}H]-androstenediona para ser utilizada como sustrato aromatizable y así poder cuantificar la actividad de CYP19 en función de la radiactividad obtenida (Ver Materiales y Métodos). Se utilizó Letrozole como control positivo debido a que inhibe específicamente a CYP19. Las barras de error representan la media ± EE. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, contrastados través de ANOVA de una vía.

1.5. Inhibición de la angiogénesis *in vitro* como estrategia para detener el crecimiento tumoral

La angiogénesis es considerada uno de los principales pilares durante la progresión tumoral. Posee un rol clave dado que provee los nutrientes y oxígeno necesarios para las células tumorales (Maschreghi y col, 2017). Una de las principales estrategias para el control del crecimiento tumoral en varios tipos de cáncer consiste en apuntar a la modulación del crecimiento de vasos. Particularmente con referencia a las células de Leydig tumorales, se ha publicado que las MA-10 son capaces de secretar factores pro-angiogénicos al medio de cultivo, como VEGF (Kumar y col, 2011), pero poco se sabe respecto al potencial pro-angiogénico de las CL R2C. Utilizando la línea celular HUVEC pudimos observar que los medios condicionados (MC) por las R2C poseen factores pro-angiogénicos capaces de estimular su proliferación (**Figura R9, A**), al igual que describimos para los medios condicionados por los tumores de los pacientes (**figura R2**). Más aún, pudimos observar que si las células R2C son tratadas con el inhibidor sintético α-MHD, el efecto de los medios condicionados sobre las HUVEC se revierte. A continuación, a fin de evaluar si el aumento de la proliferación de las HUVEC se debía la presencia de IGF-1 y E2 en los MC por las R2C, se las estimuló directamente con estos factores (**Figura R9, B**). Al menos en los tiempos de este experimento, ni el IGF-1 ni el E2 aumentaron la proliferación de las HUVEC. Adicionalmente, se estimuló a las HUVEC con concentraciones crecientes de HA, y en este caso se observó un aumento de la proliferación celular (**Figura R9, B**), lo cual indica que la HA podría formar parte del conjunto de señales pro-angiogénicas liberadas al medio por las CL tumorales.

Para complementar los resultados observados *in vitro*, estudiamos la angiogénesis *in vivo* mediante el análisis de la vasculatura de la membrana corioalantoidea de codorniz. Para ello, obtuvimos MC por las CL R2C tratadas o no con el inhibidor α-MHD. Estos medios fueron utilizados para incubar embriones de codorniz colocados en placas de 6 pocillos. Cuantificando el número de bifurcaciones por área

observamos que el MC por las R2C fue capaz de aumentar la cantidad de vasos sanguíneos, mientras que la incubación de las R2C con α-MHD resultó en una reversión de ese efecto (**Figura R9, C y D**).



(Página anterior) Figura R9. Modulación de la angiogénesis mediada por las CL R2C. A. Las células R2C fueron incubadas durante 48 h con medio completo con y sin α-MHD y al finalizar se recuperaron los medios condicionados. Estos medios se utilizaron para incubar HUVEC durante 48 h, siendo las últimas 24 h en presencia de [^{3}H]-timidina. Como control positivo se utilizó M199 + VEGF 1 ng/mL y como control negativo se utilizó Ham´s F12 completo sin haber estado en contacto con las R2C. La pre-incubación de las R2C se realizó con α-MHD 10 μM. **B.** Se realizó el mismo procedimiento que en A para evaluar incorporación de [^{3}H]-Timidina, pero en este caso utilizando M199 en todos los casos con concentraciones crecientes de HA para evaluar su efecto independiente sobre la proliferación de las HUVEC. La concentración de IGF-1 fue de 100 ng/mL. Las barras de error representan la media ± EE. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, contrastados través de ANOVA de una vía.

Conclusiones parciales del Capítulo 1.

- Teniendo en cuenta que las muestras de pacientes con TCL presentaron alta expresión de HDC a diferencia de los controles normales, la HA cumpliría un rol importante en el desarrollo de TCL, al igual que se ha reportado para otros tipos de tumores.
- La HA es capaz de estimular la proliferación de las CL tumorales de forma concentración-dependiente, y la inhibición de su síntesis permite revertir dicho efecto.
- La inhibición de HDC también disminuye la síntesis de esteroides sintetizados por las CL tumorales *in vitro*.
- La HA es capaz de promover la proliferación del endotelio vascular, y la inhibición de sus síntesis en las CL atenúa su capacidad proangiogénica.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la HA ejerce su función promotora del establecimiento de los TCL a través de diversos mecanismos, actuando como factor de crecimiento de las células tumorales en sí mismas, y también estimulando la proliferación de las células del endotelio vascular, por lo que la inhibición de su síntesis podría ser una buena estrategia para controlar la progresión de los TCL.

Capítulo 2.

De la histamina y su rol como factor de crecimiento en células de Leydig tumorales *in vivo*.

Objetivos específicos de este capítulo

- Establecer dos modelos murinos fenotípicamente distintos para el estudio pre-clínico de Leydigiomas.
- Evaluar el crecimiento tumoral y la liberación de esteroides a circulación, en ambos modelos, en presencia de inhibidores específicos de HDC, solos o combinados con quimioterapia.
- Evaluar un posible efecto nocivo sobre el estado general de los animales en presencia de los tratamientos.
- Caracterizar alguno de los posibles mecanismos de acción de cada tratamiento a través del análisis inmunohistoquímico de los tumores.

2.0. Establecimiento de modelos pre-clínicos de Leydigioma.

Si bien existe un reporte sobre la diferenciación de células madre pluripotentes humanas hacia CL productoras de andrógenos, que podrían ser inmortalizadas para el estudio *in vitro* de TCL (Li y col, 2019), al día de la fecha no existen a nivel mundial líneas celulares de TCL humano y por lo tanto no se ha podido establecer un modelo no-murino para el estudio de estos tumores. Esta situación nos condujo a utilizar dos modelos pre-clínicos murinos ampliamente difundidos (Basciani y col, 2005; Sirianni y col, 2009; Chimento y col, 2013; Catalano y col, 2013). Para establecer estos modelos en el laboratorio, empleamos las dos líneas celulares presentadas en la Introducción y que fueron objeto de estudio en el capítulo 1: MA-10 y R2C. La línea de CL de ratón MA-10 fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Mario Ascoli (Ascoli M, 1981; Lacroix y col, 1979), tal como se indicó en Materiales y Métodos. En este trabajo, las inyectamos en ratones macho de cinco semanas de edad provenientes de la cruza BALB/c x C57BL/6 (F1), que poseen el mismo fondo genético que las CL MA-10, por lo tanto no rechazan su inoculación. Por otro lado, las CL R2C fueron obtenidas a partir de un tumor espontáneo generado en ratas Fischer 344 adultas (Weisburger y col, 2002) y para que las células no

fuesen rechazadas por los ratones fue necesario elegir un modelo poco inmunocompetente, los ratones Swiss$^{Nu/Nu}$.

Luego de la inoculación subcutánea (**Figura R10, A**) de ambas líneas celulares, obtuvimos tumores palpables al cabo de 12 a 14 días. Para verificar que los modelos se estaban comportando *in vivo* de igual manera que lo hacían *in vitro*, decidimos determinar los niveles de esteroides circulantes luego de 15 días de establecidos los tumores. Los ratones Swiss$^{Nu/Nu}$ presentaron una gran desregulación endócrina producto de la presencia del tumor, evidenciada por altos niveles de testosterona y estradiol circulantes, a diferencia de los ratones de la misma cepa sin tumor (**Figura R10, B**). En el caso de los ratones F1, portadores de tumores originados a partir de las CL MA-10, observamos un mayor nivel de progesterona circulante respecto al control sin tumor, sin cambios en la testosterona. Este tumor no modificó los niveles circulantes de estradiol (**Figura R10, C**). Estos datos son consistentes con la producción de progesterona como esteroide mayoritario en las CL MA-10. Dada la importancia de la proteina StAR para el proceso esteroidogénico, estudiamos por inmunohistoquímica su expresión en los tumores. Observamos una intensa marcación en los TCL obtenidos a partir de las CL R2C (TCL R2C) y moderada expresión en los ratones con TCL provenientes de MA-10 (TCL MA-10). En paralelo, considerando el papel clave del estradiol como factor de crecimiento autocrino en los TCL R2C, estudiamos la expresión de CYP19 y RE-β (receptor de estrógenos β). Observamos alta expresión de ambos marcadores (**Figura R10, D**).

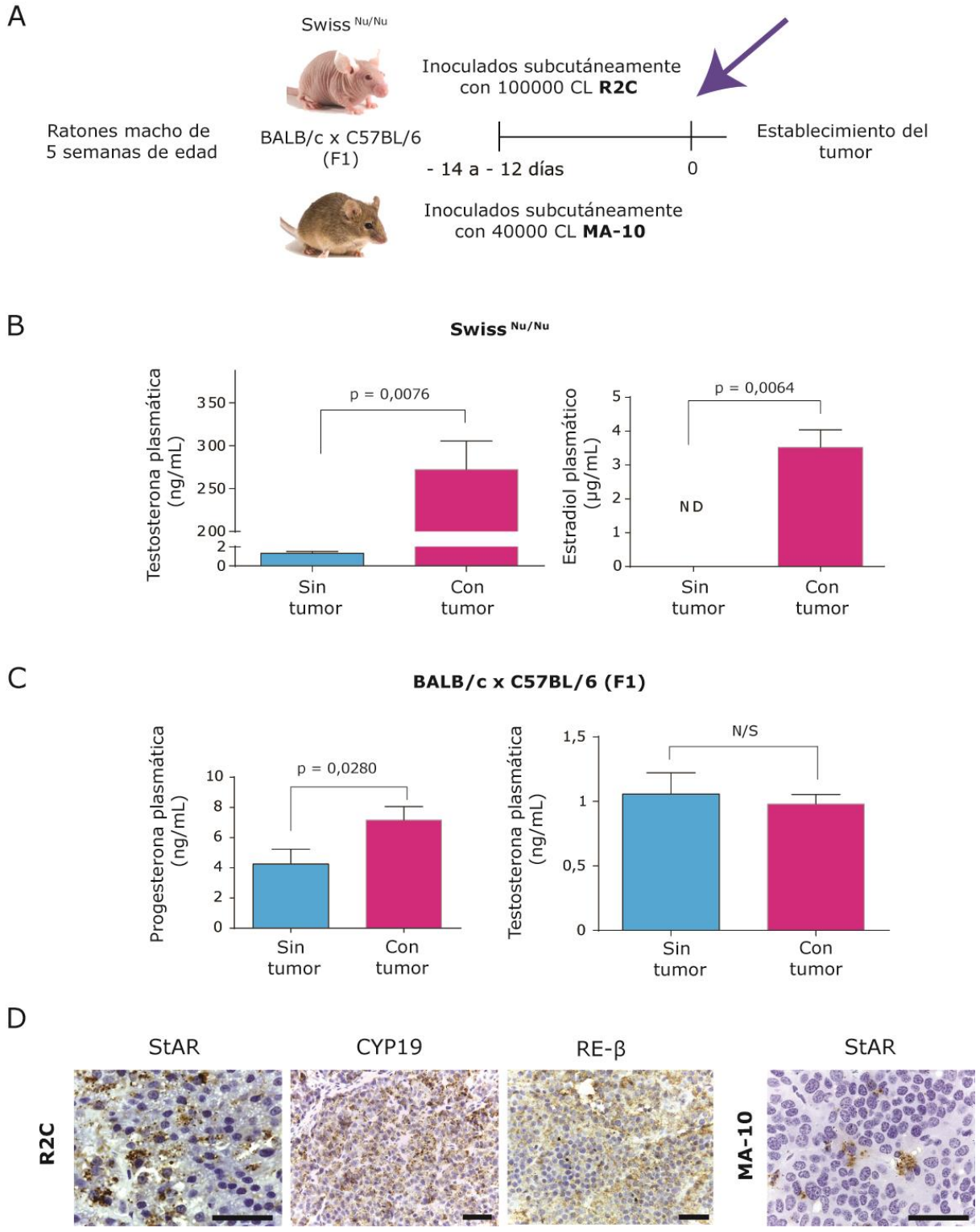


Figura R10. Establecimiento de los modelos *in vivo*. A. Las CL R2C desarrolladas en rata se inocularon en ratones Swiss $^{Nu/Nu}$. Se inyectaron 100000 células por flanco y al cabo de 14 días en promedio se establecieron los tumores. Las CL MA-10 desarrolladas en ratones C57BL/6 fueron inoculadas en ratones F1 debido a su apto fondo genético para no rechazarlas. Se inocularon 40000 células por flanco y al cabo de 12 días en promedio se establecieron los tumores. **B.** Utilizando el método de quimioluminicencia para progesterona, RIA para testosterona y kits de

ELISA para estradiol, se dosaron los esteroides plasmáticos en ratones sin tumor y en ratones con tumor luego de 15 días de establecidos, para verificar los cambios en la concentración de esteroides circulantes. Se muestra la concentración de testosterona y estradiol, respectivamente, en los ratones con tumores de R2C. **C.** Del mismo modo que en B, en ratones portadores de tumores de MA-10 se dosaron progesterona y testosterona, respectivamente. Se detalla el p valor para cada contraste realizado con t de Student. Las barras de error representan la media ± EE para cada grupo. N/S hace referencia a diferencias no significativas. **D.** Una vez establecidos los tumores en cada modelo se dejaron crecer durante 15 días. Se extrajeron y se procesaron para inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos para StAR, CYP19 y ER-β. Como controles negativos se utilizaron sueros normales de conejo, cabra y ratón, respectivamente. La barra negra representa 50 µm.

Ambos modelos presentaron tumores de crecimiento muy rápido (con un tiempo de duplicación de aproximadamente 4 días) y se pudo observar un vaso de gran calibre irrigando directamente al tumor (**Figura R11**) en todos los ratones inyectados. Esta alta irrigación coincide con una característica inherente a las glándulas endócrinas: la capacidad de hacer llegar a la circulación las hormonas sintetizadas. En este modelo es evidente que la gran irrigación tumoral es directamente proporcional a los altos niveles de esteroides plasmáticos.

Figura R11. Fotografía representativa de los dos modelos pre-clínicos. Izquierda: Ratón F1 con tumor de MA-10. Derecha: Ratón Swiss$^{Nu/Nu}$ con tumor de R2C. Nótese que ambos tumores están irrigados por un vaso de gran calibre.

Habiendo establecido por primera vez en nuestro laboratorio los dos modelos, comenzamos con los ensayos para evaluar la efectividad de los tratamientos según se especifica en el esquema de inyección de la **figura R12**.

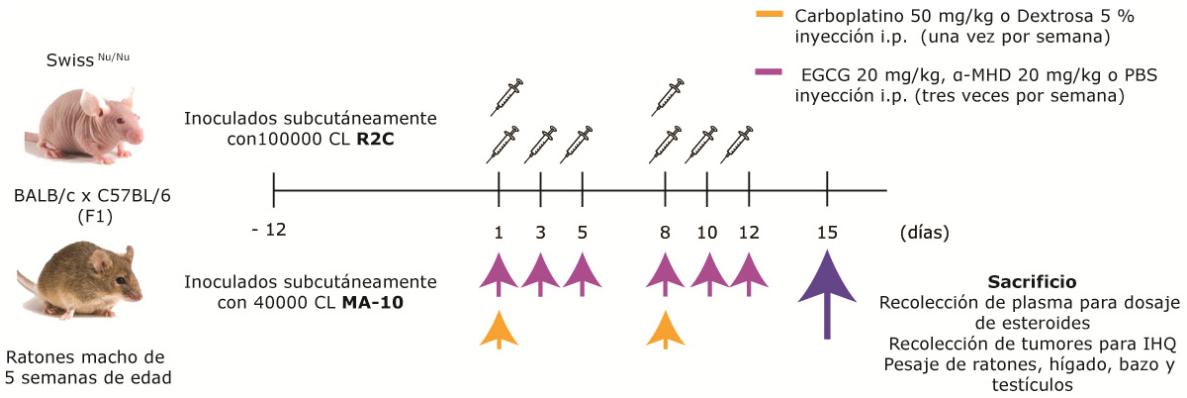


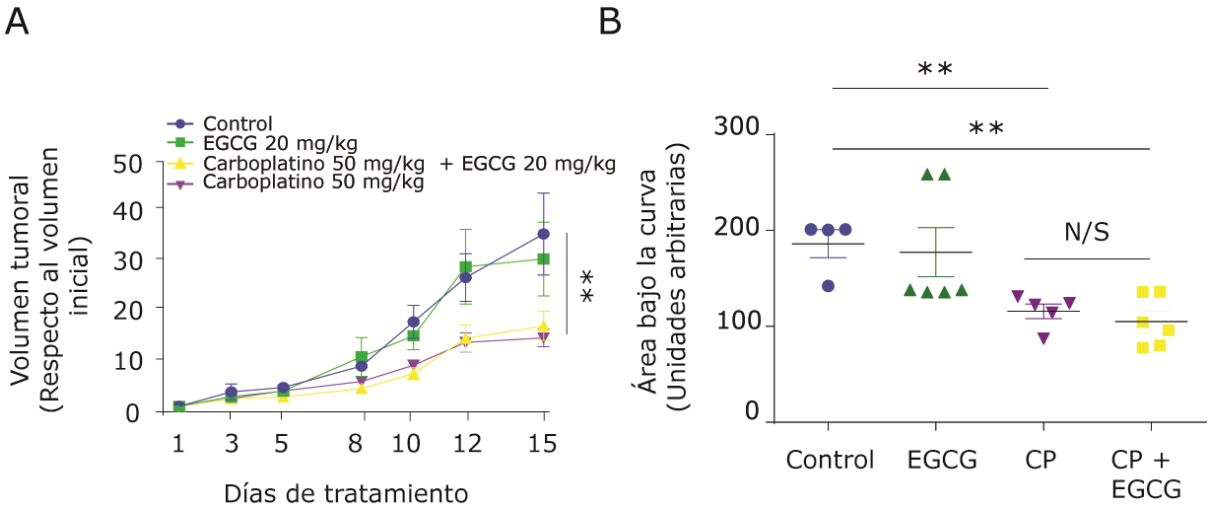
Figura R12. Esquema de inyección de los tratamientos en los modelos de Leydigioma murinos. Dextrosa 5% fue el vehículo para el carboplatino, y PBS para EGCG y α-MHD. i.p.: intraperitoneal. Las flechas coinciden con el color de referencia de cada compuesto e indican los días de inyección. Con este esquema obtuvimos seis grupos experimentales, a saber: 1) control, 2) α-MHD, 3) EGCG, 4) Carboplatino, 5) Carboplatino + α-MHD, 6) Carboplatino + EGCG. Nota: este esquema también se efectuó para la concentración de α-MHD 40 mg/kg.

Capítulo 2. Sección 1. Experimentos *in vivo* en TCL establecidos a partir de CL MA-10.

2.1.1. Efecto del tratamiento intraperitoneal con EGCG en combinación con CP en TCL MA-10.

Existen reportes que señalan al cisplatino como uno de los compuestos capaces de disminuir el tamaño de los TCL, pero poco se sabe respecto a la acción del CP en este tipo de tumores. En este modelo observamos que la inyección semanal de 50 mg/kg de CP durante el término de dos semanas fue capaz de disminuir el crecimiento tumoral de forma significativa, en aproximadamente un 38% respecto al control, y que este efecto comenzó el día 10 de tratamiento (**Figura R13, A**). El EGCG no tuvo efecto solo ni en combinación con CP durante los tiempos de tratamiento. Lo observado en la Figura 9A se

condice con el análisis del área bajo la curva para cada uno de los tumores inoculados (**Figura R13, B**). Sin embargo, cuando se analizó el tiempo de duplicación de los tumores, el CP fue capaz de enlentecerlo solamente un 2,5%, mientras que la combinación de CP con EGCG alcanzó un 30% de aumento (en días de duplicación) respecto al control (**Figura R13, C**). Esto quiere decir que, mientras que los tumores control requerían de 4,033 días para duplicar su tamaño, con el tratamiento combinado ese tiempo ascendió a 5,292 días, enlenteciendo así el crecimiento tumoral.



C

	Control	EGCG	CP	CP + EGCG
Tiempo de duplicación	4,033	4,295	4,107	5,292
IC 95%	(4,01 - 6,10)	(3,02 - 7,38)	(3,24 - 5,59)	(4,22 - 7,08)

Figura R13. Crecimiento tumoral de CL MA-10 en presencia de EGCG. **A.** Curva de crecimiento tumoral en tumores de MA-10 en ratones F1 obtenidas a partir de la medición de los lados del tumor con calibre digital y el cálculo de volumen para cada uno. El valor graficado resulta de su relativización al volumen inicial. Para las comparaciones se realizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas con contraste de Holm-Sidak. **B.** Análisis del área bajo la curva para la curva de crecimiento de cada tumor individualmente. El análisis de las diferencias entre grupos se realizó a través de un ANOVA de una vía con contraste de Tukey. N/S: no significativo. **, $p < 0,01$. **C.** A partir de las curvas de crecimiento se estimó si todas ajustan a la misma ecuación de crecimiento a través de una regresión no lineal. Del ajuste a distintas curvas se obtuvo el tiempo de duplicación para cada caso y el intervalo de confianza del 95% (IC).

Por otro lado, pudimos observar que los tratamientos no disminuyeron la progesterona circulante (**Figura R14, A**), y que el peso tumoral mostró la misma tendencia que en las curvas de crecimiento (**Figura R14, B**). En base a estos resultados pudimos verificar la efectividad del CP para disminuir el crecimiento tumoral en TCL MA-10. Más aún, es razonable suponer que si pudiéramos realizar experimentos más largos incluso podría llegar a verse una mejora en presencia de la combinación con EGCG.

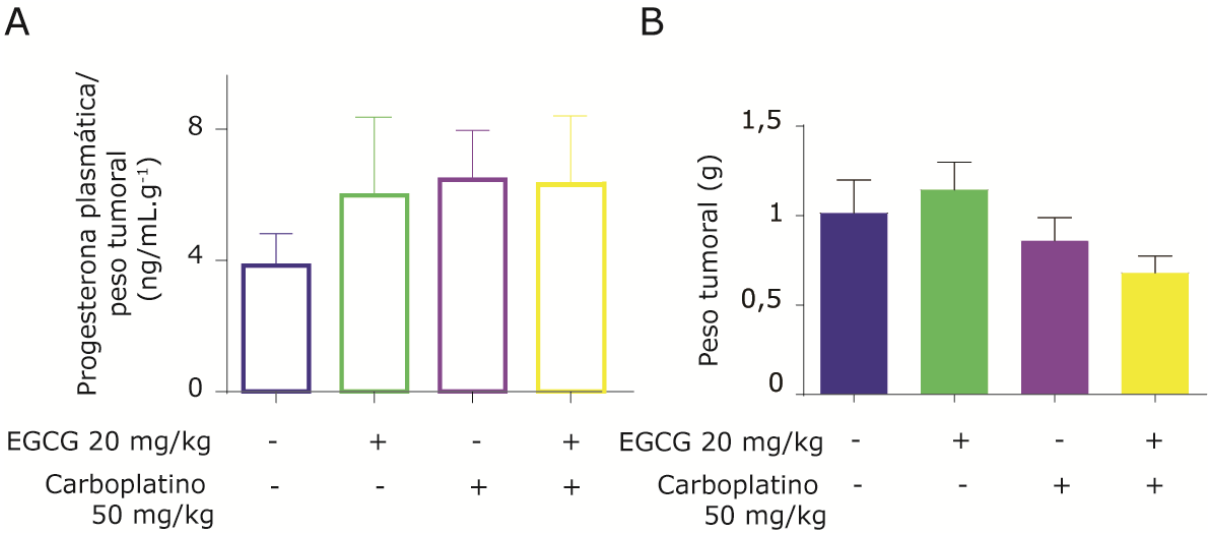


Figura R14. Progesterona plasmática y peso tumoral en ratones F1 con tumores de MA-10. Los plasmas de los ratones fueron procesados para el dosaje de progesterona por quimioluminiscencia a punto final. **A.** En el gráfico se muestran los datos relativizados al tamaño tumoral considerando que la progesterona circulante proviene principalmente del tumor. **B.** Peso de los tumores a punto final.

2.1.2. Efecto del tratamiento con inyecciones intra-tumorales de EGCG en combinación con CP en TCL MA-10.

La anatomía testicular ofrece un fácil acceso a los tumores localizados en dicho órgano y por lo tanto provee una alternativa terapéutica menos invasiva: inyecciones intratumorales, lo cual resulta prometedor dado que permitiría evitar tratamientos a nivel sistémico. A su vez, ya existen múltiples evidencias de esquemas de administración del tipo intratumoral, particularmente vectores virales para terapia génica (Zeyaullah y

col, 2012) e inyecciones de células para terapia inmune (Finkelstein y col, 2012). Sumado a esto, se han publicado trabajos con inyecciones intratumorales de esporas (Roberts y col, 2014), oligonucleótidos inmunoestimulantes (Shirota y col, 2011) e incluso copolímeros (Lammers y col, 2006). En este contexto, decidimos inyectar de forma intratumoral el compuesto natural EGCG en concentraciones análogas a las que resultaron eficientes en los experimentos *in vitro*. El esquema de administración en este caso fue diario, y las inyecciones se aplicaron en el centro del tumor. El EGCG se administró solo o en combinación con una inyección semanal intraperitoneal de CP 50 mg/kg (**Figura R15**).

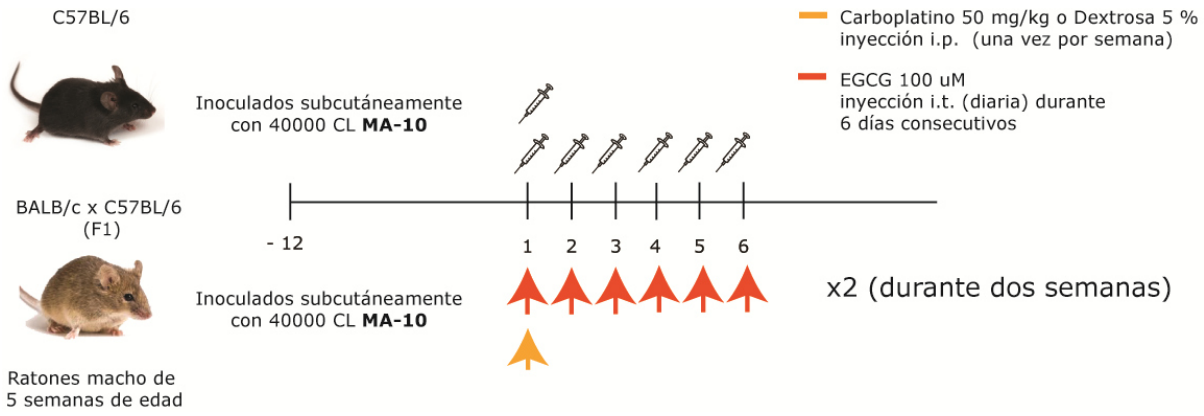


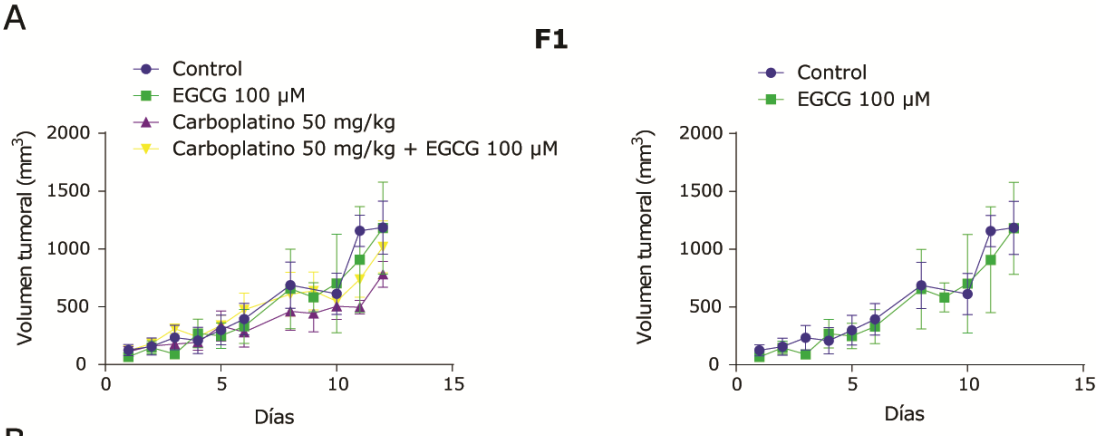
Figura R15. Esquema de administración para los tratamientos intratumorales con EGCG. El modelo elegido fue el de TCL MA-10 en ratones F1 y en ratones C57BL/6. El tratamiento comenzó al momento en el que se establecieron tumores de aproximadamente 50 mm^3. Las inyecciones intraperitoneales se administraron en un volumen final de 100 µl y las inyecciones intratumorales en un volumen final de 20 µl.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento en ninguna de las dos cepas inoculadas con MA-10 al analizarlas con un ANOVA de dos vías (**Figura R16, A y C**), cuando se analizó el tiempo de duplicación de cada curva se registraron los siguientes efectos. En el caso de los ratones F1, observamos que los tratamientos con CP i.p. fueron capaces de aumentar el tiempo de

duplicación, es decir, de enlentecer el crecimiento tumoral, pero la presencia de las inyecciones de EGCG i.t. no generaron ninguna diferencia (**Figura R16, B**). En el caso de los ratones C57BL/6, todos los tratamientos, incluso el EGCG i.t. fueron capaces de aumentar el tiempo de duplicación de los tumores (**Figura R16, D**). No se observaron diferencias en los índices corporales para ninguno de los tratamientos ni en el peso de los ratones a punto final (datos no mostrados).

Cabe destacar que a pesar de haber usado agujas de muy bajo calibre (G30) y bajos volúmenes de inyección, la manipulación intratumoral fue muy agresiva para la integridad de los tumores, generando áreas ulceradas, necrosis y ruptura a gran escala de los mismos. Esto resultó en una complicación para realizar las mediciones dada la deformidad de los tumores, que se evidenció en una gran dispersión de los tamaños tumorales (**Figura R16, A, derecha**). Este esquema de administración no resultó eficiente para el tratamiento de TCL MA-10, por el contrario, fue necesario detenerlo con anticipación debido al daño acumulado paulatinamente en cada tumor inyectado; por lo tanto fue descartado para posteriores experimentos.

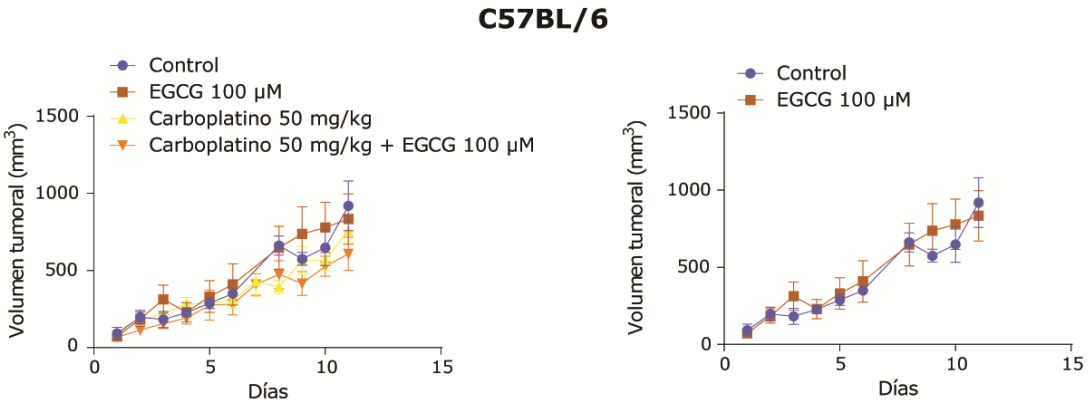
A



B

	Control	EGCG i.t.	CP	CP + EGCG i.t.
Tiempo de duplicación	3,53	3,31	4,76	4,74
IC 95%	(2,65 - 5,29)	(2,22 - 6,44)	(3,42 - 7,79)	(3,59 - 7,00)

C



D

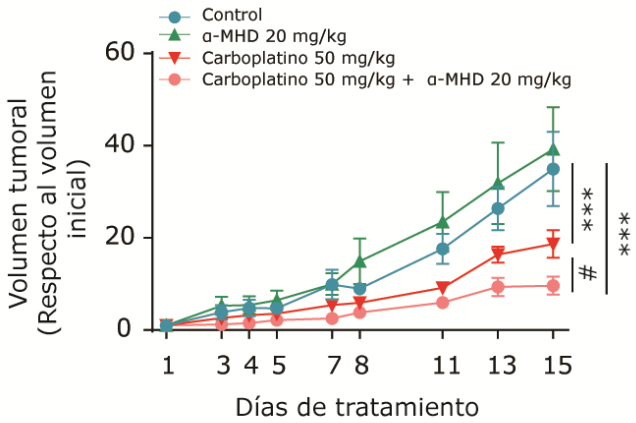
	Control	EGCG i.t.	CP	CP + EGCG i.t.
Tiempo de duplicación	3,76	4,26	4,31	4,27
IC 95%	(3,07 - 4,86)	(3,11 - 6,78)	(3,53- 5,52)	(3,33 - 5,96)

Figura R16. Curvas de crecimiento de tumores de CL MA-10 con tratamiento intratumoral combinado con CP. A. Curva de crecimiento para ratones F1 inyectados i.p. con CP, e intratumoral con EGCG 100 µM. A la derecha se discriminan las curvas control y EGCG para une mejor comparación. **B.** Tabla con los tiempos de duplicación de los tumores en ratones F1 calculados utilizando una regresión no lineal. **C.** Curva de crecimiento para ratones C57BL/6 inyectados del mismo modo que en A. A la derecha se grafica solamente el tratamiento intratumoral *vs* control. **D.** Tabla con los tiempos de duplicación tumoral para los ratones F1, calculados del mismo modo que en B. IC: intervalo de confianza.

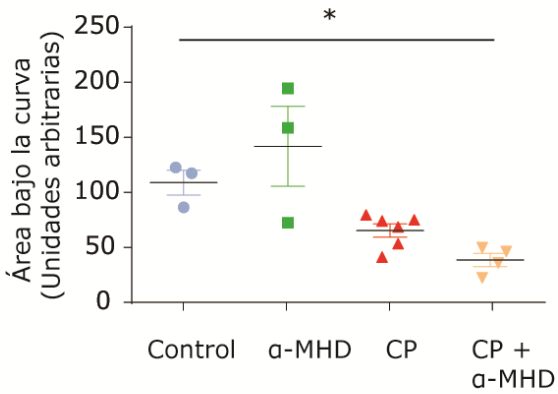
2.1.3. Efecto del tratamiento intraperitoneal con α-MHD en combinación con CP en TCL MA-10.

En otra seria de experimentos *in vivo*, se evaluó el efecto de α-MHD sobre el crecimiento de los TCL MA-10. A diferencia de lo observado con EGCG, el tratamiento con el inhibidor sintético (en una concentración de 20 mg/kg), combinado con CP, resultó ser efectivo para el tratamiento de TCL de MA-10 (**Figura R17, A**). Se obtuvieron diferencias significativas con la combinación respecto al control tanto para las curvas de crecimiento tumoral, como para el área bajo la curva y los tiempos de duplicación (**Figura 17, B y C**).

A



B



C

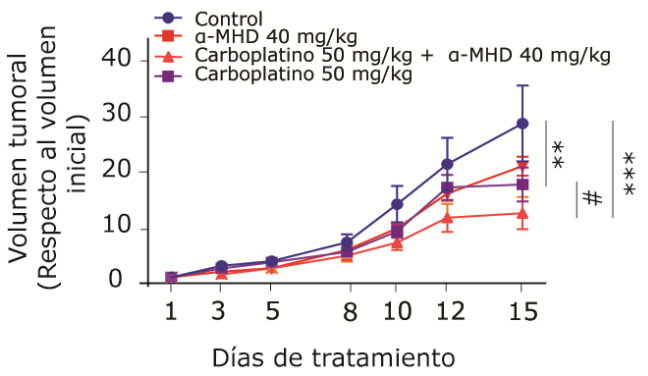
	Control	α-MHD	CP	CP + α-MHD
Tiempo de duplicación	3,68	4,26	4,27	4,45
IC 95%	(2,83 - 5,25)	(3,08 - 6,91)	(3,68 - 5,10)	(3,13- 7,06)

Figura R17. Crecimiento tumoral de CL MA-10 en presencia de α-MHD 20 mg/kg. A. Curva de crecimiento tumoral en tumores de MA-10 en ratones F1 obtenidas a partir de la medición de los lados del tumor y el cálculo de volumen para cada uno. El valor graficado resulta de su relativización al volumen inicial. Para las comparaciones se realizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas con contraste de Holm-Sidak. **B.** Análisis del área bajo la curva para la curva de crecimiento de cada tumor individualmente. El análisis de las diferencias entre grupos se realizó a través de un ANOVA de una vía con contraste de Tukey. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; respecto al control. #, $p < 0,05$, respecto a CP. **C.** A partir de las curvas de crecimiento se estimó si todas ajustan a la misma ecuación de crecimiento a través de una regresión no lineal. Del ajuste a

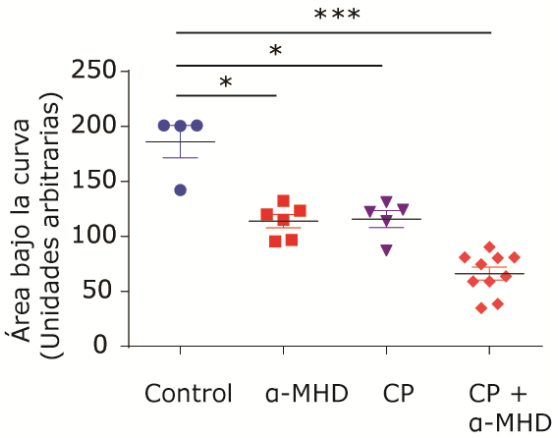
distintas curvas se obtuvo el tiempo de duplicación para cada caso y el intervalo de confianza (IC) del 95%.

Se realizó un experimento análogo para verificar el efecto de una dosis mayor de α-MHD (40 mg/kg), con el mismo esquema de administración intraperitoneal (**Figura R12**) para ambos agentes. Observamos que α-MHD en una concentración mayor a la de la figura anterior (40 mg/kg) administrado como agente único fue capaz de disminuir el crecimiento de los tumores de CL MA-10 en aproximadamente un 27% respecto al control, dando como resultado un efecto similar al CP (**Figura R18, A**). Al igual que en la figura anterior, el CP combinado con α-MHD fue más efectivo aún que CP administrado solo (57% de inhibición del crecimiento respecto al control; 30% CP + α-MHD respecto a CP). Esta combinación mostró un efecto sinérgico. Lo mismo se observó al analizar las áreas bajo la curva para cada tumor (**Figura R18, B**). En cuanto a los tiempos de duplicación para cada caso, con el tratamiento combinado fueron necesarios 5,295 días para que los tumores alcancen el doble de tamaño, a diferencia de los controles en donde solamente fueron necesarios 4,794 días (**Figura R18, C**).

A



B



C

	Control	α-MHD	CP	CP + α-MHD
Tiempo de duplicación	4,794	4,960	4,813	5,295
IC 95%	(3,78 - 6,55)	(3,86 - 6,92)	(3,82 - 6,48)	(4,35 - 6,76)

(Página anterior) Figura R18. Crecimiento tumoral de CL MA-10 en presencia de α-MHD 40 mg/kg. A. Curva de crecimiento tumoral en tumores de MA-10 en ratones F1 obtenidas a partir de la medición de los lados del tumor y el cálculo de volumen para cada uno. El valor graficado resulta de su relativización al volumen inicial. Para las comparaciones se realizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas con contraste de Holm-Sidak. **B.** Análisis del área bajo la curva para la curva de crecimiento de cada tumor individualmente. El análisis de las diferencias entre grupos se realizó a través de un ANOVA de una vía con contraste de Tukey. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; respecto al control. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$ respecto a CP. **C.** A partir de las curvas de crecimiento se estimó si todas ajustan a la misma ecuación de crecimiento a través de una regresión no lineal. Del ajuste a distintas curvas se obtuvo el tiempo de duplicación para cada caso y el intervalo de confianza (IC) del 95%.

Al menos en los tiempos del experimento, al igual que el EGCG, el α-MHD no tuvo efecto sobre la progesterona circulante (**Figura R19, A**). La tendencia que se observa en el gráfico de los pesos tumorales coincide con lo observado en las curvas de crecimiento (**Figura R19, B**).

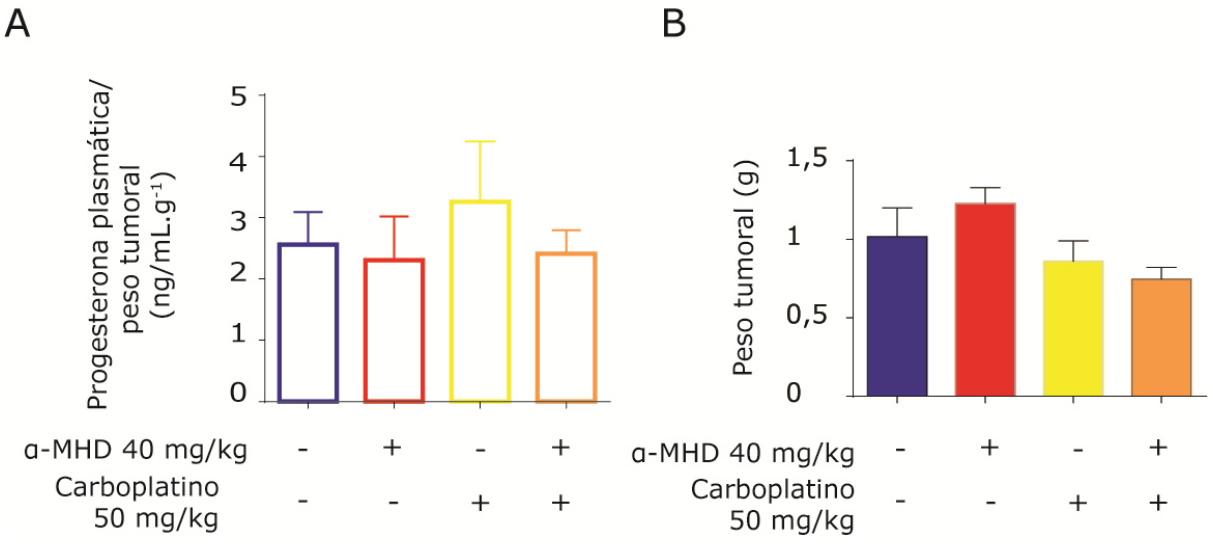


Figura R19. Progesterona plasmática y peso tumoral en ratones F1 con tumores de MA-10. A. Los plasmas de los ratones fueron procesados para el dosaje de progesterona por quimioluminiscencia a punto final. En el gráfico se muestran los datos relativizados al tamaño tumoral considerando que la progesterona circulante proviene principalmente del tumor. **B.** Peso de los tumores a punto final.

A partir del análisis de estos cuatro esquemas de administración, concluimos que en ratones con TCL de MA-10 la combinación más efectiva fue CP+ α-MHD (tanto en una dosis de 20 mg/kg como en una dosis de 40 mg/kg), con ambos agentes inyectados intraperitonealmente.

2.1.4. Análisis del efecto de los tratamientos sobre el estado general de los ratones.

Efectos secundarios a nivel fisiológico pueden ser producto de la administración de compuestos antitumorales agresivos. Para verificar que los ratones hayan mantenido un estado general normal luego de los experimentos, y que los tratamientos no hayan perjudicado considerablemente el funcionamiento de alguno de sus órganos, se realizó el pesaje de todos los ratones al inicio del tratamiento (una vez establecido el tumor) y a punto final. No observamos diferencias en este punto (**Figura R20, A**). Por otro lado, se considera que el peso del bazo refleja indirectamente la ocurrencia de una respuesta inmune que acompaña al tratamiento. Ante determinadas patologías se observa un aumento del tamaño del bazo (Overman y col, 2010; Simpson y col, 2015), particularmente en presencia de injuria hepática relacionada al tratamiento. Este efecto en el tamaño del bazo es revertido cuando el tratamiento es efectivo y/o su toxicidad no es alta. En nuestro caso, si bien no lo observamos con significancia estadística, hubo una clara tendencia a una disminución en el tamaño esplénico para los tratamientos efectivos (**Figura R20, B**), particularmente para CP y la combinación de CP con α-MHD. Por otro lado, para verificar que el hígado no estuviera siendo afectado negativamente, procedimos a pesarlo en todos los casos a punto final. Se ha demostrado que el cisplatino causa hepatitis aguda, y como consecuencia aumenta considerablemente el tamaño del hígado (Sharma y col, 2014). No observamos diferencias en cuanto al peso hepático (**Figura R20, C**) en presencia de CP o de las combinaciones con ambos

inhibidores, descartando así efectos adversos del tratamiento relacionados con este órgano. Esto se corroboró mediante la técnica de hematoxilina y eosina en cortes de hígado a punto final para todos los tratamientos. En ningún caso se observó modificación a nivel histológico (datos no mostrados).

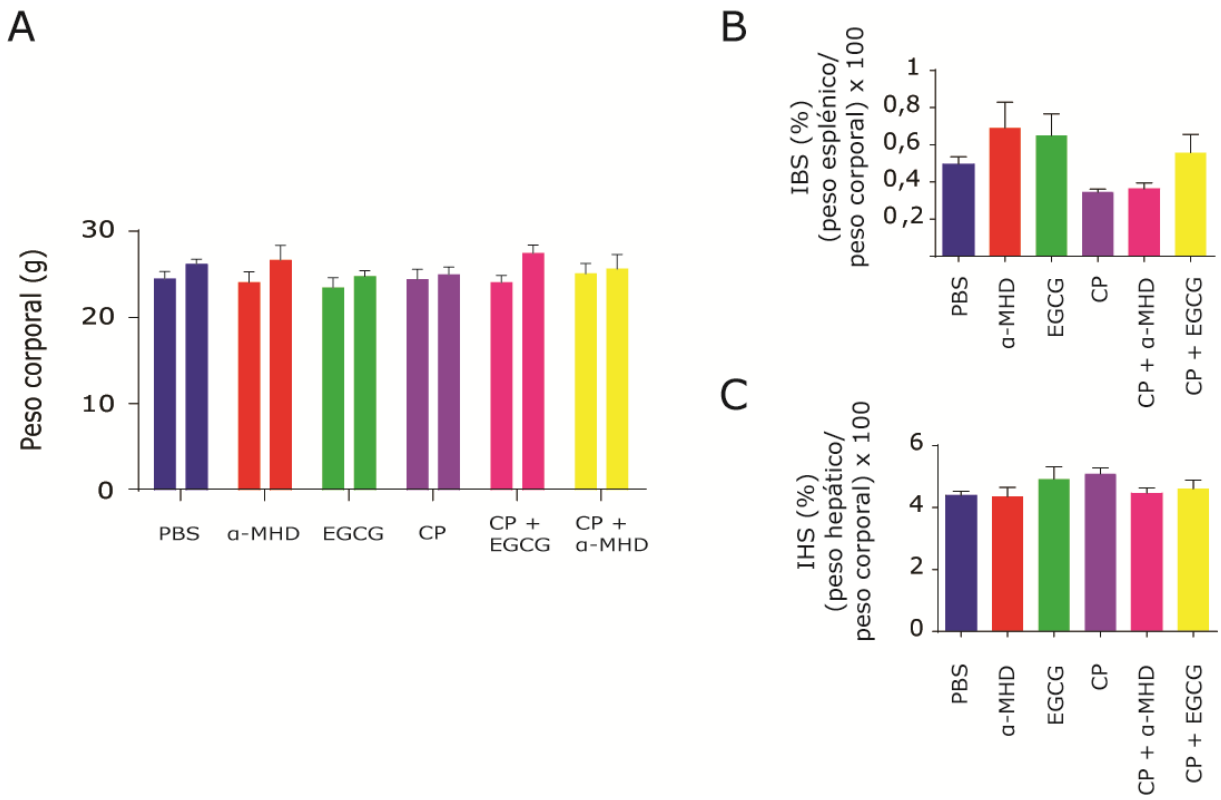


Figura R20. Salud general de los ratones F1 con tumores de MA-10 evaluada luego de los tratamientos. A. Los ratones fueron pesados al comenzar y al finalizar los tratamientos. **B.** El índice bazo-somático fue calculado como el peso del bazo dividido por el peso corporal de cada ratón y multiplicado por 100. **C.** El índice hepato-somático fue calculado dividiendo el peso del hígado por el peso corporal de cada ratón y multiplicado por 100.

Otro parámetro que se ve afectado como consecuencia de la quimioterapia es la integridad testicular, siendo generalmente asociada a una disminución de la fertilidad que eventualmente puede o no ser revertida (Ishikawa y col, 2004). Observamos que no hubo diferencias en el tamaño testicular en ninguno de los casos (**Figura R21, A**) y que

los testículos mantuvieron una morfología normal a nivel histológico, presentando los diversos estadios de maduración de las gametas, la luz tubular con presencia de espermatozoides, células de Sertoli íntegras, márgenes peritubulares normales, y un instersticio poblado de células de Leydig (**Figura R21, C**).

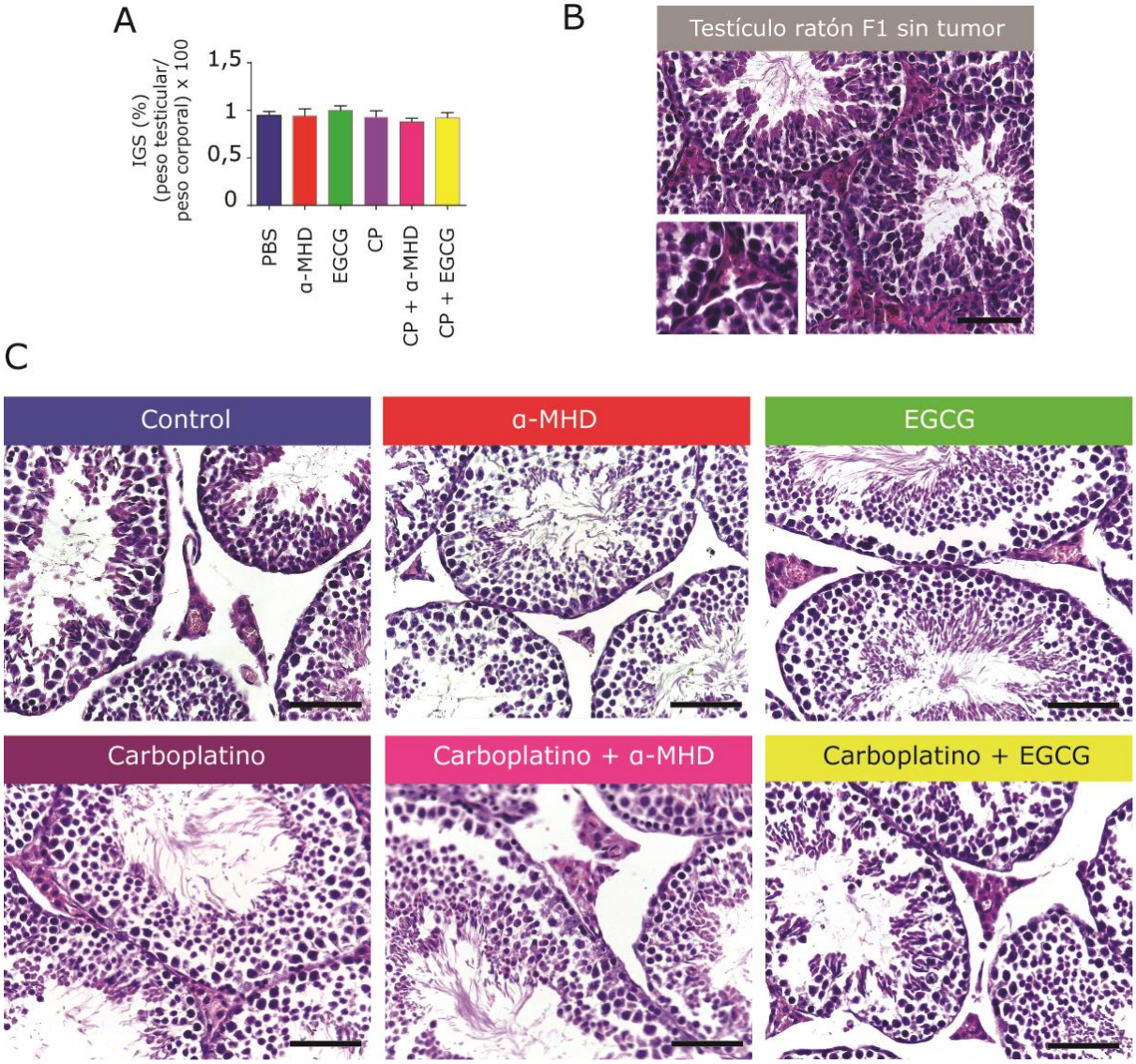
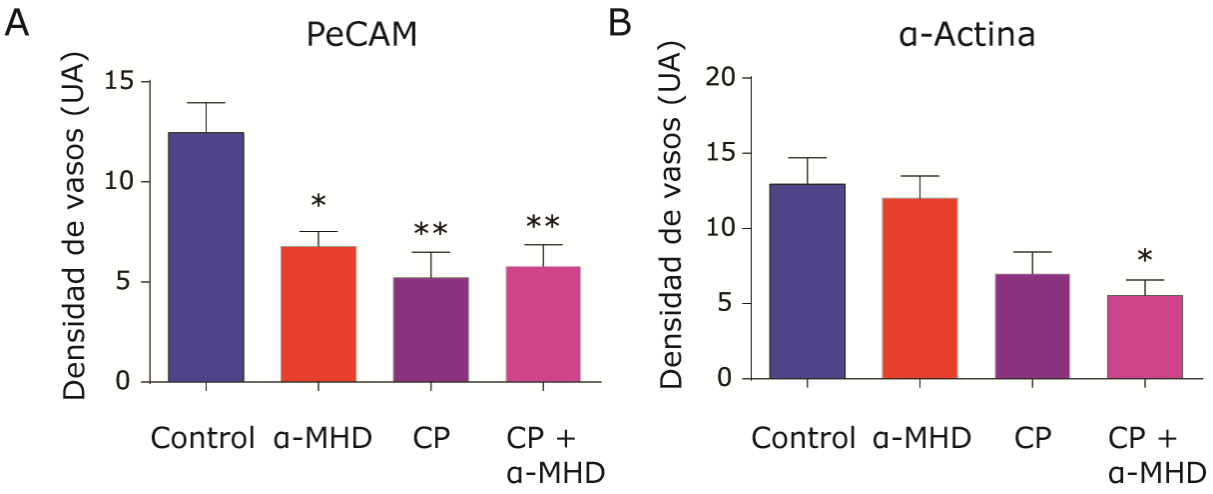


Figura R21. Integridad testicular de los ratones F1 con tumores de MA-10 evaluada al finalizar los tratamientos. A. El índice gonado-somático fue calculado dividiendo el peso de ambos testículos por el peso corporal de cada ratón y multiplicado por 100. **B.** Apecto general testicular. Los testículos fueron fijados y procesados para tinción con Hematoxilina y Eosina. Se utilizó como control el testículo de un ratón de la misma cepa sin tumor. La barra negra indica 50 µm.

2.1.5. Análisis de la modulación del proceso de angiogénesis *in vivo*.

Debido a que *in vitro* observamos que la HA posee un efecto pro-angiogénico (**Figura R9, Capítulo 1**) y que la inhibición de HDC produce una disminución en la formación de nuevos vasos, decidimos evaluar si los tratamientos que fueron efectivos a nivel de crecimiento tumoral *in vivo*, también tendrían un efecto sobre la formación de vasos dentro del tumor. Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Dra. Griselda Irusta del Laboratorio de Fisiología y Biología Tumoral del Ovario (IBYME-CONICET). Para ello, secciones de los tumores incluidos en parafina fueron sometidas a estudios inmunohistoquímicos para evaluar la expresión de los marcadores de endotelio α-actina y PeCAM. α-actina es una de las principales proteínas moduladoras de la permeabilidad presentes en el endotelio (Schnittler y col, 1990). Dado que está expresada en el músculo liso asociado a vasos, y que esto es indicio de un proceso de angiogénesis avanzado, se utiliza como marcador de endotelio maduro. Por su parte, PeCAM (también denominada CD31) es una de las principales moléculas de adhesión presentes en endotelio (DeLisser y col, 1997). En los tumores obtenidos por inoculación de CL MA-10 tratados con CP, α-MHD o la combinación de ambos, observamos una menor marcación de PeCAM y por lo tanto una menor cantidad de vasos respecto al control (**Figura R22, A**). En cuanto al endotelio maduro, positivo para α-actina, solamente la combinación de CP con α-MHD fue capaz de disminuir su densidad (**Figura R22, B**).



(Página anterior) Figura R22. Angiogénesis *in vivo* en tumores de CL MA-10. Secciones de tumores a punto final fueron procesadas para el análisis de dos marcadores de endotelio a través de la técnica de IHQ. Se muestra la densidad de marcación por área analizada en unidades arbitrarias (UA). El análisis estadístico fue ANOVA de una vía con contrastes de Tukey. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. **A.** Se utilizó anticuerpo anti-PeCAM para marcar endotelio en general. **B.** Se utilizó anticuerpo anti α-Actina para marcar endotelio maduro.

2.1.6. Análisis de la efectividad de los compuestos para inhibir de forma prolongada el funcionamiento del sistema histaminérgico en tumores de CL MA-10.

A fin de verificar que la inhibición de la síntesis de HA se haya mantenido en el tiempo una vez finalizadas las inyecciones (recordemos que el momento de sacrificio de los ratones fue tres días después de la última inyección de inhibidor), se empleó la técnica de IHQ para estudiar los niveles de HA endógena, utilizando un anticuerpo específico anti-HA. Observamos que el inhibidor sintético α-MHD fue capaz de disminuir prácticamente en su totalidad los niveles de HA endógena, tanto solo, como en combinación con CP. Por el contrario, el tratamiento con EGCG no resultó tan efectivo, si bien la síntesis de HA fue menor que en el control sin tratar. El tratamiento con CP no afectó los niveles de HA (**Figura R23**).

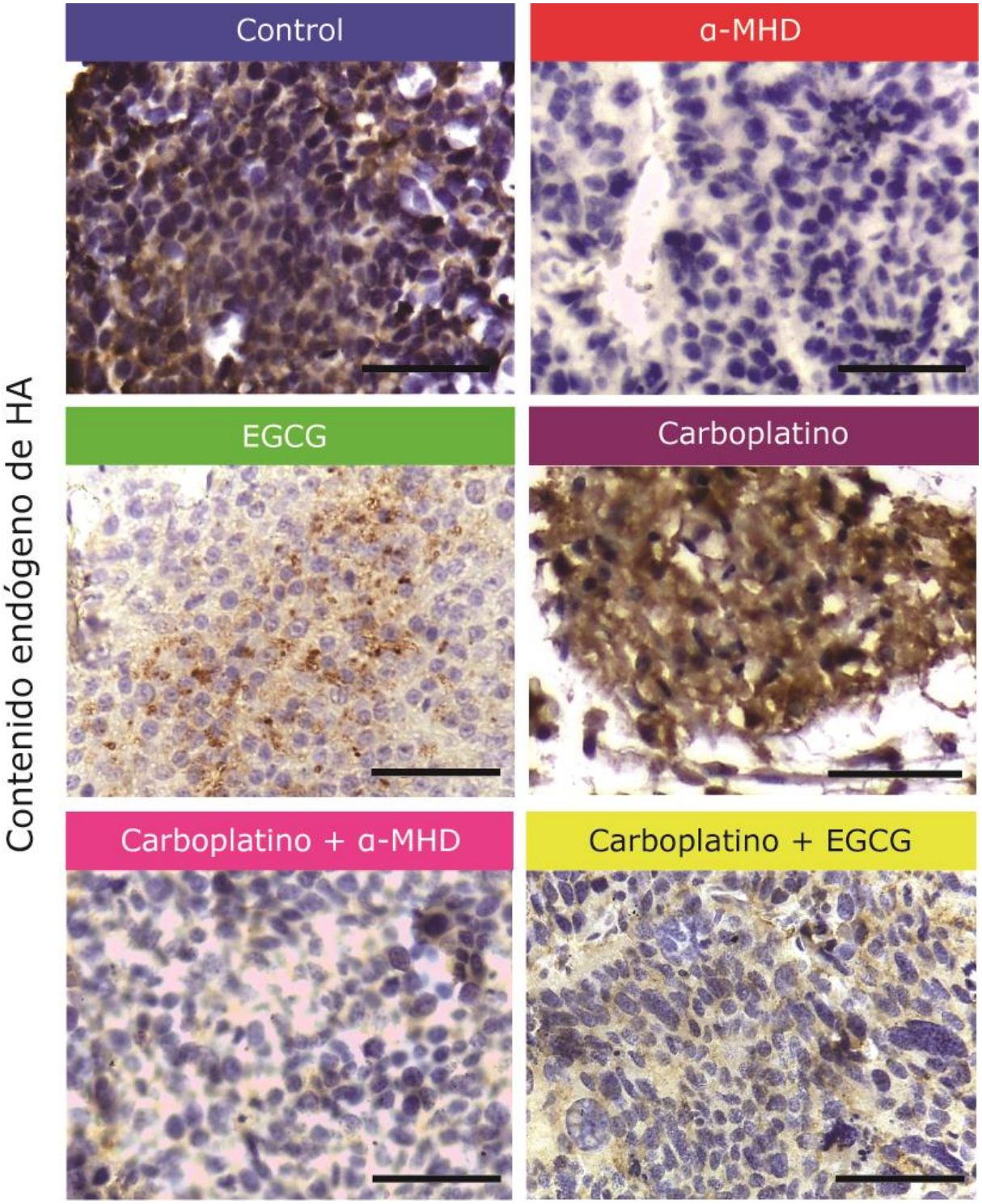


Figura R23. Contenido endógeno de HA en tumores de CL MA-10. Los tumores fueron procesados para IHQ y se estudió el contenido endógeno de HA para cada tratamiento, utilizando un anticuerpo específico anti-HA (Ver tabla de anticuerpos en Materiales y Métodos). Se realizó un contraste con Hematoxilina. Las barras negras indican 50 µm.

El efecto sobre los niveles endógenos de HA se correspondió con una alta inhibición de los niveles de expresión de HDC (**Figura R24**).

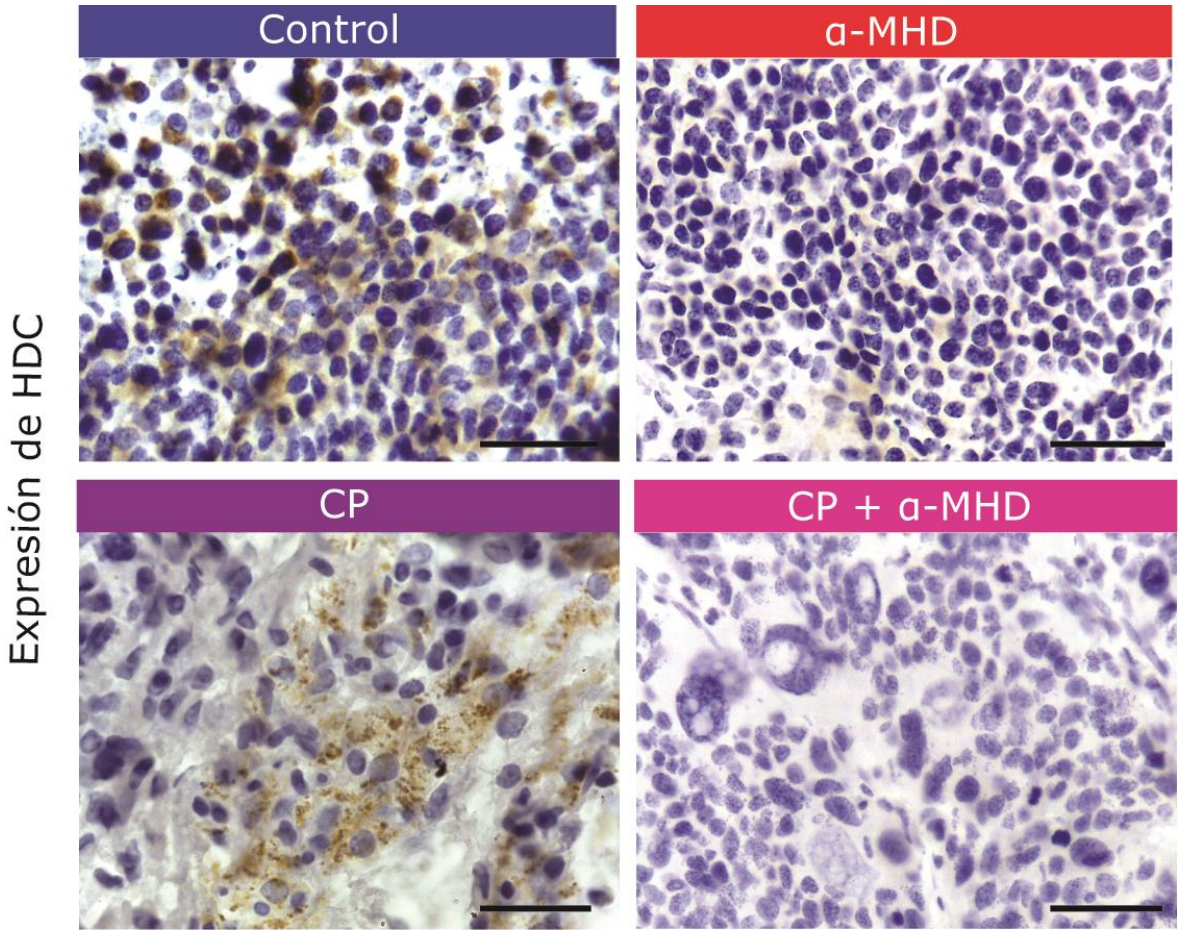


Figura R24. Expresión de HDC en tumores de CL MA-10. Los tumores fueron procesados para inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para HDC se estudió su expresión en presencia del inhibidor α-MHD, solo o en combinación con CP a punto final del experimento. Se realizó un contraste con hematoxilina. La barra negra indica 50 µm.

2.1.7. Análisis de inmunogenicidad de los tumores de CL MA-10

Se describe al proceso de inmunogenicidad como la capacidad del organismo de generar una respuesta inmune frente a un antígeno (Steinman, 2007). Se ha

demostrado que el sistema inmune es capaz de generar respuestas antitumorales en presencia de neoplasias, y que existen tumores que son capaces de evadir este tipo de mecanismos, a los cuales se los considera no inmunogénicos (Blankestein, 2012). En los sucesivos análisis del efecto de los tratamientos sobre la histología tumoral y la expresión de proteínas, se observó que el tratamiento más efectivo contra los tumores de CL MA-10, la combinación de α-MHD con CP, fue capaz de reclutar un alto número de células multinucleadas, a diferencia de los tumores control en donde no se vio ningún tipo de infiltrado (**Figura R25, A**).

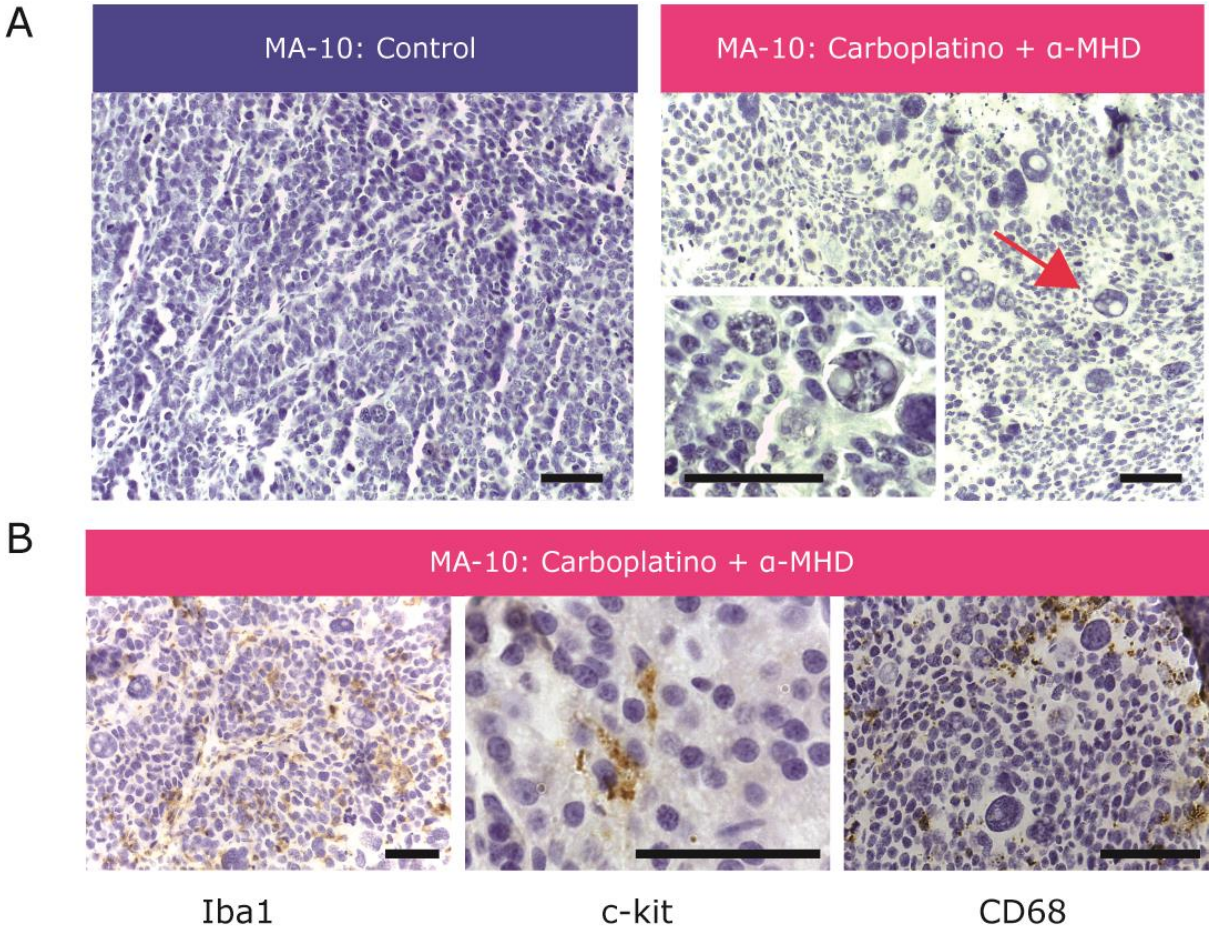


Figura R25. Expresión de células del sistema inmune en tumores de CL MA-10. Los tumores fueron procesados para IHQ y utilizando anticuerpos específicos anti-Iba1 y anti CD68 (marcadores de macrófagos) y anti- C-kit (marcador de células progenitoras linfoides tempranas). Se contrastó con hematoxilina. Las barras negras representan 50 µm. La flecha roja indica una de las células gigantes multinucleadas.

Con la intención de identificar dichas células gigantes multinucleadas, se analizó por inmunohistoquímica si expresaban marcadores para macrófagos o células progenitoras linfoides tempranas (Iba-1 y CD68, y c-kit, respectivamente). Si bien se observó marcación positiva para los tres marcadores de células del sistema inmune, ninguna de las señales fue positiva en las células de interés (**Figura R25, B**). Estos resultados permiten suponer que el tumor es capaz de generar una respuesta inmune, pero no son suficientes para caracterizar el origen de las células infiltrantes.

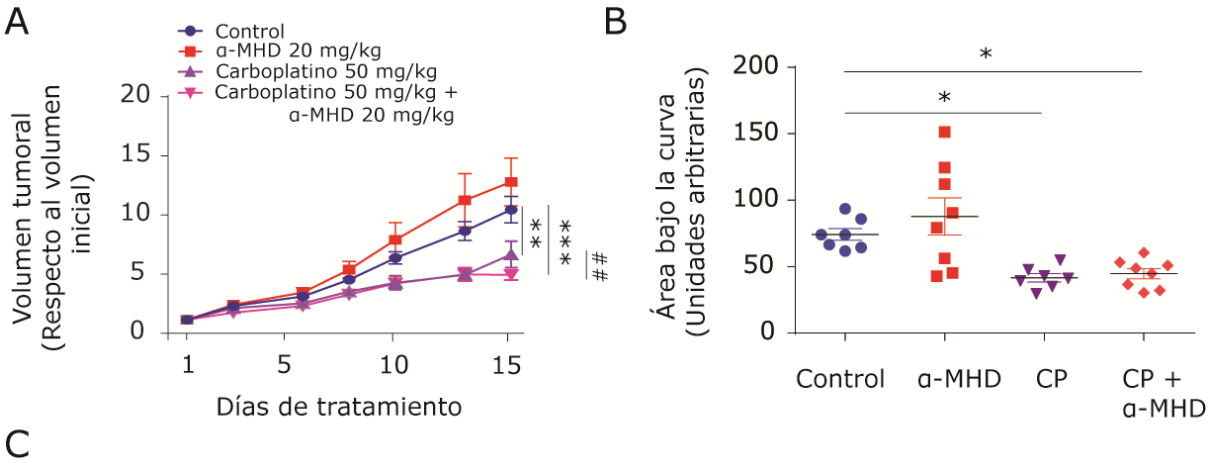
Capítulo 2. Sección 2. Experimentos *in vivo* en TCL establecidos a partir de CL R2C.

2.2.1. Crecimiento tumoral, síntesis de esteroides y estado general.

Como ya demostramos en la sección 2.1., el crecimiento de los tumores de CL MA-10 puede ser inhibido al tratar a los animales con CP y/o con α-MHD. En esta sección abordaremos el estudio de un segundo modelo de Leydigioma, los tumores de CL R2C, cuyas características fenotípicas son distintas en varios aspectos a las MA-10. En particular, este tipo celular es independiente de la activación de la esterodogénesis mediada por gonadotrofinas, con lo cual sintetiza esteroides de manera constante. Como ya hemos mencionado repetidamente, las R2C producen grandes cantidades de testosterona o estradiol, que a su vez utilizan como factor de crecimiento. Este fenotipo es el más comúnmente observado en la clínica. En nuestros experimentos *in vitro* observamos que la inhibición de HDC es capaz de disminuir dicha síntesis de esteroides constitutiva.

Como resultado de los experimentos *in vivo* en ratones con tumores de CL R2C no observamos un efecto notablemente significativo sobre el crecimiento tumoral en presencia de α-MHD, ni en la curva de crecimiento ni en el análisis de las áreas bajo la

curva (**Figura R26, A y B**), sino solamente a nivel del tiempo de duplicación. Al respecto, fueron necesarios dos días más que en el control para alcanzar el doble de volumen en el caso de la combinación de CP con α-MHD (**Figura R26, C**). Esta es la primera de múltiples diferencias entre ambos modelos de Leydigioma que abordaremos al final del capítulo.



C

	Control	α-MHD	CP	CP + α-MHD
Tiempo de duplicación	5,23	5,12	6,73	7,56
IC 95%	(4,56 - 6,12)	(3,85 - 7,63)	(5,23 - 9,44)	(6,13 - 9,84)

Figura R26. Crecimiento tumoral de CL R2C en presencia de α-MHD. A. Curva de crecimiento tumoral en tumores de R2C en ratones Swiss$^{Nu/Nu}$ obtenidas a partir de la medición de los lados del tumor y el cálculo de volumen para cada uno. El valor graficado resulta de su relativización al volumen inicial. Para las comparaciones se realizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas con contraste de Holm-Sidak. **B.** Análisis del área bajo la curva para la curva de crecimiento de cada tumor individualmente. El análisis de las diferencias entre grupos se realizó a través de un ANOVA de una vía con contraste de Tukey. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$, respecto al control; ## $p < 0,01$ respecto a CP. **C.** A partir de las curvas de crecimiento se estimó si todas ajustan a la misma ecuación de crecimiento a través de una regresión no lineal. Del ajuste a distintas curvas se obtuvo el tiempo de duplicación para cada caso y el intervalo de confianza del 95% (IC).

Como se observó en la **figura R10** al inicio de este capítulo, los tumores de CL R2C aumentan notablemente los niveles circulantes de testosterona y estradiol. Los tratamientos no tuvieron efecto sobre la testosterona plasmática, pero al relativizar los valores de testosterona al tamaño tumoral en cada ratón, pudimos observar que a pesar que el α-MHD no disminuyó el tamaño de los tumores (**Figura R27, E**), los animales portadores de esos tumores grandes sintetizaron menos testosterona que los portadores de tumores pequeños (**Figura R27, C**), demostrando así un efecto sobre la producción de este andrógeno. Por otro lado, al analizar el estradiol plasmático, pudimos observar una tendencia a la disminución (**Figura R27, B**), que además fue directamente proporcional al tamaño tumoral, es decir, tumores de menor tamaño secretaron a circulación menores cantidades de estradiol (**Figura R27, B y D**). Finalmente, al igual que lo observado para la testosterona, se vio que α-MHD, a pesar de no disminuir el tamaño tumoral, disminuyó los niveles de estradiol circulante. Esto indicaría que el α-MHD posee un efecto inhibitorio sobre la síntesis de esteroides *in vivo*.

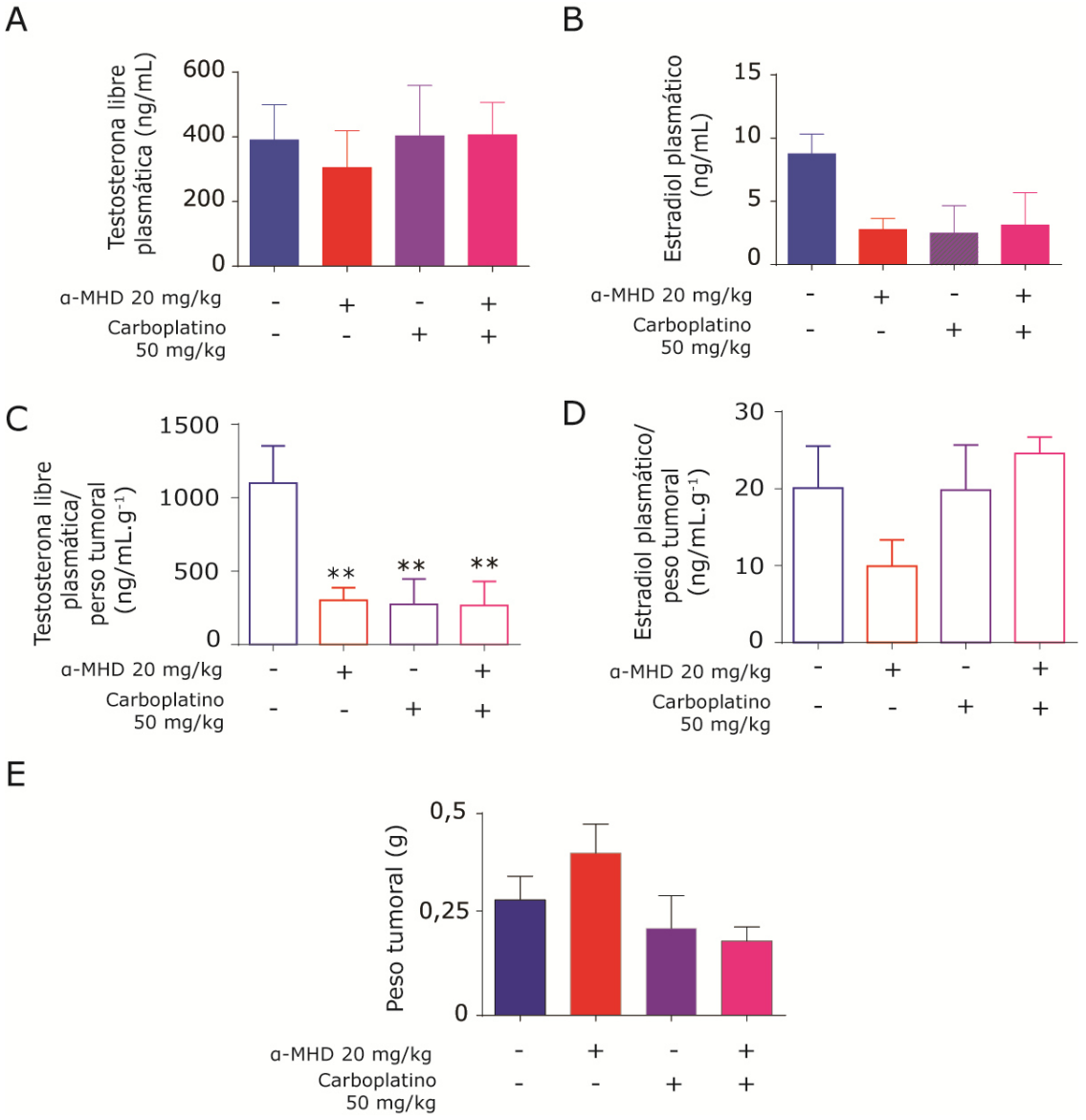
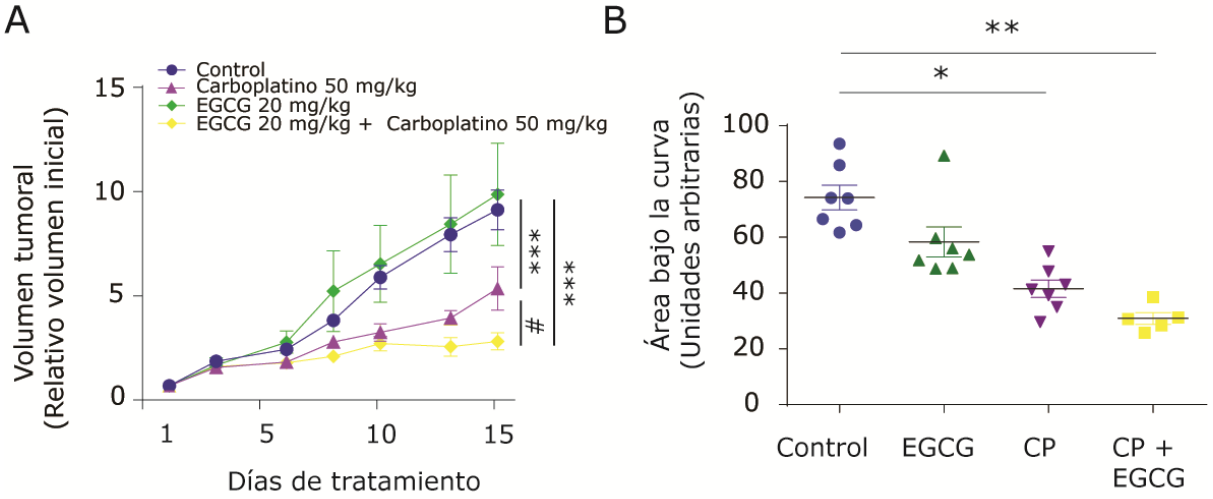


Figura R27. Testosterona y estradiol plasmáticos, y peso tumoral en ratones Swiss$^{Nu/Nu}$ con tumores de R2C tratados con α-MHD. A y B. Los plasmas de los ratones fueron procesados para el dosaje de testosterona por RIA y de estradiol por ELISA, a punto final. Se graficaron los niveles plasmáticos totales. **C y D**. Se muestran los datos relativizados al tamaño tumoral considerando que los esteroides circulantes provienen principalmente del tumor. **E.** Peso de los tumores a punto final.

En los tumores de CL R2C, el EGCG como único tratamiento no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral. Sin embargo, cuando se combinó con CP el efecto fue ampliamente significativo, prácticamente deteniendo el crecimiento del tumor (**Figura R28, A y B**). Al respecto, se observaron disminuciones de hasta un 75%

respecto al control, y de más del 50% respecto al CP. A su vez, el tiempo de duplicación tumoral aumentó en un 200%, de 5,23 días a 14,64 días (**Figura R28, C**). La combinación de EGCG con CP mostró un efecto sinérgico en este modelo.



C

	Control	EGCG	CP	CP + EGCG
Tiempo de duplicación	5,23	5,6	6,73	14,64
IC 95%	(4,56 - 6,12)	(3,92- 9,92)	(5,23 - 9,44)	(9,95 - 27,60)

Figura R28. Crecimiento tumoral de CL R2C en presencia de EGCG. A. Curva de crecimiento tumoral en tumores de R2C en ratones Swiss$^{Nu/Nu}$ obtenidas a partir de la medición de los lados del tumor y el cálculo de volumen para cada uno. El valor graficado resulta de su relativización al volumen inicial. Para las comparaciones se realizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas con contraste de Holm-Sidak. **B.** Análisis del área bajo la curva para la curva de crecimiento de cada tumor individualmente. El análisis de las diferencias entre grupos se realizó a través de un ANOVA de una vía con contraste de Tukey. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, respecto al control; #, $p < 0,01$ respecto a CP. **C.** A partir de las curvas de crecimiento se estimó si todas ajustan a la misma ecuación de crecimiento a través de una regresión no lineal. Del ajuste a distintas curvas se obtuvo el tiempo de duplicación para cada caso y el intervalo de confianza del 95% (IC).

En cuanto a los esteroides circulantes, los niveles de testosterona no se vieron afectados para ningún tratamiento (**Figura R29, A**), pero cuando se los relativizó al

tamaño tumoral, observamos que incluso el EGCG como único tratamiento fue capaz de disminuirlos, indicando que aún los tumores de mayor tamaño secretaron menos testosterona (**Figura 29, C y E**). Por otro lado, los tres tratamientos disminuyeron los niveles de estradiol (**Figura R29, B**). Cabe destacar que ya se ha reportado que el EGCG es capaz de inhibir a aromatasa reduciendo los niveles de su ARN mensajero (Satoh y col, 2002; Balunas y col, 2010). En el caso de los tumores tratados con la combinación de CP y EGCG, se observó un nivel de estradiol plasmático cercano a cero (**Figura R29, B y D**), siendo recuperado de este modo el nivel normal de estradiol presente en ratones macho sin tumor.

En la figura R30 se muestra una fotografía en la que se evidencia el efecto de los tratamientos en TCL de R2C. Nótese la gran diferencia entre el tumor de la extrema derecha y el tumor de la extrema izquierda, correspondientes a la combinación de CP con EGCG y al Control, respectivamente.

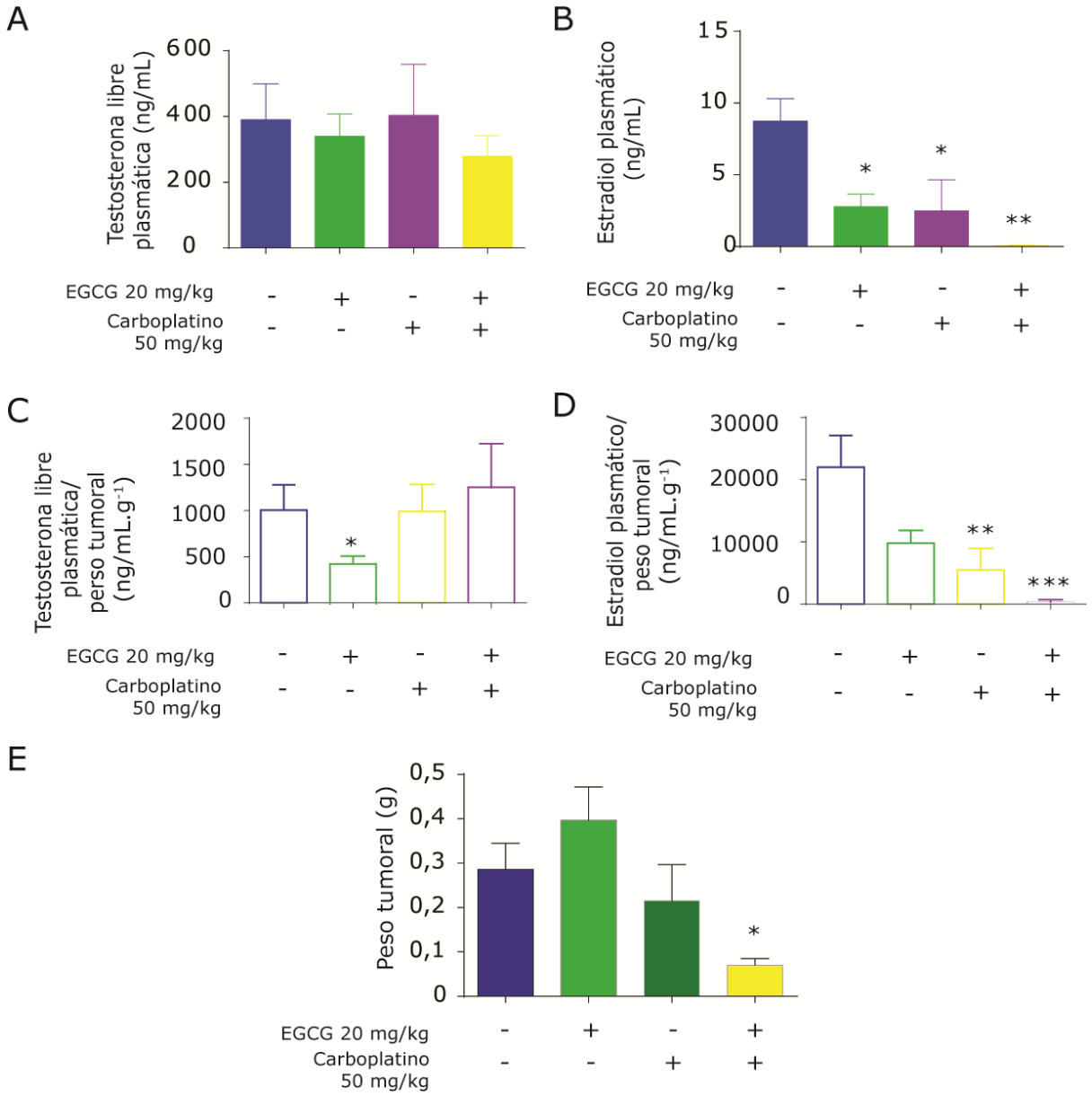


Figura R29. Testosterona y estradiol plasmáticos, y peso tumoral en ratones Swiss $^{Nu/Nu}$ con tumores de R2C tratados con EGCG. A y B. Los plasmas de los ratones fueron procesados para el dosaje de testosterona por RIA y de estradiol por ELISA, a punto final. Se graficaron los niveles plasmáticos totales. **C y D**. Se muestran los datos relativizados al tamaño tumoral considerando que los esteroides circulantes provienen principalmente del tumor. **E.** Peso de los tumores a punto final. Se realizó ANOVA de una vía con contraste de Tukey para las comparaciones. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, respecto al control.

Figura R30. Fotografía representativa de la modulación del tamaño tumoral en presencia de los distintos tratamientos en ratones con tumores de CL R2C. Nótese la diferencia entre el control y el tratamiento más efectivo. De izquierda a derecha: Control, α-MHD, EGCG, CP, CP + α-MHD, CP + EGCG.

En el modelo de TCL originados a partir de CL R2C, la combinación de <u>EGCG con CP</u> fue la <u>más efectiva</u> para detener el crecimiento tumoral.

2.2.2. Estado general de los ratones luego del tratamiento.

En este modelo también evaluamos parámetros indicadores de la integridad física de los ratones. No se observaron diferencias entre tratamientos en cuanto al peso corporal a punto final, índice bazo-somático ni en el índice hepato-somático (**Figura R31**).

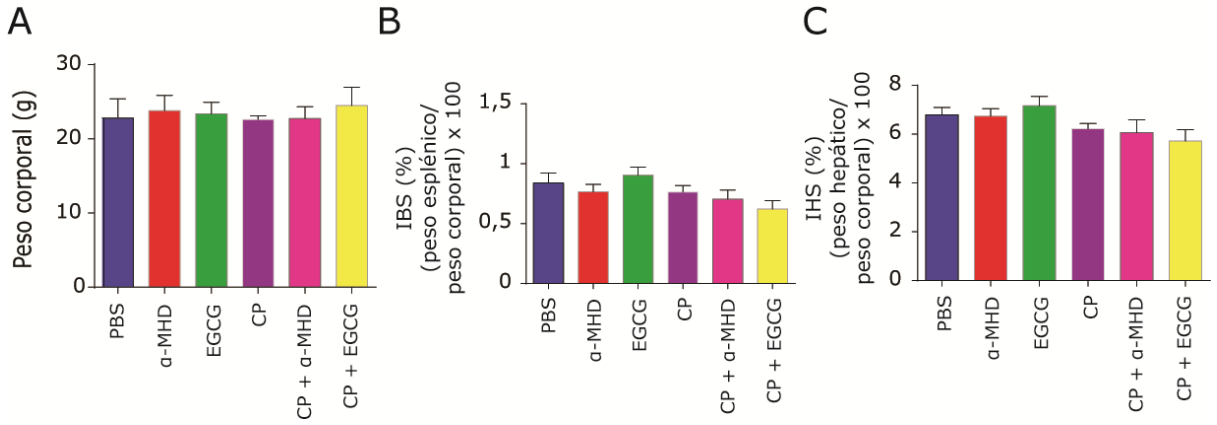


Figura R31. Salud general de los ratones Swiss $^{Nu/Nu}$ con tumores de R2C evaluada luego de los tratamientos. A. Los ratones fueron pesados al comenzar y al finalizar los tratamientos. **B.** El índice bazo-somático fue calculado como el peso del bazo dividido por el peso corporal de cada ratón y multiplicado por 100. **C.** El índice hepato-somático fue calculado dividiendo el peso del hígado por el peso corporal de cada ratón y multiplicado por 100.

Para completar el análisis del efecto de los tratamientos sobre otros sistemas, se analizó en índice gonado-somático y la aparición de cambios a nivel histológico en el testículo. Si bien no fue significativa, se observó una tendencia a la disminución del peso de los testículos en presencia de CP, salvo al combinarlo con EGCG, donde se observa que se revierte dicho efecto (**Figura R32, A**). Respecto al aspecto histológico, en todos los casos se observó presencia de células de Sertoli, gametogénesis completa llegando a ver espermatozoides en la luz de túbulo, y células de Leydig en el intersticio testicular. Los tratamientos no afectaron el aspecto general de los testículos ni la generación de espermatozoides (**Figura R32, C**) en los tiempos evaluados.

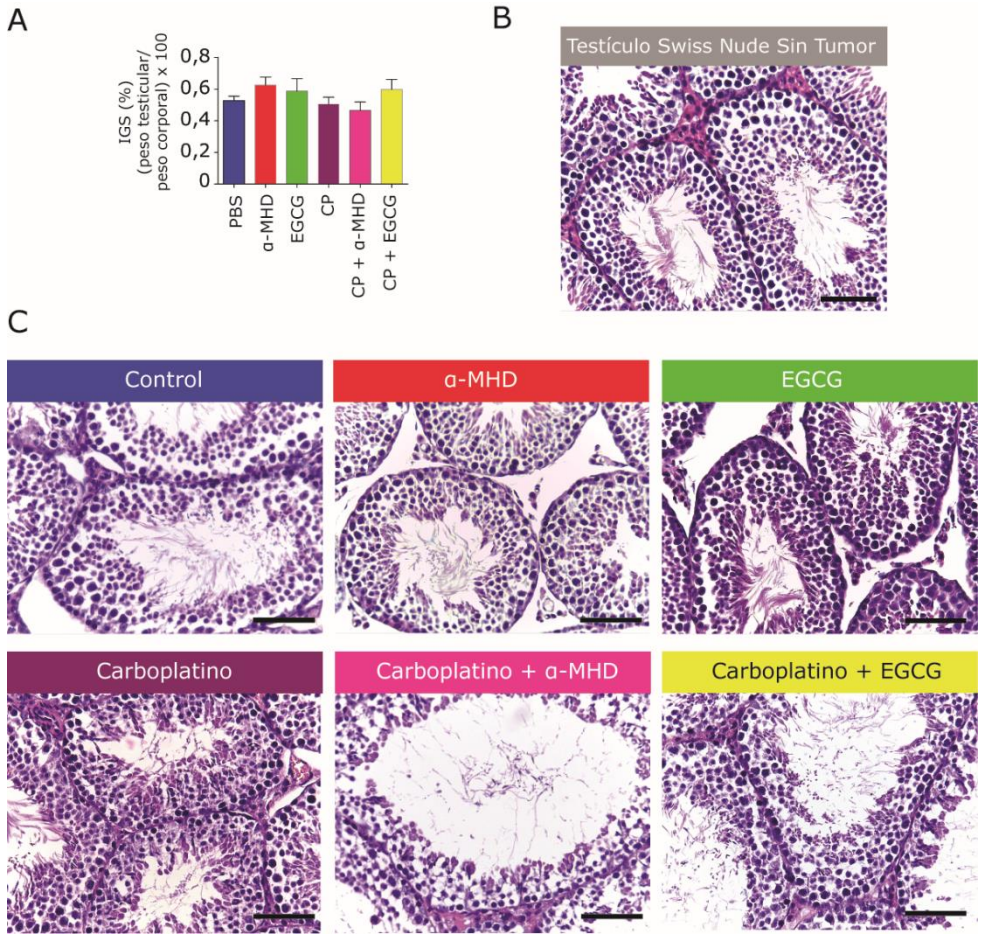


Figura R32. Salud reproductiva de los ratones Swiss $^{Nu/Nu}$ con tumores de R2C evaluada al finalizar los tratamientos. A. El índice gonado-somático fue calculado dividiendo el peso de ambos testículos por el peso corporal de cada ratón y multiplicado por 100. **B.** Aspecto general testicular. Los testículos fueron fijados y procesados para tinción con Hematoxilina y Eosina. Se utilizó como control el testículo de un ratón de la misma cepa sin tumor. La barra negra indica 50 µm.

2.2.3. Análisis del efecto del tratamiento con EGCG sobre los niveles de glucosa

Publicaciones de otros laboratorios dan cuenta de la eficacia del EGCG para disminuir los niveles de glucosa plasmáticos en modelos pre-clínicos de diabetes experimental (Wolfram y col, 2006; Csala y col, 2007) y en otros modelos de estudio como *Drosophila melanogaster* (Wagner y col, 2015), y de hecho existen al menos siete ensayos clínicos en curso y terminados (*clinicaltrials.gov*) del potencial uso de esta catequina en el tratamiento de diabetes. Es por ello que decidimos evaluar los niveles de

glucosa en ratones sometidos al tratamiento con EGCG, para descartar una disminución no deseada de la glucemia y un eventual efecto a nivel fisiológico en detrimento de la eficacia del tratamiento en sí mismo. Observamos que la dosis utilizada de EGCG en los ensayos *in vivo* no tuvo efecto sobre los niveles de glucemia de los ratones (**Figura R33**).

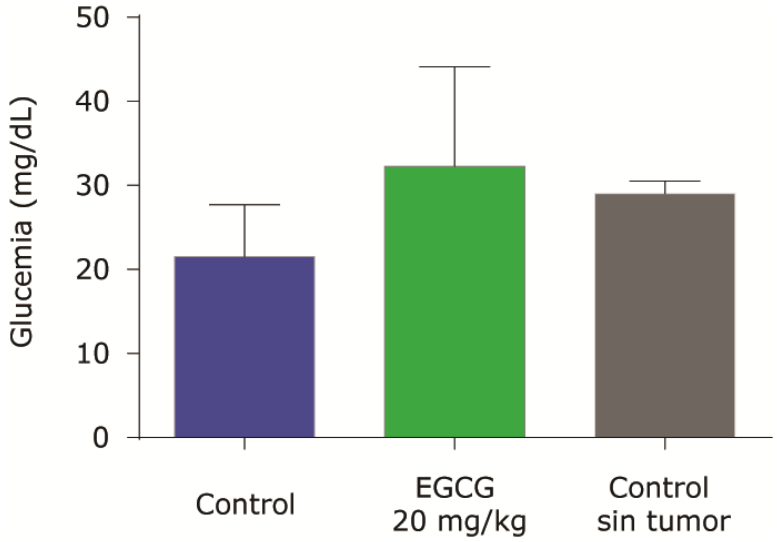


Figura R33. Glucemia en ratones Swiss $^{Nu/Nu}$ con tumor de CL R2C. Con el mismo esquema de tratamiento mencionado al inicio de la Sección 1, un grupo de ratones fueron ayunados durante las últimas 24 horas antes del sacrificio para medir la concentración de glucosa en sangre. Los valores fueron medidos sin dilución en el Autoanalizador Roche-Hitachi c501 del Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan".

2.2.4. Análisis de la efectividad de los compuestos para inhibir el funcionamiento del sistema histaminérgico en tumores de CL R2C.

A punto final del experimento, α-MHD también fue capaz de inhibir los niveles de expresión de HDC en este modelo, tanto solo como en combinación con CP (**Figura R34**). Sin embargo, se esperaba que la expresión de HDC fuese mucho mayor en los cortes de ratones control considerando que *in vitro* se había observado una gran banda de expresión por Western Blot, incluso comparable con la de las CL MA-10 (**Figura R4, Capítulo 1**). Es evidente que *in vivo* la expresión de HDC resulta modulada y este

modelo no se comporta igual que el establecido a partir de CL MA-10. Por otro lado, es interesante que, *in vivo,* el EGCG aumentó los niveles de expresión de HDC, tanto solo como en combinación con CP, al igual que detectamos por PCR en tiempo real en las CL R2C (**Figura R34, B**). Asimismo, pudimos observar como la HA es capaz de modular su propia síntesis, regulando la expresión de HDC (**Figura R34, B**).

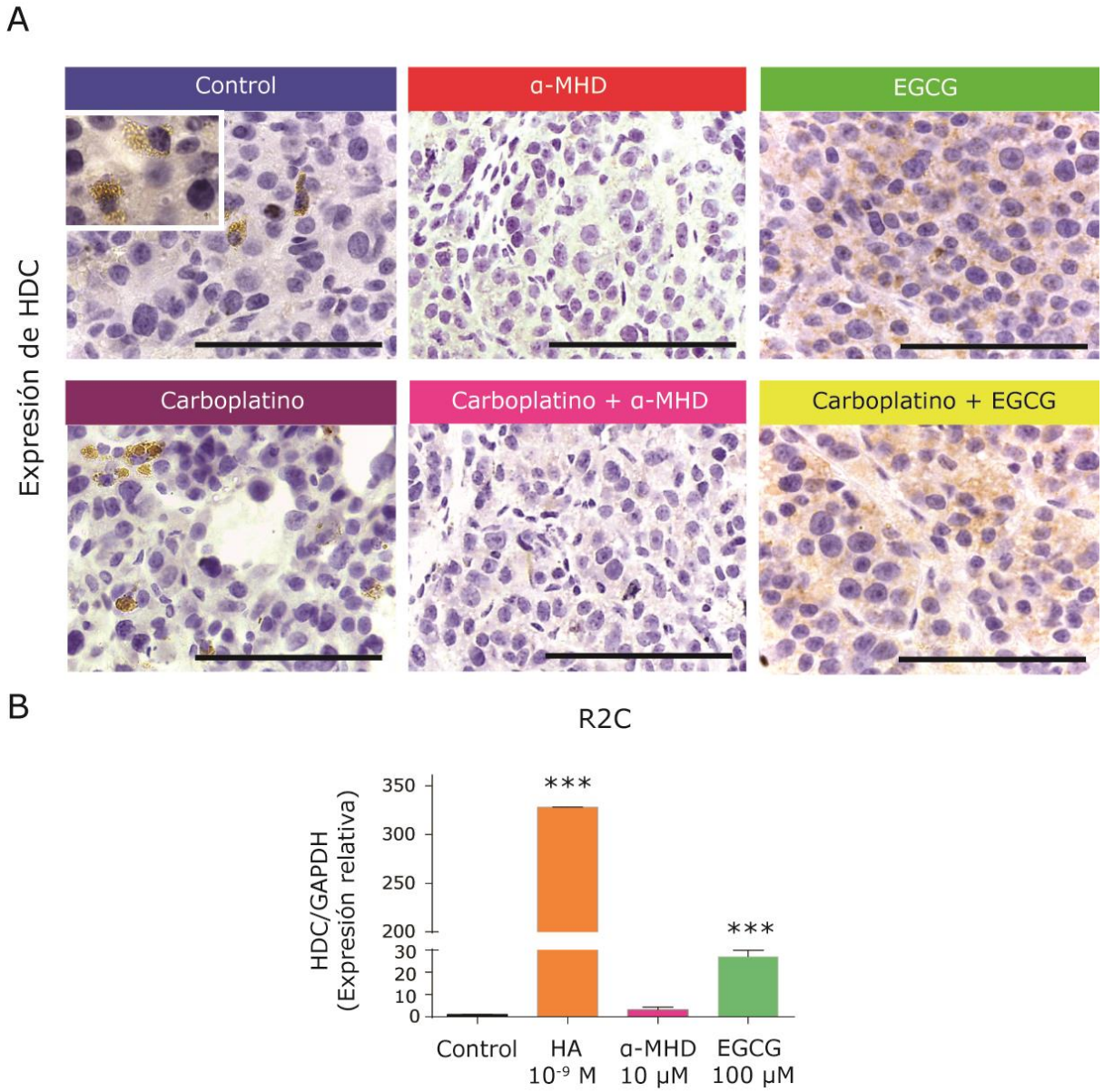


Figura R34. Expresión de HDC en ratones Swiss $^{Nu/Nu}$ con tumores de R2C. Los tumores fueron procesados para inmunihistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para HDC se estudió su expresión en presencia del inhibidor α-MHD y el EGCG, solos o en combinación con CP a

punto final del experimento. Se realizó un contraste con hematoxilina. La barra negra indica 50 µm. **B.** Las CL R2C fueron incubadas en medio completo con HA 10^{-9} M, α-MHD 10 µM o EGCG 100 µM durante 48 h y luego procesadas para realizar q-PCR. Como gen de referencia para relativizar se utilizó GAPDH. Las barras de error representan la media ± EE. ***, $p < 0,001$, contrastados través de ANOVA de una vía.

Al igual que observamos para la expresión de HDC, no se detectó una disminución de los niveles de HA en el tratamiento más efectivo para este modelo (**Figura R35**).

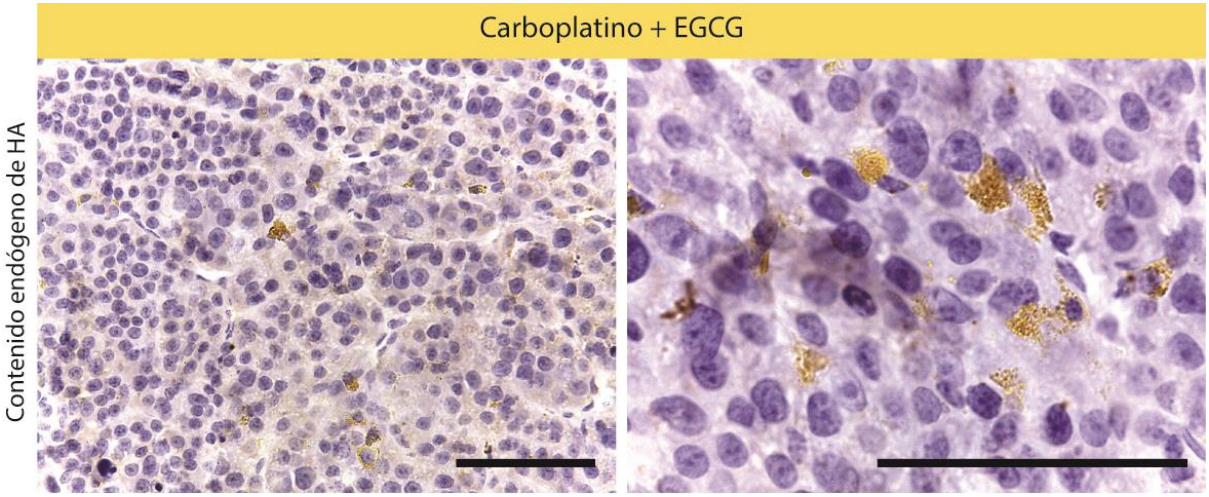


Figura R35. Contenido endógeno de HA en ratones Swiss $^{Nu/Nu}$ con TCL R2C tratados con Carboplatino + EGCG. Los tumores fueron procesados para inmunihistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para HA se estudió su síntesis en presencia de EGCG en combinación con CP a punto final del experimento. Se realizó un contraste con hematoxilina. La barra negra indica 50 µm.

2.2.5. Estudio del efecto de los tratamientos sobre la esteroidogénesis a través del análisis de la expresión de enzimas que median la síntesis de esteroides.

Dado que las CL R2C dependen de la producción autócrina de estradiol para mantener el fenotipo tumoral (Sirianni y col, 2009), decidimos evaluar si la expresión de dos enzimas imprescindibles para su síntesis se vio afectada por los tratamientos. En

primer lugar, observamos muy alta expresión de la proteína StAR (responsable del ingreso del colesterol a las mitocondrias) en los tumores control. El inhibidor de HDC, α-MHD, no mostró efecto sobre la expresión de StAR. Por el contrario, en los tumores tratados con EGCG los niveles de dicha proteína fueron notablemente más bajos, en coincidencia con lo observado respecto a los niveles circulantes de esteroides (**Figura R36**).

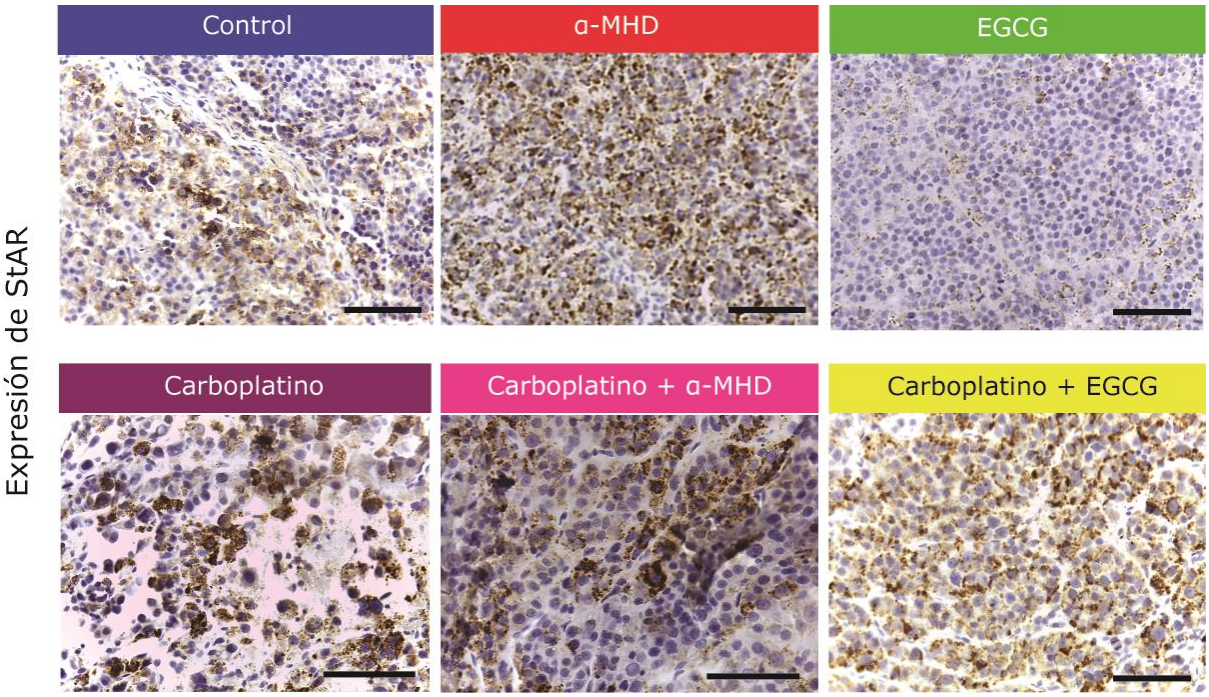


Figura R36. Expresión de StAR en ratones Swiss$^{Nu/Nu}$ con tumores de CL R2C. Los tumores fueron procesados para inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para StAR se estudió su expresión en presencia del inhibidor α-MHD y el EGCG, solos o en combinación con CP a punto final del experimento. Se realizó un contraste con hematoxilina. La barra negra indica 50 µm.

De forma coincidente, al analizar la expresión de CYP19 pudimos verificar altos niveles en los tumores control, y que su expresión fue inhibida por ambos compuestos, α-MHD y EGCG. El tratamiento con CP como agente único también mostró inhibición sobre los niveles de CYP19 (**Figura R37**). Todo esto coincide con lo observado en cuanto a los niveles de estradiol en circulación.

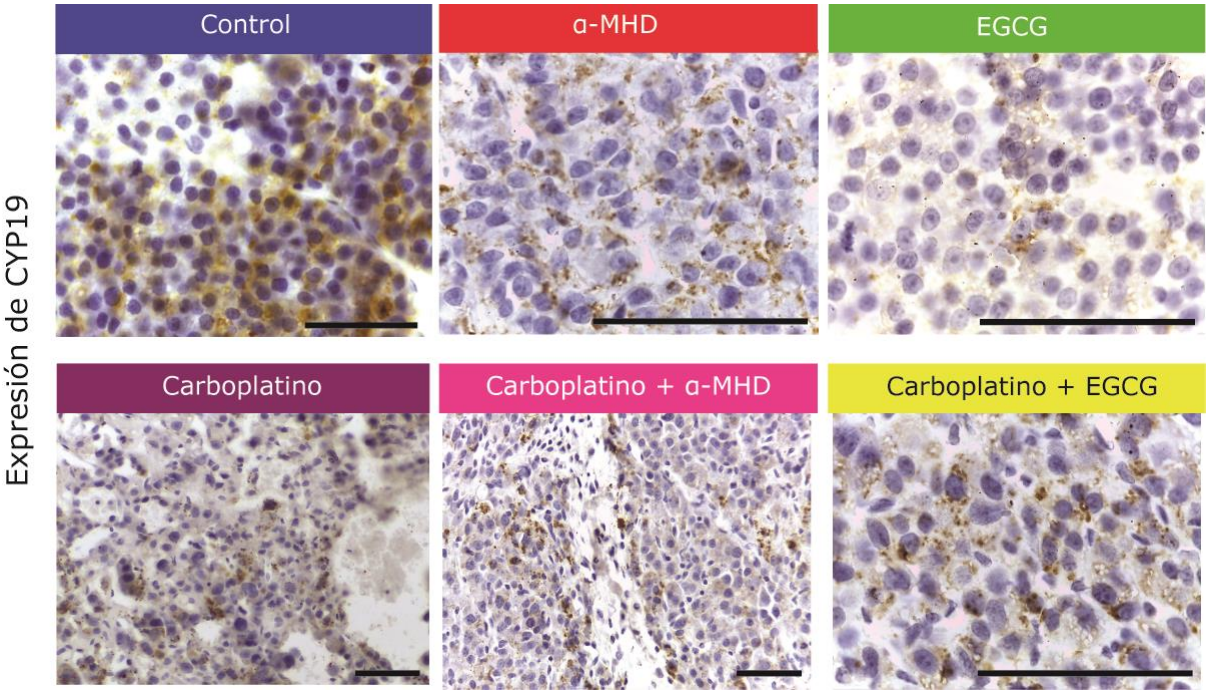


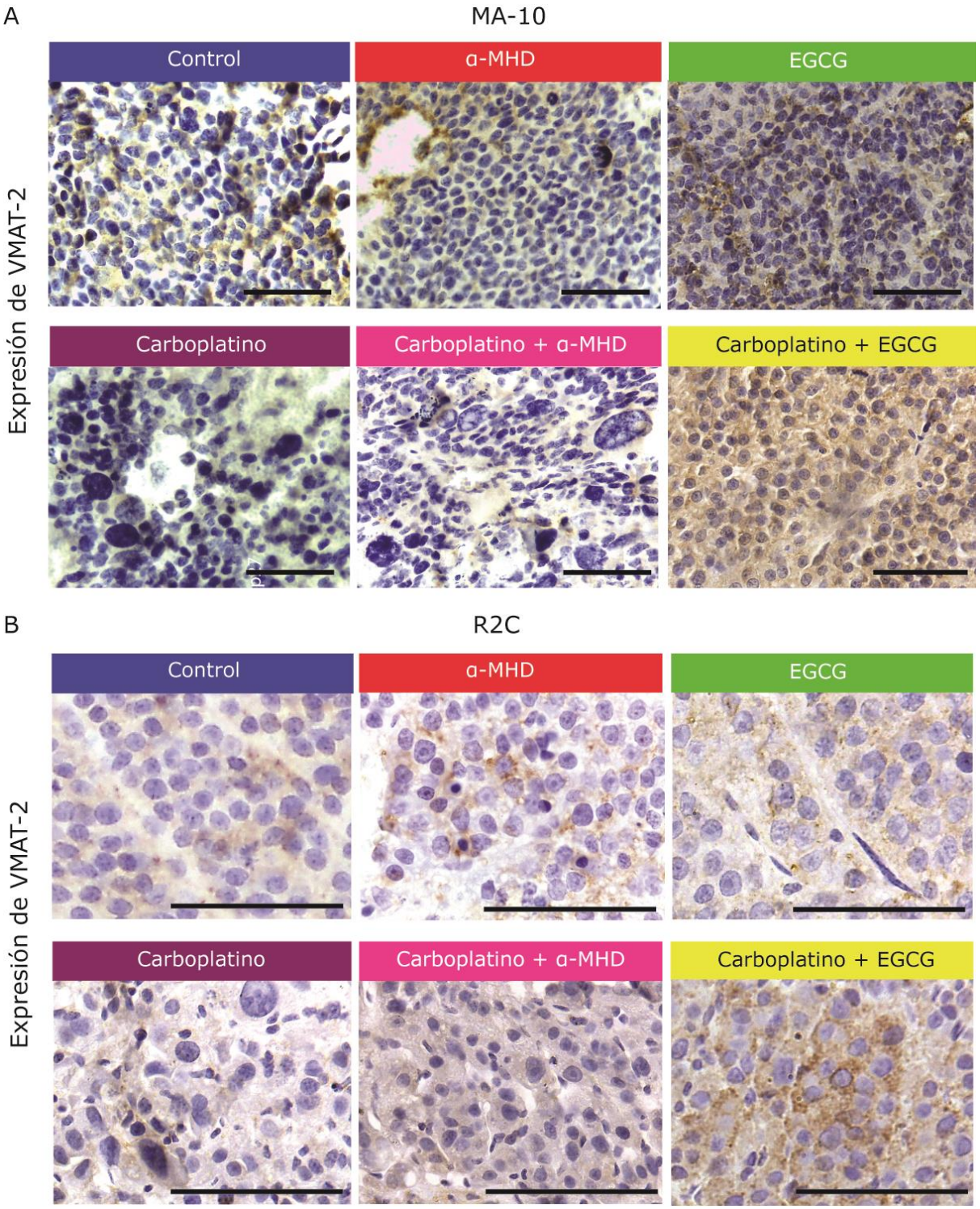
Figura R37. Expresión de CYP19 en ratones Swiss$^{Nu/Nu}$ con tumores de CL R2C. Los tumores fueron procesados para inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para CYP19 se estudió su expresión en presencia del inhibidor α-MHD y el EGCG, solos o en combinación con CP a punto final del experimento. Se realizó un contraste con hematoxilina. La barra negra indica 50 µm.

Capítulo 2. Sección 3. Mecanismos afectados por los tratamientos.

2.3.1. Modulación de los niveles de VMAT-2 en ambos modelos de TCL

La liberación de HA al medio extracelular depende de la presencia de transportadores capaces de movilizar dicha amina hacia las vesículas por las cuales será liberada. En este caso estudiamos el transportador de monoaminas VMAT-2, responsable de tal proceso, como una potencial vía de liberación de HA en nuestros modelos de TCL. Se analizó su expresión para todos los tratamientos en los tumores de CL MA-10 y de CL R2C. Se observó que a-MHD disminuyó notablemente la marcación para el transportador en el modelo de TCL MA-10. En contraste, el EGCG aumentó notablemente su expresión

en ambos modelos tumorales (**Figura R38**). Respecto al CP, en tumores en cerebro, en donde VMAT-2 cumple un rol protagónico, se ha publicado que es capaz de disminuir su expresión (Georgantzi y col, 2019), efecto que vemos se reproduce en este caso, salvo en presencia de EGCG.



(Página anterior) Figura R38. Expresión de VMAT-2 en tumores de CL MA-10 y en tumores de CL R2C. Los tumores MA-10 (**A**) y R2C (**B**) fueron procesados para inmunihistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para VMAT-2 se estudió su expresión en presencia del inhibidor α-MHD y el EGCG, solos o en combinación con CP a punto final del experimento. Se realizó un contraste con hematoxilina. La barra negra indica 50 μm.

2.3.2. Participación de p27 en el mecanismo de inhibición del crecimiento tumoral.

Se ha descripto que el EGCG ejerce su función inhibitoria de la proliferación a través de la inhibición del ciclo celular y el establecimiento de arresto, entre otros mecanismos. Nada se sabe respecto a la función de α-MHD en este punto, salvo que disminuye los niveles de PCNA (Francis y col, 2012). La proteína p27 es responsable de la inhibición del ciclo celular y es uno de los blancos descriptos para EGCG (Hung y col, 2005; Stuart y col, 2006).

Al analizar su expresión a través de inmunohistoquímica en los TCL MA-10, pudimos observar que α-MHD no regula los niveles de p27 nuclear pero sí citoplasmático, y que, por el contrario, EGCG aumenta notable y de forma estadísticamente significativa el número de núcleos positivos en TCL de MA-10 (**Figura R39 A y B**). Por otro lado, al analizar por medio de la técnica de TUNEL la presencia de núcleos apoptóticos, observamos que solamente hubo marca positiva en presencia de CP. Ninguno de los inhibidores aumentó el número de núcleos en apoptosis (**Figura R40, A**). Sin embargo, al analizar la expresión de la proteína p53, relacionada con el proceso de apoptosis, se observó marca positiva en presencia del tratamiento combinado de α-MHD con CP (**Figura R40, B**); siendo negativa en los otros cinco casos.

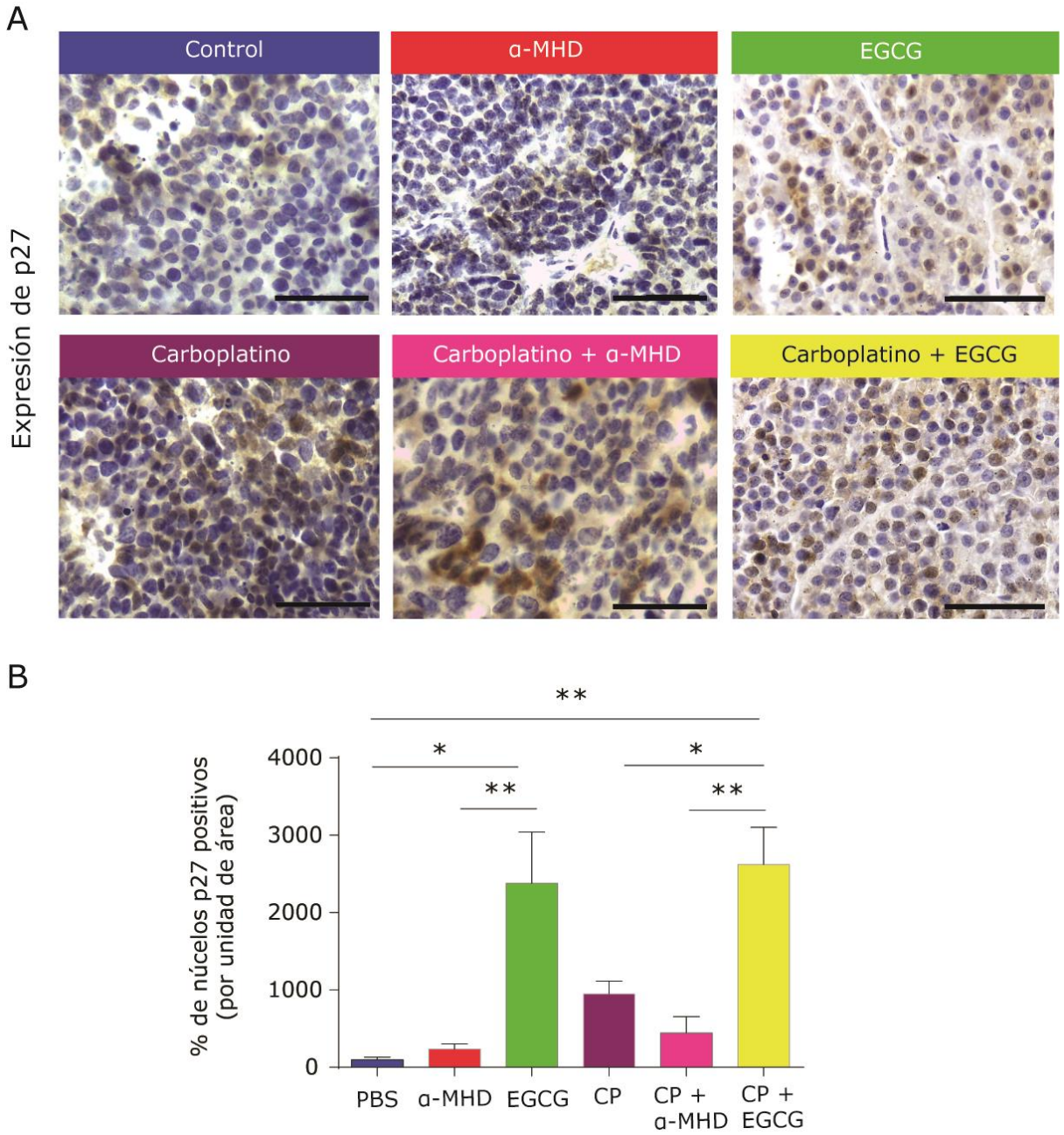


Figura R39. Expresión de p27 en tumores de CL-MA-10. Los tumores fueron procesados para inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para HDC se estudió su expresión en presencia del inhibidor α-MHD, solo o en combinación con CP a punto final del experimento. Se realizó un contraste con hematoxilina. La barra negra indica 50 µm. B. Se cuantificaron los núcleos positivos para p27 por unidad de área en 10 campos obtenidos con un aumento de 40x. Se grafica el porcentaje de núcleos positivos respecto al control. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ para el análisis de ANOVA de una vía con contraste de Tukey.

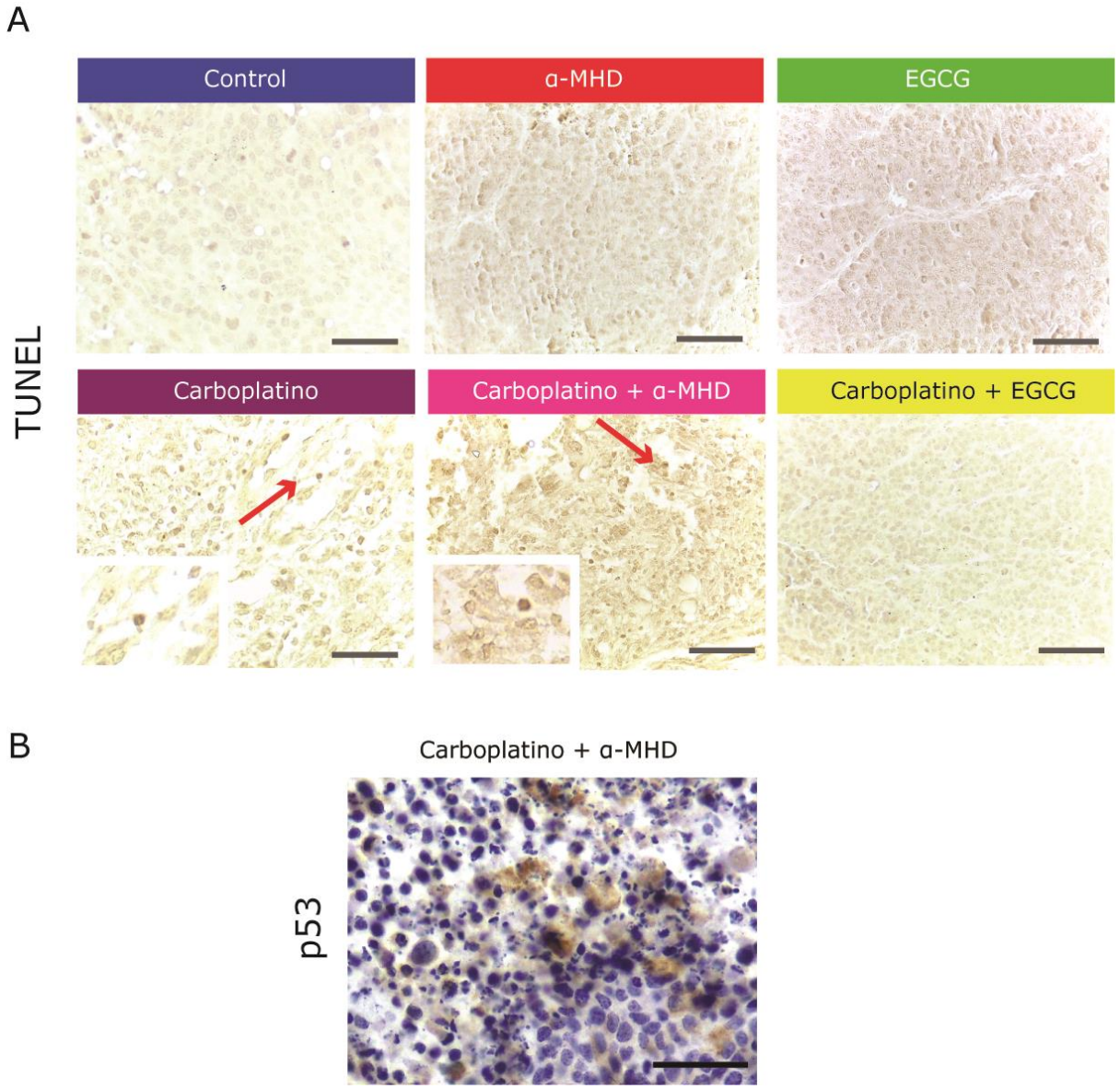


Figura R40. Análisis de apoptosis mediante la técnica de TUNEL en tumores de CL MA-10. Los tumores fueron fijados e incluidos en parafina para el análisis de núcleos apoptóticos con un kit comercial. Las flechas rojas indican TUNEL positivo. Las barras negras indican 50 µm. No se realizó contratinción para no obstruir las marcas positivas.

En el caso de los TCL de R2C, observamos que la expresión de p27 aumentó drásticamente en el tratamiento combinado de CP con EGCG, respecto al control y respecto al CP como agente único (**Figura R41 A y B**). El aumento de casi 800 veces por encima de los tumores control de p27, y su localización nuclear, indica que sería a

través de un arresto celular que estaría siendo inhibido el crecimiento de los tumores de CL R2C.

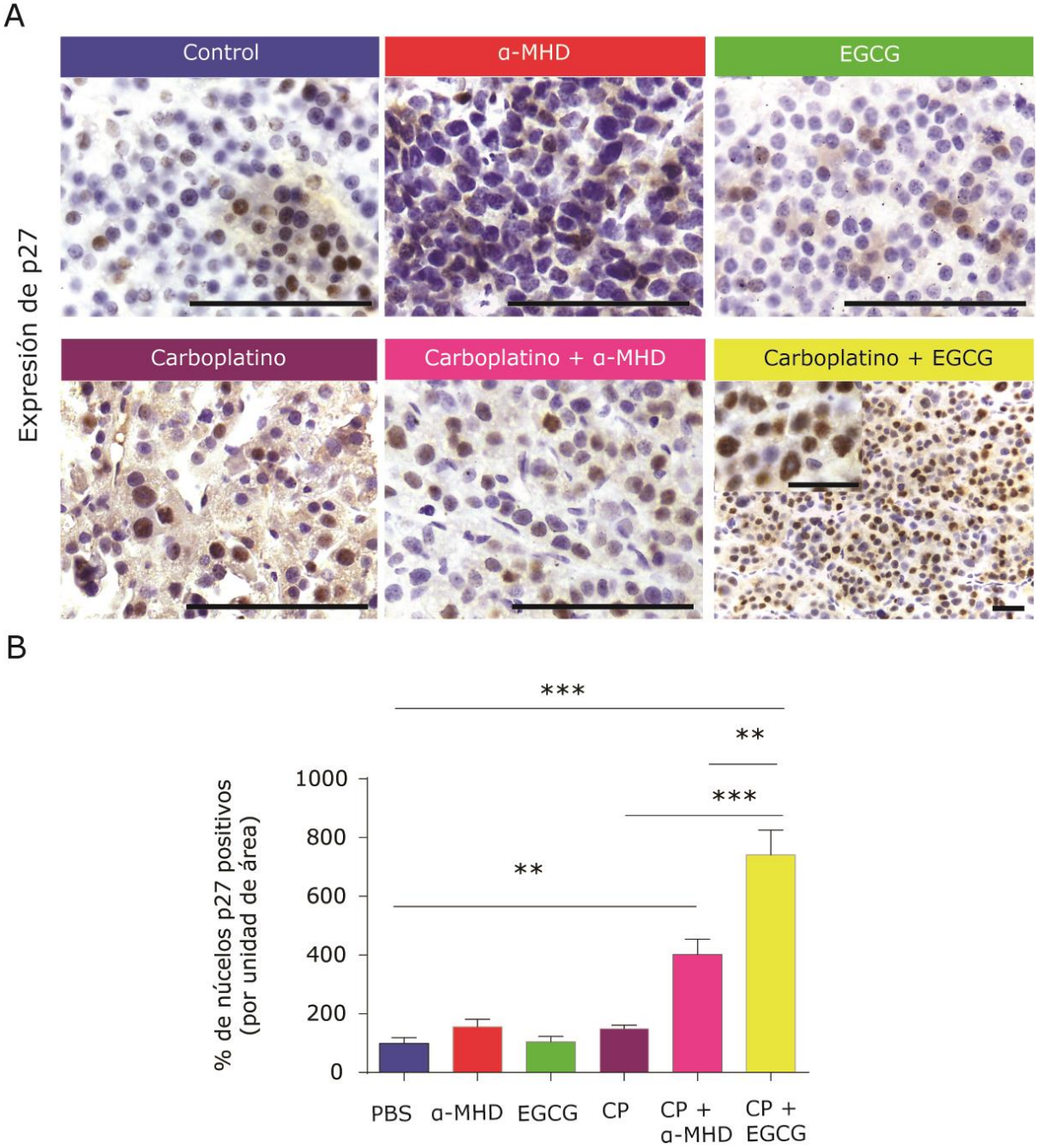


Figura R41. Expresión de p27 en ratones Swiss $^{Nu/Nu}$ con tumores de CL R2C. A. Función según la localización sub-celular de p27. En núcleo inhibe a quinasas dependientes de ciclinas deteniendo el ciclo celular en G0/G1, y en citoplasma es fosforilado, ubiquitinado y enviado a degradación. **B.** Los tumores fueron procesados para inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo específico para p27 se estudió su expresión en presencia del inhibidor α-MHD y el EGCG, solos o en combinación con CP a punto final del experimento. Se realizó un contraste con

hematoxilina. La barra negra indica 50 µm. **C.** Cuantificación de la expresión de p27 analizando el número de núcleos positivos por campo. Se realizó ANOVA de una vía con contraste de Tukey para analizar diferencias entre tratamientos. **, < 0,01; ***, < 0,001, respecto al control.

En el modelo de TCL R2C también observamos células apoptóticas, solamente en presencia de CP, y en bajo número, indicando así que no estaría siendo la vía apoptótica la causa de la disminución del tamaño de los tumores de CL R2C (**Figura R42**).

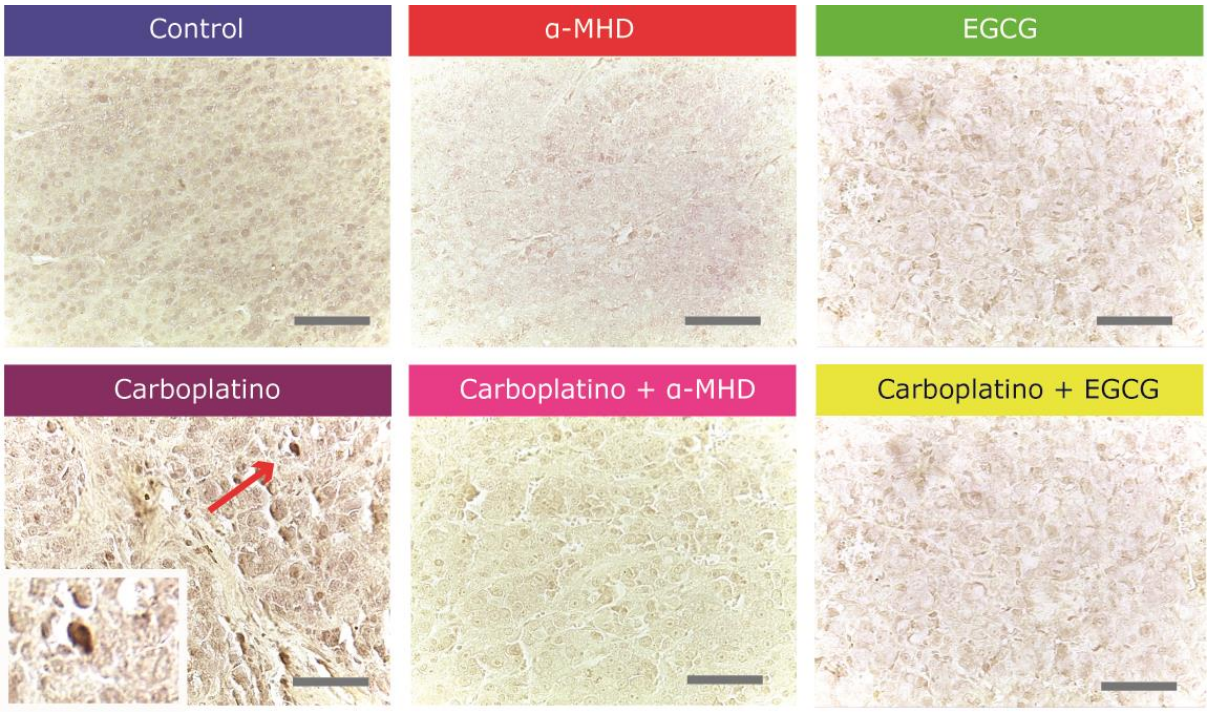


Figura R42. Análisis de apoptosis mediante la técnica de TUNEL en tumores de CL R2C. Los tumores fueron fijados e incluidos en parafina para el análisis de núcleos apoptóticos con un kit comercial. Las flechas rojas indican TUNEL positivo. Las barras negras indican 50 µm. No se realizó contratinción para no obstruir las marcas positivas.

2.3.3. Cuadro comparativo del efecto de los inhibidores en ambos modelos.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados obtenidos para cada modelo.

Tabla R2. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos para cada modelo de Leydigioma que evidencia las diferencias respecto a la eficiencia de los tratamientos en función del fenotipo de cada tumor. N/D: no determinado.

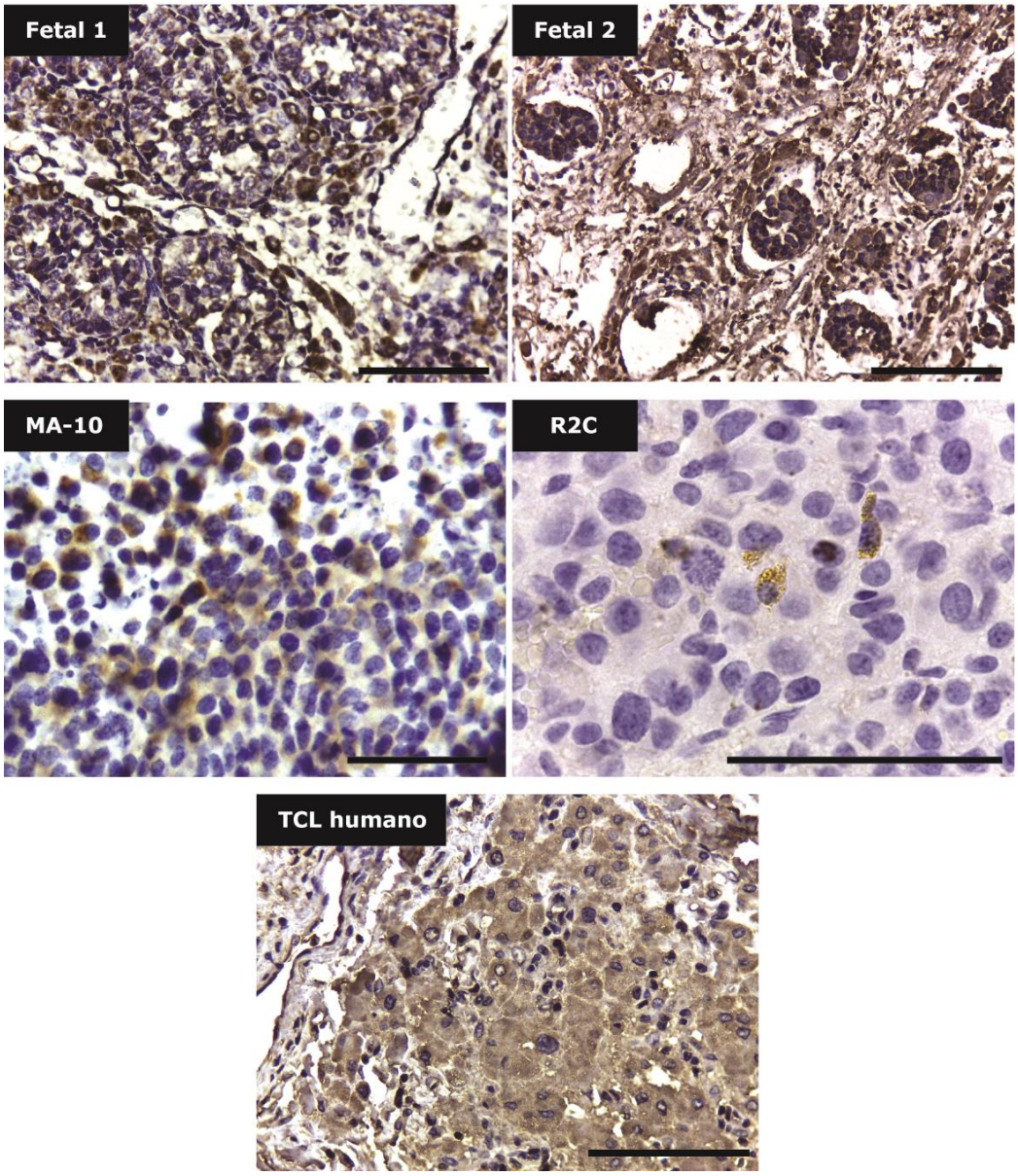
		Efectos *in vivo* sobre tumores establecidos a partir de las lineas celulares:		
	Técnica realizada	*Parámetro analizado*	**MA-10**	**R2C**
α-MHD	Medición de los tumores con calibre digital	Crecimiento tumoral	**Significativamente inhibido**	Débilmente inhibido
	IHQ y dosajes plasmáticos a punto final	Esteroidogénesis	Ausencia de efecto sobre la síntesis de P4	Síntesis de T y E2, y expresión de CYP19 inhibidas
	Coloraciones específias e IHQ en los tumores a punto final	Angiogénesis	Inhibida	N/D
		Expresión de HDC post tratamiento	**Altamente inhibida**	**Altamente inhibida**
		Contenido intratumoral de HA post tratamiento	Disminuido	Disminuido
		p27 nuclear	Aumentado	Aumentado
		Infiltrado del sistema inmune en microambiente tumoral	**Presente**	Ausente
		Apoptosis post tratamiento	No	No
EGCG	Mediciones en los tumores con calibre digital	Crecimiento tumoral	Ausencia de efecto	**Detenido en el caso del tratamiento combinado con CP**
	IHQ y dosajes plasmáticos a punto final	Modulación de esteroidogénesis	Ausencia de efecto sobre la síntesis de P4	Síntesis de T y E2, expresión de StAR y CYP19 inhibidas
	Coloraciones específias e IHQ en los tumores a punto final	Expresión de HDC	N/D	Aumentada
		Niveles endógenos de HA	Ausencia de efecto	Ausencia de efecto
		p27 nuclear	Aumentado	**Altamente aumentado**
		Infiltrado del sistema inmune en microambiente tumoral	Ausente	Ausente
		Apoptosis post tratamiento	No	No

Capítulo 2. Sección 4.

2.4. Posible origen fetal de los TCL.

Actualmente se desconoce el origen celular específico de los TCL. En el capítulo 1 se observó alta expresión de HDC en CL fetales durante el análisis de la ontogenia testicular (**Figura R1 y R43**), en concordancia con la alta expresión de HDC en los TCL (**Figura R2 y R43**). Es por ello que se planteó la posibilidad de que las células tumorales HDC positivas pudieran originarse en CL fetales y no en CL adultas.

Expresión de HDC



(Página anterior) Figura R43. Expresión de HDC en el intersticio testicular de dos pacientes en estadio fetal y en los TCL murinos. Se analizó la expresión de HDC en dos pacientes fetales utilizando un anticuerpo específico. La barra negra corresponde a 50 μM.

En primer lugar, se analizó la posibilidad de que las CL tumorales tuvieran su origen en las CL adultas. Uno de los marcadores descriptos en bibliografía que permite diferenciar a las CL fetales de las CL adultas es 11-β-HSD 1, enzima responsable de la síntesis de cortisol, que se expresa únicamente en las últimas. En cortes de tumor control de MA-10 y R2C se observó marcación positiva para esta enzima, sugiriendo así la posibilidad de que la población originaria del tumor esté compuesta por CL adultas (**Figura R44**), poniendo en duda la hipótesis planteada. Sin embargo, cuando se contrastó con un control de CL fetales (utilizando un testículo humano fetal) se observó marcación positiva para dicha enzima, en contradicción con la bibliografía.

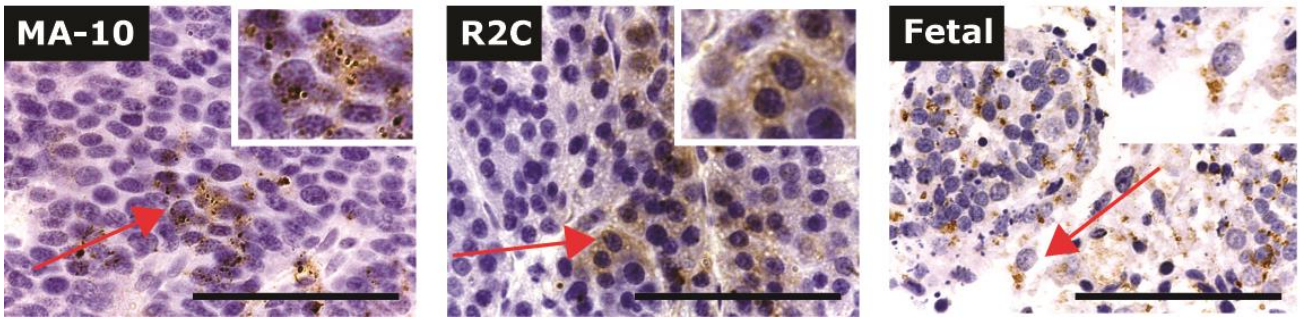


Figura R44. Expresión de 11β-HSD 1 en TCL de MA-10, de R2C y en controles fetales humanos. Utilizando un anticuerpo específico anti-11β-HSD se estudió su expresión en cortes de 7 μm de espesor. Se contracoloreó con hematoxilina. Las flechas rojas indican marca positiva y las barras negras indican 50 μm.

Recurrimos entonces a la marcación con CYP19, cuya sobreexpresión es una característica muy común en TCL, y que en CL adultas normales solamente se expresa en niveles bajos/basales. Pudimos observar una fuerte marcación de CYP19 en CL fetales

en cortes normales de dos testículos humanos (**Figura R45**), en concordancia con lo observado en los TCL murinos. Esto abre la posibilidad de que las CL tumorales puedan originarse a partir de CL fetales.

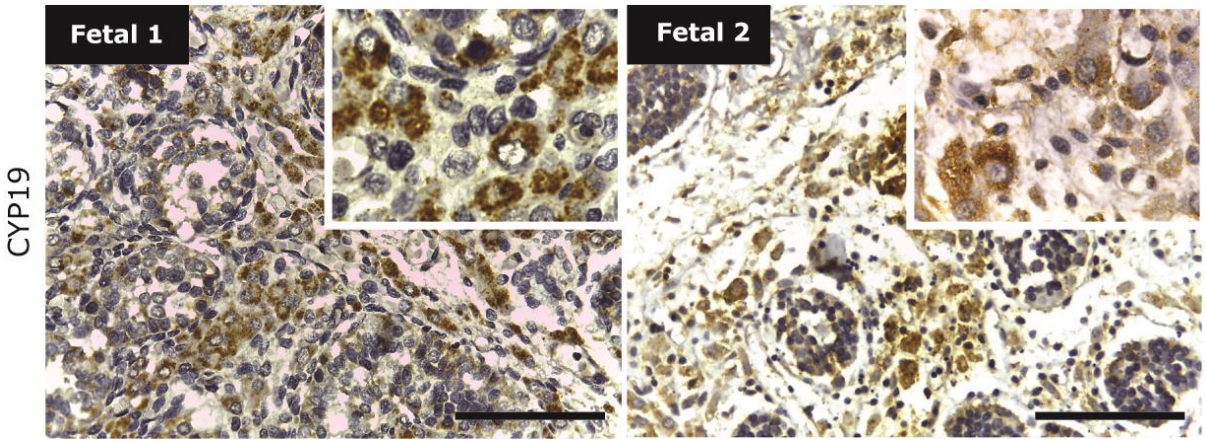
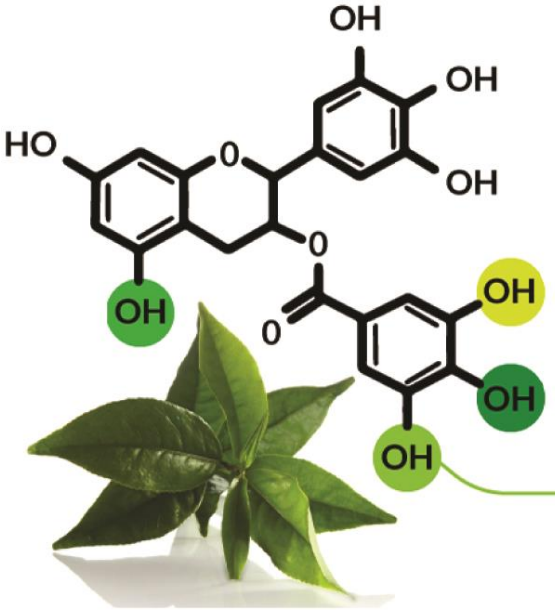


Figura R45. Expresión de CYP19 en controles fetales humanos. Utilizando un anticuerpo específico anti-CYP19 se estudió su expresión en cortes de 7 µm de espesor. Se realizó una coloración de contraste con hematoxilina. Las barras negras indican 50 µm.

Conclusiones parciales del capítulo 2.

- Los inhibidores de HDC son capaces de disminuir el crecimiento de los TCL, solos y en combinación con CP, en modelos murinos dependientes e independientes de gonadotrofinas. Al respecto, cabe destacar que inhibidor sintético α-MHD resulta efectivo en el primer caso, pero no en el segundo, mientras que lo opuesto se observa para el inhibidor natural, EGCG.
- En el modelo dependiente de gonadotrofinas, la inhibición de HDC no se traduce en un cambio en los niveles circulantes de esteroides, en tanto que sí se observa inhibición de la esteroidogénesis en el modelo independiente.
- Ninguno de los tratamientos propuestos en este trabajo resulta, al menos en los tiempos evaluados, nocivo para el estado general de los ratones.

- El mecanismo de acción de los inhibidores propuestos en este trabajo como agentes antineoplásicos involucraría la inducción de arresto celular, y no de apoptosis.



Discusión

Los TCL constituyen la neoplasia más frecuente del estroma testicular (Basciani y col, 2005; Ponce de León y col, 2000). Los pacientes portadores de estos tumores pueden presentar ginecomastia, disfunción eréctil, disminución de la libido, oligozoospermia, distribución femenina del vello púbico y/o atrofia testicular, y en niños suele observarse pseudo-pubertad precoz (Alagha y col, 2019; Kim y col, 1985; Shenker y col, 1993). Si bien se trata de tumores en su mayoría benignos, despiertan gran interés en la comunidad científico-médica debido a la limitada información existente acerca de su naturaleza exacta y su potencial metastásico. En este sentido, el período de vigilancia en los pacientes con TCL es indefinido, dado que se han reportado metástasis hasta nueve años después de removido el tumor primario (Caldamone y col, 1979; Kim y col 1985; Bertram y col, 1991, Ruf y col, 2020). Por otro lado, cuando los TCL malignizan son pobres respondedores a los tratamientos disponibles, y la sobrevida promedio se reduce a dos años (Basciani y col, 2005; Sirianni y col, 2009).

Según los registros provistos por la Dirección de Estadísticas e Información en Salud del Ministerio de Salud de La Nación, entre los años 2009 y 2016 (últimos datos disponibles) se registró un incremento en el número de defunciones por tumor maligno de testículo en establecimientos hospitalarios oficiales de la República Argentina. En concordancia, trabajos recientes señalan que la incidencia del cáncer testicular en el mundo ha aumentado significativamente, desconociéndose aún la causa (Vega y col, 2012; Gheorghisan-Galateanu y col, 2014). Puntualmente en la última década se incrementó notablemente el número de publicaciones relacionadas con los TCL, alcanzando un promedio de cien trabajos publicados por año (Fuente PubMed: "Leydig Cell Tumors"), aunque se trata en su mayoría de reportes de casos clínicos. Sumado a esto último, en el año 2011 se creó el Registro Internacional de Tumores Estromales de Ovario y

Testículo (https://www.otstregistry.org/) para promover las investigaciones acerca de este tipo de tumores en niños y adolescentes, lo cual subraya la vigencia del tema. En cuanto al tratamiento de los TCL, actualmente consiste en la resección del testículo en forma total o parcial, debiendo complementarse con quimioterapia y/o radioterapia según el estadio del tumor. Esto conlleva importantes consecuencias físicas y psicológicas para los pacientes (Shinn y col, 2010; Hayes-Lattin y col, 2009), pudiendo comprometer su fertilidad de manera temporal o permanente. En conjunto, lo descripto hasta aquí pone en evidencia la necesidad de ampliar nuestro limitado conocimiento acerca de la etiopatogenia de los TCL, a fin de identificar marcadores tumorales específicos, desarrollar alternativas terapéuticas que permitan preservar la gónada, y mejorar la calidad de vida y sobrevida de los pacientes con TCL malignos.

La HA es una amina biógena de acción pleiotrópica debido a la amplia distribución de sus cuatro subtipos de receptores (H1R, H2R, H3R y /o H4R) en el organismo, y al gran conjunto de células capaces de sintetizarla. Los diferentes efectos que ejerce en cada tejido responden a un rango de concentraciones específico, por lo tanto, una regulación minuciosa de los niveles de HA es imprescindible para un adecuado funcionamiento fisiológico. Desde un punto de vista patológico, en 1965 se propuso que la HA podría estar involucrada en procesos tumorigénicos (Kahlson y col, 1965), idea que sigue vigente y cobra fuerza hoy en día (Medina y col, 2010; Thangam y col, 2018, Kennedy y col, 2018), dado que se ha descripto elevada expresión de HDC y/o altos niveles de HA en diversos tipos de tumores, como ser melanoma (Hegyesi y col 2001), carcinoma de células pequeñas de pulmón (Graff y col, 2002), carcinoma mamario (García Caballero y col, 1994), cáncer de endometrio (Chanda y col, 2001), tumores pancreáticos endócrinos (Tanimoto y col, 2004) y carcinoma colorrectal (Cianchi y

col, 2006). A su vez, se ha demostrado que numerosas líneas celulares de cáncer humano, así como los tejidos tumorales, expresan al menos uno de los cuatro subtipos de receptores de HA (Medina y col, 2010; Pagotto y col, 2012). A través de estos receptores, la HA es capaz de regular diversas respuestas biológicas relacionadas con el crecimiento del tumor además de la proliferación celular, como la migración, la diferenciación, y la apoptosis (Blaya y col, 2010). Incluso se ha demostrado que la HA también puede actuar como un factor pro-angiogénico y estimular la producción de VEGF, influyendo así en el proceso de invasión tumoral y metástasis (Ghosh y col, 2001). Recientemente, el papel significativo de la HA en el desarrollo de tumores se ha hecho aún más evidente, dado que en diversas publicaciones se ha demostrado que está implicada en la modulación de la respuesta inmune antitumoral (Nicoud y col, 2019; Martin y col, 2014; O´Mahony y col, 2011).

En línea con los hallazgos descriptos en el párrafo anterior, en trabajos previos de nuestro laboratorio reportamos la sobreexpresión de HDC en las CL tumorales MA-10, las cuales también mostraron un aumento significativo en la actividad de la enzima en comparación con las CL normales (Pagotto y col, 2012), o respecto a los valores de actividad de HDC reportados para otros tipos celulares del testículo adulto normal (Safina, y col 2002). A su vez, la HA estimuló la proliferación de las CL MA-10, mientras que no tuvo efecto proliferativo alguno en las CL normales de rata. [1]

[1] Cabe aclarar que, dada la muy baja tasa de proliferación de las CL normales adultas, para estos experimentos se emplearon cultivos de CL normales inmaduras, aisladas y purificadas a partir de testículos de ratas de 35 días de edad, las cuales fueron capaces de responder al estímulo mitogénico de hCG e IGF-1, pero no a HA. Se obtuvieron resultados similares empleando CL normales progenitoras, obtenidas a partir de testículos de ratas de 21 días de edad.

En base a las consideraciones descriptas hasta aquí, en este trabajo se planteó investigar el papel de la HA en la progresión de los TCL, su efecto sobre la neo-angiogénesis tumoral, y la inhibición de HDC como potencial estrategia terapéutica, tanto para disminuir el tamaño tumoral como para evitar las complicaciones asociadas al tumor y a los tratamientos actuales.

En primer término, a fin de robustecer los resultados previos del laboratorio, repetimos los ensayos realizados en las CL tumorales de ratón MA-10 (que secretan como esteroide mayoritario progesterona ante la estimulación con LH/hCG), en un segundo modelo de Leydigioma con distinto fenotipo: las CL tumorales de rata R2C (que secretan estradiol de forma constitutiva). En estas células, la HA estimuló la proliferación celular, la neo-angiogénesis y la síntesis de esteroides *in vitro*. Además, las CL R2C presentaron elevada expresión de HDC, al igual que habíamos observado para las CL MA-10. Más aun, el efecto proliferativo de la HA en las CL R2C fue significativamente mayor que el ejercido por el IGF-1, que había sido señalado previamente por otros autores como factor de crecimiento autocrino en estas células (Sirianni y col, 2007). Sumado a esto, observamos en las CL R2C que el IGF-1 reguló los niveles de HDC en forma positiva. Esto podría estar relacionado con la existencia de una interacción cruzada entre las vías de señalización de IGF-1 e HA, considerando que se ha descripto que la HA reduce los niveles plasmáticos de IGF-1 en rata (Liao y col, 1999) y aumenta los niveles de su ARN mensajero en gliomas humanos (Van der Ven y col, 1997), promoviendo aún más el crecimiento tumoral. El hecho de que el IGF-1, que las CL R2C sintetizan en forma constitutiva y es uno de los factores responsables del mantenimiento del fenotipo tumoral, estimule la expresión de HDC, subraya la relevancia de nuestros resultados. Más aun, que la HA haya sido capaz de modular la proliferación de dos

líneas celulares con diferente fenotipo deja en evidencia la importancia del estudio de esta amina en relación con el desarrollo de TCL.

Como un primer abordaje para estudiar si la HA sintetizada en forma endógena por las CL tumorales R2C podría estar siendo utilizada para promover el propio crecimiento celular, incubamos dichas células con un inhibidor sintético de HDC, α-MHD. En presencia de este compuesto observamos una inhibición de la proliferación celular, efecto que se revirtió cuando agregamos HA en el medio de incubación. En función de estos resultados, la HA cumpliría un papel como factor de crecimiento autócrino en las CL tumorales, en concordancia con lo reportado en carcinoma mamario, glioma, cáncer gástrico y otros (Cricco y col, 1994, Rivera y col, 2000). Por otro lado, se sabe que más allá de sus acciones vía receptores de membrana (Parsons y col, 2009) o una interacción directa con el ADN (Scolnik y col, 1983; Young y col, 1971; Ruiz-Chica y col, 2006), la HA puede, como resultado del proceso de histaminilación mediado por la enzima TGM-2, asociarse a proteínas y de este modo modificar su conformación y/o actividad (Vowinckel y col, 2012). En este trabajo observamos que, en las CL R2C, la HA moduló positivamente la expresión del ARN mensajero de TGM-2 en forma concentración-dependiente. A su vez, los valores de HA liberados al medio de incubación por parte de las CL de MA-10 y R2C en cultivo fueron no detectables con el método utilizado. Así, si bien se requiere de experimentos adicionales para confirmarlo, estos resultados sugieren que la HA no estaría siendo liberada en forma masiva al espacio extracelular por las CL tumorales, y que podría ejercer una función intracelular mediante la histaminilación de residuos proteicos en dichas células, aunque desde ya no puede descartarse su acción clásica a través de receptores histaminérgicos de membrana. Observamos también marcación positiva para TGM-2 en otras patologías proliferativas como hiperplasia de CL, tumores de células de Sertoli y tumores

germinales, con lo cual podríamos estar en presencia de un mecanismo novedoso y relevante para la modulación de la proliferación celular.

A fin de evaluar la relevancia de los resultados obtenidos en las líneas celulares de origen murino, en el marco de la colaboración que nuestro laboratorio mantiene con médicos e investigadores del Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría Garrahan, estudiamos la expresión de HDC en TCL de pacientes pediátricos, debido a que, tal como se indicó en la introducción, el primer pico de incidencia de TCL se observa en la infancia. En este sentido, recientemente se ha reportado que el 6% de los niños pre-puberales presentan TCL (Alagha y col, 2019). Detectamos elevada expresión de HDC en todo el tejido neoplásico analizado para cada paciente, mientras que los cortes de testículos de niños sin TCL, pertenecientes al mismo estadio de maduración testicular, no mostraron expresión positiva para la enzima. En línea con los resultados de los experimentos *in vitro* en las CL MA-10 y R2C, estos hallazgos señalan la importancia de la presencia de altos niveles de HA a nivel local para la progresión tumoral. A su vez, en los TCL pediátricos observamos marcación positiva para TGM-2, en contraposición con controles normales de la misma edad, lo cual, sumado a lo anterior, destaca la utilidad de las CL tumorales murinas como modelos experimentales para la identificación de nuevos blancos terapéuticos en los TCL.

En otra serie de experimentos, y dada la limitada información existente en la bibliografía acerca del papel de la HA en el desarrollo testicular normal, estudiamos la expresión de HDC en testículos humanos de distintas edades. Observamos una mayor expresión de HDC en los estadios fetal y neonatal, la cual fue disminuyendo con la edad, para volver a aparecer durante la madurez gonadal. Dicha expresión diferencial durante los distintos estadíos de maduración del

testículo coincidió temporalmente con la presencia de CL funcionales (tanto fetales como adultas), capaces de sintetizar andrógenos. Más aun, los resultados de estos estudios se corresponden con observaciones previas de nuestro laboratorio acerca de la expresión de HDC y el contenido endógeno de HA durante la ontogenia testicular en ratón y rata (Pagotto y col, 2012; Mondillo y col, 2007), y sugieren la existencia de un estricto mecanismo de regulación de la expresión de HDC en las CL testiculares, conservado entre especies. A su vez, si bien es claro que deben realizarse experimentos adicionales para confirmarlo, es tentador especular a la luz de los resultados descriptos hasta aquí, que de ocurrir una alteración en el control de los niveles normales de expresión de HDC en las CL, podría desregularse la proliferación de las mismas y/o su función esteroidogénica.

Respecto al proceso de angiogénesis que típicamente acompaña a la progresión tumoral, se ha relacionado a la HA con la generación de nuevos vasos sanguíneos (Sörbo y col 1994, Norrby K, 1995, Qin y col, 2013; Mancinelli y col, 2009), a través de la regulación positiva del factor pro-angiogénico VEGF-A (Ghosh y col, 2002), o a través de la modulación de fibrinógeno por histaminilación en células endoteliales (Lai y col, 2012). Teniendo en cuenta estas evidencias, para evaluar la capacidad proangiogénica de los TCL pediátricos con alta expresión de HDC, obtuvimos MC a partir de cultivos primarios de dichos tumores y realizamos experimentos de angiogénesis *in vitro* empleando células HUVEC. Dado que estas células sólo proliferan en presencia de factores que estimulen la formación de nueva vasculatura (Haro Durand, 2014), y que los MC de los TCL estimularon la proliferación de las mismas, es razonable concluir que los TCL pediátricos son tumores con alta capacidad pro-angiogénica. Replicamos estos ensayos empleando el modelo de CL R2C y obtuvimos resultados similares. Posteriormente, para estudiar si la HA podía ser uno de los factores pro-angiogénicos secretados por las

CL tumorales, realizamos nuevos experimentos de angiogénesis *in vitro* empleando MC obtenidos a partir de CL R2C pre-tratadas con el inhibidor de HDC α-MHD, y observamos una reversión parcial del efecto inducido por los MC correspondientes a las CL R2C sin pre-tratamiento con el inhibidor. A su vez observamos que la HA estimula de forma directa la proliferación de células HUVEC. En línea nuestros hallazgos, se ha reportado que ratones con el gen *hdc* noqueado presentan una angiogénesis deficiente (Ghosh y col, 2002). Por su parte, Samson y col, 2004 han descripto que las CL son capaces de sintetizar factores proangiogénicos, tanto en condiciones normales como patológicas, desde estadios fetales hasta estadios adultos. Además, se ha reportado que las CL MA-10 sintetizan y liberan VEGF-A (Kumar y col, 2011), y se sabe que los tejidos de naturaleza endócrina sintetizan y secretan un factor de crecimiento de endotelio vascular específico, llamado EG-VEGF (Ferrara y col, 2004). Este factor podría ser secretado por los TCL, a la vez que, según reportes previos, estaría involucrado en el desarrollo tumoral (Samson y col, 2004, Corlan y col, 2017). En función de nuestros resultados, el E2 y el IGF-1 no serían los responsables de este efecto estimulatorio de la angiogénesis. Teniendo en cuenta lo expuesto en este párrafo, si bien es altamente probable que las CL tumorales secreten más de un factor pro-angiogénico, nuestros resultados señalan que la HA liberada por las CL tumorales cumpliría un papel en la producción de nuevos vasos sanguíneos, además de modular la proliferación celular.

Teniendo en cuenta las evidencias de este trabajo que señalaban a la HA como factor de crecimiento autócrino en las CL tumorales, decidimos inhibir farmacológicamente a HDC y estudiar los efectos de dicha inhibición sobre la biología de las CL tumorales *in vitro*, como una primera aproximación para evaluar la posible utilidad de HDC como blanco terapéutico. A tal fin, realizamos nuevos

experimentos con el inhibidor sintético α-MHD, y complementamos dichos ensayos con un segundo inhibidor de HDC, pero de origen natural: el EGCG. Como describimos previamente, el EGCG es el principal componente del té verde, para el cual se conocen múltiples beneficios. Cabe destacar que en los últimos años ha crecido notablemente el número de publicaciones relacionadas con EGCG (alcanzando hasta 500 trabajos por año, fuente PubMed: "EGCG"), como también el número de estudios clínicos en los que se lo ha empleado como agente terapéutico para diversas patologías incluyendo distintos tipos de cáncer (106 estudios en proceso y completados, de los cuales 102 son de intervencionales y no observacionales, y 12 de ellos son en niños; Fuente: Clinicaltrials.gov).

Los dos inhibidores, sintético y natural, fueron capaces de disminuir la proliferación de ambas líneas de CL tumorales *in vitro*. En concordancia, se había reportado previamente que α-MHD era capaz de inhibir la proliferación celular en colangiocarcinoma humano (Francis y col, 2012), y en este trabajo, demostramos que α-MHD también resulta eficaz para el control del crecimiento de las CL tumorales. Al combinar los inhibidores con el agente quimioterápico CARBOPLATINO, no observamos efectos aditivos ni sinérgicos sobre la proliferación celular. Sin embargo, esto no invalida su potencial uso en la clínica, dado que *in vivo* la inhibición de HDC podría tener otros efectos más allá del control del crecimiento tumoral, como por ejemplo a nivel del sistema inmunitario, que pudieran ser beneficiosos para la terapia. Además, más allá de la falta de aditividad y/o sinergismo sobre la proliferación celular descripta aquí, y a favor de la realización de un abordaje terapéutico de TCL basado en la combinación de CARBOPLATINO con inhibidores de HDC, se ha publicado que el efecto de los derivados de platino solo disminuye parcialmente el tamaño tumoral en experimentos *in vivo* (Chimento y col, 2013).

Entre otros mecanismos relacionados con la progresión tumoral, cabe destacar que los TCL se caracterizan por la sobreproducción de esteroides, responsables de los síntomas que se observan en los pacientes. En este trabajo observamos que la inhibición de HDC resultó en una disminución de los niveles de progesterona sintetizados en respuesta a db-AMPc en CL MA-10, y de progesterona y estradiol en CL R2C, lo cual se corresponde con reportes previos de nuestro laboratorio en los que describimos que las CL de ratones con el gen *hdc* noqueado sintetizan menos andrógenos (Mondillo y col, 2007). En las CL R2C, el efecto de la inhibición de HDC se ubicaría río arriba de CYP19 en el camino esteroidogénico, dado que, si bien observamos modificaciones en la expresión del ARN mensajero de dicha enzima, no detectamos cambios en su actividad. En concordancia, existen reportes que indican que la HA no tiene efecto directo sobre la aromatización de testosterona (Verhoeven y col, 1979).

En la clínica, los pacientes portadores de TCL son tratados de rutina con el mismo esquema terapéutico, sin tener en cuenta que existen distintos fenotipos tumorales (Bhat y col, 2013; Papadimitris y col, 2000). Es por ello que en este trabajo decidimos realizar estudios *in vivo* en dos modelos distintos de TCL, generados empleando las dos líneas de CL tumorales que habíamos utilizado para los experimentos *in vitro*, puesto que poseen características diferenciales: las CL MA-10 dependen de la activación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal para sintetizar esteroides, mientras que las CL R2C presentan esteroidogénesis constitutiva, independiente de la estimulación vía LH/hCG.

Durante el establecimiento de ambos modelos, observamos que el crecimiento de este tipo de tumores, generados a partir de la inyección subcutánea de las CL tumorales, fue muy rápido. Se registraron tiempos de duplicación de 4 días en promedio para ambos casos. Según la información disponible en la bibliografía, los TCL son normalmente benignos (Basciani y col, 2005) y de lento crecimiento, con lo cual se diagnostican ya alcanzado un tamaño considerable, cuando los síntomas son notables. Sin embargo, los TCL malignos provenientes de recidivas son de rápido crecimiento (Geminiani y col, 2015) y se asocian a un muy mal pronóstico, ya que, a diferencia de los tumores que se originan en la línea germinal, son pobres respondedores a las terapias disponibles (Basciani y col, 2005). Si de cáncer se trata, se sabe que, en general, los tiempos de duplicación cortos están relacionados con metástasis, y que además, paradójicamente, estos tumores son menos sensibles a la quimioterapia (Miura y col, 2019; Mitchison T, 2012). Así, teniendo en cuenta estas evidencias, es razonable especular que los dos modelos de TCL murino empleados en este trabajo posean un comportamiento comparable a los TCL malignos, aunque no evaluamos la presencia de metástasis. En ambos modelos se registraron altos niveles de esteroides circulantes como signo característico de la presencia del TCL, lo cual mimetiza lo que se observa en la clínica.

Dado que, como se explicó previamente, la quimioterapia *per se* no es suficiente para lograr un efectivo tratamiento de los TCL en la clínica, en este trabajo se propuso evaluar la eficacia *in vivo* de un tratamiento alternativo, combinando el agente quimioterápico CARBOPLATINO con inhibidores de HDC. Para ello, se utilizaron los inhibidores de HDC empleados en los experimentos *in vitro*: α-MHD y EGCG.

En los tumores generados a partir de CL MA-10, dependientes del eje-hipotálamo-hipofisario-gonadal para sintetizar esteroides, se observó que el tratamiento con CARBOPLATINO como único agente fue efectivo para enlentecer el crecimiento tumoral, pero no lo detuvo completamente. Sin embargo, al combinarlo con α-MHD (en las dos concentraciones estudiadas), se observó una potenciación de este efecto, obteniéndose mejores resultados. En el capítulo 1, página 109, de este trabajo se presentaron hallazgos que sugieren que la HA cumpliría un papel importante como factor de crecimiento autócrino en las CL tumorales, lo cual se corresponde perfectamente con el hecho de que α-MHD como único agente, en dosis de 40 mg/kg, disminuyó el crecimiento tumoral, y con los bajísimos niveles de HA endógena y de expresión de HDC que observamos en los cortes de estos tumores (resultados presentados en el Capítulo 2, páginas 132, 139 y 140). Estas observaciones señalan que la inhibición de la síntesis de HA en los tumores, mediada por α-MHD, tendría un efecto directo sobre el crecimiento de los TCL. A su vez, α-MHD podría contribuir a mejorar la efectividad misma del CARBOPLATINO en forma indirecta. En este sentido, existen trabajos que describen la ocurrencia de una reacción anafiláctica en respuesta al tratamiento con CARBOPLATINO (Windom y col 1992) y otros que demuestran que el CARBOPLATINO mismo activa la liberación de HA por parte de basófilos y de mastocitos en un modelo murino (Arnaez y col, 1992). Además, se ha reportado el pre-tratamiento de pacientes adultos con cáncer con bloqueantes de los receptores de HA para evitar reacciones al CARBOPLATINO (Moreno Ancillo y col, 2003; Mach y col, 2016; Jerzak y col, 2016), y más recientemente de pacientes pediátricos (Ruggiero y col, 2017). Sumado a esto, se ha reportado que existen mecanismos de resistencia al CARBOPLATINO, como por ejemplo la regulación de c-fos a través del aumento se su expresión en respuesta al daño al ADN, que pueden ser revertidos utilizando fármacos complementarios (Doz y Pinkerton, 1994; Stewart, 2007). Dado que se ha reportado que la HA aumenta los niveles de c-fos a través

de su receptor HRH2 (Shayo y col, 1997), la inhibición de su síntesis podría estar evitando la resistencia a CARBOPLATINO a través de esta vía. Desde ya, se requiere de experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

En cuando al EGCG, no observamos efecto sobre el crecimiento de estos tumores al administrarlo de forma sistémica, ni como único agente ni al combinarlo con CARBOPLATINO. Es por ello que decidimos cambiar la forma de administración, teniendo en cuenta que los tumores que se desarrollan en el testículo son en general de fácil acceso dada la ubicación del órgano, y que la aplicación de inyecciones intratumorales podría ser una opción terapéutica potencialmente viable en la clínica. En esta nueva serie de experimentos *in vivo*, se aplicaron inyecciones de EGCG directamente en el tumor, utilizando un volumen mínimo (20 µl) para evitar edemas y manteniendo la inyección semanal de CARBOPLATINO intraperitoneal, como se realiza de rutina. En este caso, no solo no observamos ningún efecto del EGCG sobre el crecimiento tumoral, sino que el CARBOPLATINO no fue efectivo, a diferencia de lo observado con los otros esquemas. Es probable que las inyecciones intratumorales de EGCG hayan generado daños mecánicos en los TCL, resultando en una mayor dispersión en los valores correspondientes a las mediciones del tamaño tumoral, enmascarando el efecto significativo del CARBOPLATINO. Al margen de la falta de eficacia del EGCG- ya sea administrado en forma intratumoral o intraperitoneal- para inhibir el crecimiento tumoral en este modelo de TCL en los tiempos evaluados, es razonable suponer que administrándolo en forma intraperiteoneal y repitiendo los ensayos a tiempos más largos podría verse algún efecto positivo, dada la vasta información existente sobre sus efectos anti-cancerígenos, anti-oxidantes y protectores, no solo a nivel tumoral, sino a nivel del resto de los órganos afectados por los tratamientos utilizados en la clínica (Chu y col, 2017).

Se sabe que la angiogénesis es un proceso clave en el desarrollo del cáncer. Para el EGCG ya existían reportes que lo situaban como inhibidor de dicho proceso, tanto *in vitro* en células endoteliales (Jung y col, 2001), como *in vivo* en el modelo de CAM de huevos de codorniz (Sidiqqui y col, 2009). Para el α-MHD, por su parte, no existe bibliografía que demuestre algún efecto pro- o anti-angiogénico. En este trabajo observamos que, tanto solo como en combinación con CARBOPLATINO, α-MHD inhibió la expresión tumoral de dos marcadores de endotelio vascular: PeCAM y α-actina. Dado que la HA está íntimamente relacionada con la modulación de la angiogénesis, era esperable observar un efecto de este tipo. Cabe destacar que, a diferencia de lo que puede concluirse a partir de los ensayos *in vitro*, en donde solamente está presente la línea celular tumoral, en los ensayos *in vivo* existe la posibilidad de incluir en el análisis a otros tipos celulares asociados al tumor. Al menos en tumores testiculares derivados de la línea germinal, la regulación de la angiogénesis no está únicamente dada por factores pro-angiogénicos secretados por las propias células tumorales, sino que existe una contribución por parte de otros tipos celulares (Díez-Torre y col, 2010). Puntualmente, en los TCL generados a partir de CL MA-10 observamos marcación positiva para macrófagos. En cuanto a estos últimos, se ha descripto que existen dos poblaciones diferentes: aquellos asociados al tumor y aquellos que aparecen en respuesta a la presencia del tumor, como parte de la reacción del sistema inmune. Los macrófagos asociados al tumor serían responsables de estimular el proceso de angiogénesis y la invasión tumoral (Noy y col, 2014). Dado que poseen receptores a HA (Triggiani y col, 2001), es razonable especular que, al tratar los tumores con inhibidores de HDC, podríamos también estar evitando la activación de dichos macrófagos.

Cabe recordar que, para establecer el modelo de TCL generados a partir de CL MA-10, en este trabajo se emplearon ratones provenientes de la cruza de BALB/c x C57BL/6, que no poseen ningún tipo de deficiencia a nivel inmunológico. Así, en cuanto a la activación del sistema inmune, pudimos observar para el tratamiento combinado con CARBOPLATINO y α-MHD la presencia de grandes células multinucleadas distribuidas en todo el tejido tumoral, lo cual no se observó para los otros tratamientos. Se sabe que una de las estrategias para el tratamiento de tumores consiste en la potenciación de la respuesta del sistema inmune con el fin de que actúe directamente sobre el tejido neoplásico (Qu y col, 2020), así como también en la reversión del proceso de escape tumoral que poseen muchos tipos de cáncer (Triaca y col, 2019). La presencia de un infiltrado distinto en los tumores control en comparación con los tratados, particularmente en el caso del tratamiento combinado que resultó más efectivo, sugiere una posible estimulación de células del sistema inmune para invadir el tejido y así poder procesar antígenos presentes en el tumor. Dado que los receptores a HA se distribuyen extensamente en el sistema inmune, y que la HA ejerce un importante rol en la regulación del mismo (Komi y col, 2019; Nicoud y col, 2019), es razonable especular que la inhibición de HDC por α-MHD pudiera estar modificando las poblaciones de células inmunológicas asociadas al tumor.

Los TCL obtenidos a partir de CL R2C, independientes del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal para sintetizar esteroides, fueron sumamente susceptibles al tratamiento combinado de CARBOPLATINO y EGCG, en contraste con lo observado para los TCL generados a partir de CL MA-10. Por su parte, en este modelo el α-MHD solamente mostró un efecto débil al combinarlo con CARBOPLATINO. El hecho de que los TCL generados a partir de CL R2C no presenten alta expresión de HDC, a diferencia de lo que observamos en los

ensayos *in vitro* en las CL R2C, ofrece una explicación razonable para la baja efectividad de α-MHD *in vivo* en este modelo. En cuanto al EGCG, su gran eficacia como agente antitumoral en estos tumores no estaría relacionada con la inhibición de la síntesis de HA o su liberación al medio extracelular, dado que observamos que, tanto el tratamiento con EGCG solo como combinado con CARBOPLATINO, aumentaron la expresión de HDC y de VMAT-2. Cabe destacar en este punto que los TCL generados a partir de CL R2C presentan alta expresión de CYP19, y se ha reportado que el EGCG es capaz de inhibir dicha enzima (Satoh y col, 2002). Además, estos tumores también expresan niveles elevados de StAR, y en este trabajo observamos por IHQ que el tratamiento con EGCG disminuyó los niveles de esta enzima (a la fecha no existe bibliografía que reporte este efecto). Estos resultados sugieren que el EGCG podría ejercer un efecto tanto a nivel de CYP19, afectando la aromatización de andrógenos, como río arriba, inhibiendo la síntesis *de novo* de esteroides. Esta hipótesis también se sustenta en lo observado para los esteroides circulantes: el EGCG disminuyó casi en su totalidad los niveles patológicos de estradiol y testosterona, tanto solo como en combinación con CARBOPLATINO. Así, en pacientes portadores de TCL con un fenotipo similar al de las CL R2C, una terapia combinada con EGCG y CARBOPLATINO no sólo podría reducir con gran eficacia el tamaño tumoral, sino que también actuaría en forma directa sobre los esteroides causantes de la desregulación endócrina, responsable de la mayoría de los síntomas asociados a los TCL.

Más allá de que el tratamiento combinado con CARBOPLATINO y EGCG esté actuando a nivel de uno de los mecanismos fundamentales para mantener el crecimiento tumoral en este modelo- la síntesis y utilización de estradiol por parte de las propias CL tumorales-, no puede descartarse un efecto de EGCG como potenciador de la eficacia misma del CARBOPLATINO. En la bibliografía se han

descripto diferentes vías de resistencia a la terapia con CARBOPLATINO en las células tumorales, entre ellas: 1) la reducción de la entrada del CARBOPLATINO en las células tumorales; 2) mecanismos que restauran el daño ocasionado por el CARBOPLATINO sobre el ADN, en los que participa la enzima topoisomerasa; 3) el secuestro de CARBOPLATINO dentro del citoplasma, mediado por glutatión reducido (GSH), disminuyendo así la proporción de CARBOPLATINO que podría tener efecto en la célula tumoral; 4) la modulación de oncogenes como *ras, myc* y *fos*, cuya presencia ha sido relacionada con la resistencia a compuestos derivados de platino (Doz y Pinkerton, 1994; Stewart, 2007). Con respecto al primer punto, se ha publicado que el EGCG aumenta la entrada de cisplatino hacia las células tumorales a través de la modulación del transportador CTR1 en cáncer de ovario y en cáncer de pulmón (Wang y col, 2015; Chen y col, 2020), incrementando así su eficacia. El CTR1 también es responsable del transporte de CARBOPLATINO hacia el interior celular (Holzer y col, 2006). A su vez, se ha reportado que el EGCG inhibe a la enzima topoisomerasa I, responsable de evitar el daño al ADN producido por el CARBOPLATINO, en carcinomas de colon (Berger y col, 2001). Asimismo, se ha publicado que el EGCG disminuye los niveles de GSH intracelular en adipocitos (Wang y col, 2009). Por último, en cuanto a la modulación de los oncogenes relacionados con la resistencia al CARBOPLATINO, se ha publicado recientemente que EGCG inhibe la vía de *ras* (Wu y col, 2019), la inducción de *fos* relacionada a la exposición a rayos ultravioletas en una línea celular de queratinocitos (Chen y col, 1999) e inhibe a la expresión del mensajero de *c-myc* en células de tumor mamario y cáncer de piel (Kim y col, 2006; Singh y col, 2013). La potenciación con EGCG de las terapias basadas en compuestos derivados de platino ha sido reportada por Lee y colaboradores en donde se observó que en células madre tumorales responsables de cáncer de cabeza y cuello el tratamiento combinado es más efectivo (Lee y col, 2013). Si bien en este trabajo no se abordó el estudio de estos mecanismos, cabe especular que uno o más de ellos podría ser responsable

de la gran eficacia del tratamiento combinado con CARBOPLATINO y EGCG en este modelo.

Previamente se ha reportado que, si bien el cisplatino resulta efectivo para el tratamiento de TCL, conlleva daños notables en la integridad testicular (Chimento y col, 2013). En este trabajo no observamos efectos nocivos del CARBOPLATINO sobre la integridad testicular en ninguno de los dos modelos de TCL empleados, ni a nivel del tamaño de la gónada ni a nivel histológico, siendo su eficacia como agente anti-TCL comparable a la del cisplatino. Tampoco observamos daño testicular en presencia de los tratamientos combinados. Por otra parte, se ha publicado que la liberación masiva de HA inducida por el compuesto 48/80 produciría daños en la barrera hematotesticular en rata (Nemetallah y col, 1985). A su vez, el exceso de HA a nivel del cerebro puede conducir a una sobreactivación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Niaz y col, 2018), lo cual conllevaría un amento en la síntesis de andrógenos, asociado a problemas de infertilidad. Si bien en este trabajo no observamos liberación masiva de HA al medio extracelular por parte de las CL tumorales *in vitro*, no podemos descartar que, de ocurrir una liberación descontrolada de HA por parte de los TCL, esto podría afectar la integridad testicular. En este sentido es que una terapia combinada con inhibidores de HDC podría resultar protectora de la integridad de las gametas en el caso de los TCL con elevada expresión de HDC.

A fin de identificar el/los mecanismo/s involucrado/s en la inhibición del crecimiento tumoral observada en ambos modelos, analizamos la expresión de p27 por inmunohistoquímica, en cortes de los tumores extirpados a los ratones. Se sabe que altos niveles de esta proteína inhiben la progresión del ciclo celular, conduciendo a un arresto en G1. En este trabajo observamos que los tratamientos

que resultaron efectivos en cada modelo de TCL aumentaron la expresión de p27 nuclear, sugiriendo que una de las vías de control del crecimiento celular sería la inducción de arresto celular. Complementamos estos estudios evaluando apoptosis por TUNEL. Prácticamente en ningún corte de tumor observamos marcación positiva para núcleos apoptóticos. Si bien se ha descripto que el EGCG estaría involucrado en la inducción de apoptosis en diversos modelos (Chen y col, 2019), en este trabajo sólo detectamos núcleos apoptóticos en el caso de los cortes de tumor correspondientes al tratamiento con CARBOPLATINO o la combinación de CARBOPLATINO con α-MHD en TCL derivados de CL MA-10, los cuales se vieron acompañados de marcación positiva para p53, proteína relacionada también con el proceso de apoptosis. Con base en publicaciones previas que señalan que la HA no modula los niveles de p53 (Cricco y col, 2006), es probable que los cambios observados en la expresión de dicha proteína se deban únicamente al CARBOPLATINO.

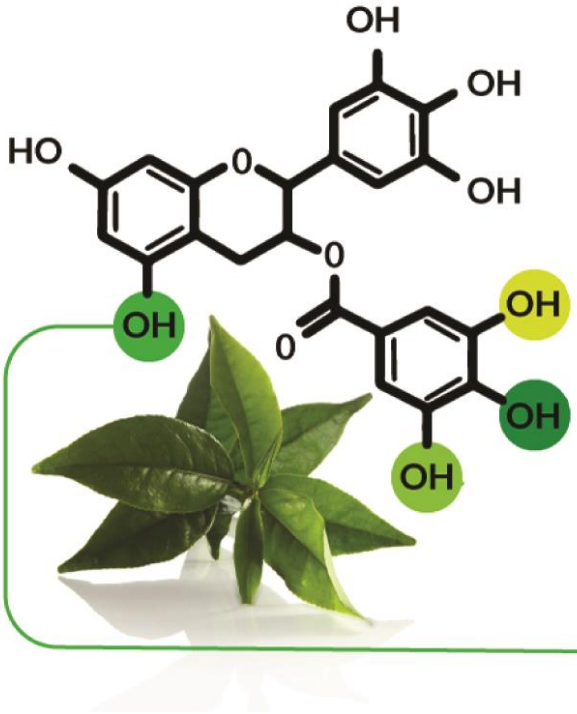
Teniendo en cuenta los resultados descriptos hasta aquí, la idea de emplear inhibidores de HDC para el tratamiento de TCL que se propone en este trabajo resulta prometedora, no sólo por el efecto de estos inhibidores sobre el crecimiento del tumor mismo, sino también por la posibilidad de modular mediante estos compuestos la respuesta del sistema inmune y la síntesis de esteroides, responsables de la mayoría de los síntomas presentes en los pacientes. De todos los tratamientos evaluados, el que resulta más promisorio con miras a una futura aplicación clínica es el que consiste en la combinación de CARBOPLATINO y EGCG, al menos para el caso de los TCL que sobreexpresen CYP19, debido a que detuvo casi por completo el crecimiento tumoral en los tiempos experimentales. Recordemos que el cisplatino, si bien es efectivo para detener el crecimiento de múltiples tipos de tumor, conlleva efectos adversos de alta complejidad: produce

daño neurológico, particularmente a nivel de oído de forma irreversible (Rybak y col, 2007), efectos a nivel cardíaco (Stefenelli y col, 1988; Patané y col, 2014) y disminución de la síntesis de testosterona (Bandak y col, 2016). La farmacocinética del CARBOPLATINO le otorga una ventaja como agente antitumoral frente al cisplatino. En este sentido, se sabe que solamente la proporción de los compuestos derivados de platino que circula libre en sangre es capaz de ingresar en las células tumorales, a diferencia del porcentaje que circula asociado a proteínas. Dado que el CARBOPLATINO se asocia más lentamente que el cisplatino a proteínas, el resultado es una proporción más alta de compuesto biodisponible. Sumado a esto, el CARBOPLATINO causa menos náuseas y vómitos que el cisplatino, proporcionando una mejor calidad de vida durante el tratamiento. Además, posee una vida media más larga y se elimina más rápidamente por la orina una vez filtrado (Doz y col, 1993; Stewart, 2007). Estas consideraciones, sumadas a todas las expuestas a lo largo de esta Discusión, sitúan al CARBOPLATINO como un agente prometedor para el tratamiento de TCL en presencia de compuestos que potencien su efecto. La utilización de este tipo de estrategia terapéutica favorecería la realización de cirugías conservativas en lugar de una orquiectomía radical, con resultados beneficiosos y minimizando los efectos adversos detallados en la Introducción.

En conjunto, los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* llevados a cabo en este trabajo demuestran por primera vez la participación de la HA en el desarrollo de los TCL, no sólo como moduladora de la proliferación de las CL tumorales, sino también regulando la síntesis de factores clave para el mantenimiento del fenotipo tumoral, como el estradiol. A su vez, los hallazgos que aquí se describen revelan la importancia de la HA en el proceso de angiogénesis que acompaña la progresión y el establecimiento de los TCL. Finalmente, el

presente trabajo sienta las bases para el diseño de una terapia anti-TCL basada en la utilización de inhibidores de HDC, que permitirá mejorar la eficacia de los tratamientos convencionales, minimizando los efectos colaterales de los mismos. En este sentido, en función de lo observado en los ensayos *in vivo* con respecto a la eficacia diferencial de las distintas combinaciones de drogas en los dos modelos empleados, y con miras a la aplicación clínica de estas combinaciones, resultará imprescindible como primera medida establecer el fenotipo de TCL en cada paciente, a fin de elegir qué inhibidor de HDC será más conveniente incluir en el plan terapéutico, para asegurar el éxito de este. Particularmente en cuanto al EGCG, las publicaciones relacionadas con su efecto protector sobre las gametas masculinas en pacientes sometidos a tratamientos oncológicos subrayan la importancia del presente trabajo, y validan su empleo en combinación con las terapias de rutina.

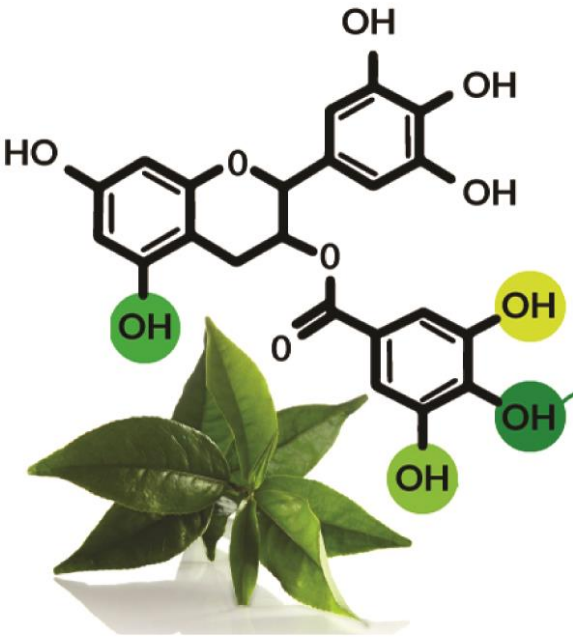
Más allá de los TCL, en este trabajo también se observó elevada expresión de HDC en tumores de células de Sertoli, hiperplasias de CL y tumores germinales, dando cuenta de la importancia del estudio de esta enzima en el contexto de este tipo de patologías, y abriendo las puertas a otras líneas de investigación en las que HDC pueda ser blanco de terapias.



Conclusiones

El presente trabajo permite concluir los siguientes puntos:

- La HA está presente en el intersticio testicular durante el desarrollo temprano de la gónada masculina, y sus niveles se hallarían estrictamente regulados en las distintas etapas del desarrollo gonadal normal.
- La HA actuaría como factor de crecimiento autocrino en los TCL, modulando los procesos de proliferación celular, formación de nueva vasculatura y síntesis de otros factores de crecimiento.
- A la luz de los resultados de los ensayos *in vivo* llevados a cabo en este trabajo, la inhibición de HDC, empleando tanto compuestos sintéticos como naturales, se presenta como una estrategia prometedora a tener en cuenta en el diseño de terapias específicas para los TCL.
- Particularmente, la combinación del compuesto natural EGCG con carboplatino resultaría sumamente eficaz para el tratamiento de los TCL independientes de gonadotrofinas, permitiendo el desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento que mejoren la eficacia de las terapias que actualmente se emplean en la clínica, basadas únicamente en la administración de compuestos derivados de platino.
- Resulta imprescindible la caracterización fenotípica de los pacientes con TCL para elegir el correcto abordaje terapéutico



Bibliografía

Abiuso AM, Berensztein E, Pagotto RM, Pereyra EN, Medina V, Martinel Lamas DJ, Besio Moreno M, Pignataro OP, Mondillo C. H4 histamine receptors inhibit steroidogenesis and proliferation in Leydig cells. J Endocrinol. **2014**; 223(3):241-53.

Abiuso AMB, Varela ML, Haro Durand L, Besio Moreno M, Marcos A, Ponzio R, Rivarola MA, Belgorosky A, Pignataro OP, Berensztein E, Mondillo C. Histamine H4 receptor as a novel therapeutic target for the treatment of Leydig-cell tumours in prepubertal boys. Eur J Cancer. **2018**; 91:125-135.

Acar C, Gurocak S, Sozen S. Current Treatment of Testicular Sex Cord-stromal Tumors: Critical Review. Urology. **2009**; 73(6).

Aguirre, D, Nieto K, Lazos M, Peña YR, Palma I, Kofman-Alfaro S, Queipo G. Extragonadal germ cell tumors are often associated with Klinefelter syndrome. Hum Pathol. **2006**; 37: p. 477-80.

Ahmed H, Arya M, Muneer A, Mushtaq I, Sebire N. Testicular and paratesticular tumours in the prepubertal population. Lancet Oncol **2010**; 11: 476–83.

Ai W, Liu Y, Wang TC. Yin yang 1 (YY1) represses histidine decarboxylase gene expression with SREBP-1a in part through an upstream Sp1 site. Hormones and signaling. **2006**; 290(6), p 1096-1104.

Alagha E, Kafi SE, Shazly MA, Al-Agha A. Precocious Puberty Associated with Testicular Hormone-secreting Leydig Cell Tumor. Cureus. **2019**;11(12):e6441.

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.

Alfaro, JM. Y col. Immunohistochemical detection of the retinoid acid receptors (RXR-alpha, -beta, -gamma) and Farnesoid X-activated receptor (FXR) in the marbled newt along the annual cycle. Mol Reprod Dev. **2002**; 62(2): p. 216-22.

Alonso N, Fernández N, Notcovich C, Monczor F, Simaan M, Baldi A, Gutkind S, Davio C, y Shayo C. Cross-desensitization and cointernalization of H1 and H2 histamine receptors reveal new insights into histamine signal integration. Mol Pharmacol. **2013**; 83:1087–1098.

Arnaeza E, EstevezA, Vieytes MR, Louzao MC, Botana LM. Effect of purification, theophylline and sodium fluoride on histamine release produced by antineoplastic drugs on rat mast cells: A distinctive mechanism of action for carboplatin. Biochemical Pharmacology. **1992**; 44 (3): 533-538.

Arrang JM, Garbarg M & Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. Nature. **1983**; 302: 832–837.

Ascoli, M. Characterization of several clonal lines of cultured leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. Endocriniolgy. **1981**; 108: 88-95.

Azouri H, Bidart JM, Bohuon C. In vivo toxicity of cisplatin and carboplatin on the Leydig cell function and effect of the human choriogonadotropin. Biochem Pharmacol. **1989**; 38(4): 567-71.

Bähre H y Kaever V. Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease. **2017**. pp 3-19.

Bakalska M, Koeva Y, Popova L y Davidoff M. Morphofunctional Aspects of Rat Leydig Cell Development. Acta morphologica et anthropologica, **2003;** 8.

Baker PJ, Sha JH, O'Shaughnessy PJ. Localisation and regulation of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. Molecular and Cellular Endocrinology. 1997; 133(2): 127-133.

Bakker RA, Dees G, Carrillo JJ, Booth RG, López-Gimenez JF, Milligan G, Strange PG and Leurs R. Domain Swapping in the Human Histamine H1 Receptor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **2004**; 311 (1) 131-138.

Balunas MJ, Kinghorn AD. Natural compounds with aromatase inhibitory activity: an update. Planta Med. **2010**; 76(11): 1087-93.

Bandak M, Jørgensen N, Juul A, Lauritsen J, Gundgaard Kier M, Mortensen MS, Daugaard G. Longitudinal changes in serum levels of testosterone and luteinizing hormone in testicular cancer patients after orchiectomy alone or bleomycin, etoposide, and cisplatin. Eur Urol Focus. **2018**; 4(4): 591-598.

Banu NA, Daly RS, Buda A, Moorghen M, Baker J, Pignatelli M, Reduced tumour progression and angiogenesis in 1,2-dimethylhydrazine mice treated with NS-398 is associated with down-regulation of cyclooxygenase-2 and decreased beta-catenin nuclear localisation. Cell Commun. Adhes. **2011**; 18(1-2): 1-8.

Barsoum IB, Bingham NC, Parker KL, Jorgensen JS, Yao H. Activation of the Hedgehog Pathway in the Mouse Fetal Ovary Leads to Ectopic Appearance of Fetal Leydig Cells and Female Pseudohermaphroditism. Dev Biol. **2009**; 329(1): 96–103.

Bartholeyns J and Bouclier M. Involvement of Histamine in Growth of Mouse and Rat Tumors: Antitumoral Properties of Monofluoromethylhistidine, an Enzyme-activated Irreversible Inhibitor of Histidine Decarboxylase. Cancer research. **1984**; 44: 639-645.

Basciani S, Brama M, Mariani S, Luca G De, Arizzi M, Vesci L, Pisano C, Dolci S, Spera G, Gnessi L, Imatinib Mesylate Inhibits Leydig Cell Tumor Growth : Evidence for In vitro and In vivo Activity. Cancer Res. **2005**; 65: 1897–1904.

Batool A, Karimi N, Wu XN, Chen SR & Liu YX. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. Cellular and Molecular Life Sciences. **2019;** 76: 1713–1727.

Belli, S., et al., Leydig cell tumor in an anabolic steroid abuser. J Endocrinol Invest. **2013**; 36(10): p 913.

Benson A, Renshan Ge, Klinefelter GR, Zirkin BR, and Hardy MP. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. PNAS. **2004;** 101(3): 775–780.

Benton L, Shan LX, Hardy MP. Differentiation of adult Leydig cells. J Steroid Biochem Mol Biol. **1995**; 53: 61-68.

Berensztein EB, Baquedano MS, Gonzalez CR, Saraco NI, Rodriguez J, Ponzio R, Rivarola MA, Belgorosky A. Expression of aromatase, estrogen receptor alpha and beta, androgen receptor, and cytochrome P-450scc in the human early prepubertal testis. Pediatr Res. **2006**; 60(6): 740-4.

Bergera SJ, Guptab S, Belfia CA, Goskya DM, Mukhtarb H. Green Tea Constituent (−)-Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Topoisomerase I Activity in Human Colon Carcinoma Cells Biochemical and Biophysical Research Communications. **2001**; 288 (1): 101-105.

Bertram KA, Bratloff B, Hodges GF, et al. Treatment of malignant Leydig cell tumor. Cancer. **1991**; 68:2324–2329.

Bhat RA, Lim YK, Chia YN, Yam KL. Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary: Analysis of a single institution database. J. Obstet. Gynaecol. **2013**; 39 (1): 305–310.

Bhatacharjee ME and Snell EE. Pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase: mechanism of inactivation by α-fluoromethylhistidine. J. Biol. Chem. **1990;** 265: 6664–6668.

Biason-Lauber A, Miller WL, Pandey AV, Flück CE. Of marsupials and men: "Backdoor" dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation. Mol Cell Endocrinol. **2013**; 371(1-2): 124-32.

Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, y Jaffee EM. The determinants of tumour immunogenicity. Nat Rev Cancer. **2012**; 12(4): 307–313.

Blaya B, Nicolau-Galmes F, Jangi, Shawkat M; Ortega-Martinez, I; Alonso-Tejerina, E; Burgos-Bretones, J, Perez-Yarza, G; Asumendi, A; Boyano MD. Histamine and Histamine Receptor Antagonists in Cancer Biology. Inflammation & Allergy-Drug Targets. **2010**; 9(3): 146-157.

Bokemeyer C, Schmoll HJ, Metzner B, Beyer J, Illiger HJ, Kneba M, Ostermann H, Kynast B, Räth U, Poliwoda H. Comparison of 5 vs 10 micrograms/kg per day of GM-CSF following dose-intensified chemotherapy with cisplatin, etoposide, and ifosfamide in patients with advanced testicular cancer. Ann Hematol. **1993**; 67(2): 75-9.

Boot AM, Lumbroso S, Verhoef-Post M, Richter-Unruh A, Looijenga LHJ, Funaro A, Beishuizen A, van Marle A, Drop SLS, Themmen APN. Mutation Analysis of the LH Receptor Gene in Leydig Cell Adenoma and Hyperplasia and Functional and Biochemical Studies of Activating Mutations of the LH Receptor Gene. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. **2011**; 96(7): E1197–E1205

Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanism of blood vessel formation. Trends Biochem Sci. **1997**; 22: 251-56.

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.

Caldamone AA, Altebarmakian V, Frank IN, Linke CA. Leydig cell tumor of testis. Urology. **1979**; 14(1): 39-43.

Catalano S, Panza S, Malivindi R, Giordano C, Barone I, Bossi G, Lanzino M, Sirianni R, Mauro L, Sisci D, Bonofiglio D, Andò S, Inhibition of leydig tumor growth by farnesoid X receptor activation: The in vitro and in vivo basis for a novel therapeutic strategy. Int. J. Cancer. 2013; 132: 2237–2247.

Celis Ferrari A, Glasberg I, Riechelmann RP. Carcinoid syndrome: update on the pathophysiology and treatment. Clinics. **2018**; 73(1): e490.

Cernigoj U, Vidic, M, Baruta, A, Podgornik M, Peterka, A. Strancar, J. A multimodal histamine ligand for chromatographic purification of plasmid DNA. Journal of Chromatograpy. **2013**; 1281: 87–93.

Chanda R, Ganguly AK. Diamine-oxidase activity and tissue di- and poly-amine contents of human ovarian, cervical and endometrial carcinoma. Cancer Lett. **2001**; 89: 23-8.

Charreau, EH, Calvo JC, Nozu K, Pignataro O, Catt KJ, Dufau ML. Hormonal modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in gonadotropin-stimulated and -desensitized testicular Leydig cells. J Biol Chem. **1981**; 256(24): 12719-24.

Chen A, Jiang P, Zeb F, Wu X, Xu C, Chen L, Feng Q. EGCG regulates CTR1 expression through its pro-oxidative property in non-small-cell lung cancer cells. J Cell Physiol. **2020**

Chen H, Stanley E, Jin S, Zirkin BR. Stem Leydig cells: From fetal to aged animals. Embryo today reviews. **2010**; 90(4): p 272-283.

Chen J, Zhang L, Li C, Chen R, Liu C, Chen M. Lipophilized Epigallocatechin Gallate Derivative Exerts Anti-Proliferation Efficacy through Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis on DU145 Human Prostate Cancer Cells. Nutrients. **2019**; 12(1): E92.

Chen W, Dong Z, Valcic S, Timmermann B and Bowden G. Inhibition of Ultraviolet B–Induced c-fos Gene Expression and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by (-)-Epigallocatechin Gallate in a Human Keratinocyte cell line. Molecular carcinogenesis. **1999**; 24: 79–84.

Cheville JC, Sebo TJ, Lager DJ, Bostwick DG, Farrow GM. Leydig cell tumor of the testis: a clinicopathologic, DNA content, and MIB-1 comparison of nonmetastasizing and metastasizing tumors. Am J Surg Pathol. **1998**; 22(11): 1361-7.

Chimento A, Casaburi I, Bartucci M, Patrizii M, Dattilo R, Avena P, Andò S, Pezzi V, Sirianni R. Selective GPER activation decreases proliferation and activates apoptosis in tumor Leydig cells. Cell Death Dis. **2013**; 4: e747.

Chu C, Deng J, Man Y, and Qu Y. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. Biomed Res Int**. 2017**: 561564.

Cianchi F, Cortesini C, Perna F, Fabbroni V, Uliva C, Fabrizi F, Giannini L, Vannacci A, Masini E. Prostaglandin E(2) correlates with histamine production in human colorectal cancer. Inflamm Res. **2006;** 55(1): 81-2.

Corlan AS, Cîmpean AM, Jitariu A-A, Melnic E, Raica M, Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor/Prokineticin-1 in Cancer Development and Tumor Angiogenesis. Int. J. Endocrinol. **2017**: 3232905.

Coruzzi G, Adami M, Pozzoli C. Role of histamine H4 receptors in the gastrointestinal tract. Frontiers in Bioscience. **2012**; 4: 226-239.

Cost NG, Maroni PD, Flaig TW. Metastatic Relapse After Initial Clinical Stage I Testicular Leydig Cell Tumor. March 15, **2014**; 28(3): 211-214.

Cricco GP, Davio CA, Martin G, Engel N, Fitzsimons CP, Bergoc RM, Rivera ES. Histamine as an autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas. Agents Actions. **1994**; 43(1-2): 17-20.

Cruz C, Sousa A, Mota E, Sousa F, Queiroz JA. Quantitative analysis of histamine- and agmatine–DNA interactions using surface plasmon resonance. International Journal of Biological Macromolecules. **2014**, 70: 131-137.

Csala M, Margittai E, Senesi S, Gamberucci A, Bánhegyi G, Mandl J, Benedetti A. Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. FEBS Lett. **2007**; 581(8): 1693-8.

Davio CA, Cricco GP, Bergoc RM, Rivera ES. H1 and H2 histamine receptors in n-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers. Biochemical Pharmacology. **1995**; 50(1): 91-96.

De Castria TB, da Silva EM, Gois AF, Riera R. Cisplatin versus carboplatin in combination with third-generation drugs for advanced non-small cell lung cancer. Cochrane Database Syst Rev. **2013**; (8): CD009256.

DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. Am J Pathol. **1997**; 151(3): 671-7.

Díez-Torre A, Silván U, Díaz-Núñez M & Arechaga J. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. Journal Cancer Biology & Therapy. **2010**; 10(6): p 529-536.

Dimaline R, Sandvik AK. Histidine decarboxylase gene expression in rat fundus is regulated by gastrin. FEBS letters. **1991**; 281, (1-2): 20-22.

Ding J, y col. Protection of murine spermatogenesis against ionizing radiation-induced testicular injury by a green tea polyphenol. Biol Reprod. **2015**; 92(1): 6.

Dong L, Jelinsky SA, Finger JN, Johnston DS, Kopf GS, Sottas CM, Hardy MP, Ge R. Gene Expression During Development of Fetal and Adult Leydig Cells. Annals of the New York Academy of Sciences. **2007**; 1120(1).

Doz F y Pinkerton R. What is the place of carboplatin in paediatric oncology? European Journal of Cancer. **1994**; 30(2): 194-201.

Entezari P, Kajbafzadeh AM, Mahjoub F, Vasei M. Leydig cell tumor in two brothers with congenital adrenal hyperplasia due to 11-β hydroxylase deficiency: a case report. Int Urol Nephrol. **2012**; 44: 133–137.

Falus A, Pos Z, Darvas Z. Histamine in normal and malignant cell proliferation. AdvExp Med Biol. **2011**; 709: 109-123.

Farkas LM, Székely JG, Pusztai C, Baki M. High frequency of metastatic Leydig cell testicular tumours. Oncology**. 2000**; 59(2): 118-21.

Fernández N, Monczor F, Baldi A, Davio C and Shayo C. Histamine H2 Receptor Trafficking: Role of Arrestin, Dynamin, and Clathrin in Histamine H2 Receptor Internalization. Molecular Pharmacology October. **2008**; 74 (4): 1109-1118.

Ferrada C, Ferré S, Casadó V, Cortés A, Justinova Z, Barnes C, Canela EI, Goldberg SR Leurs R, Lluis C Franco R. Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function. Neuropharmacology. **2008**, 55(2): 190-197.

Ferrada C, Moreno F, Casadó V, Bongers G, Cortés A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferré S, Lluís C, Franco R. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. Br J Pharmacol. **2009**; 157(1): 64–75.

Ferrara N, Le Coutera J, Lina R, Pealeb F. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. **2004**; 1654(1): 69-78.

Ferrara N, Kerbel RS, Angiogenesis as a therapeutic target. Nature. **2005**; 438: 967–974.

Finkelstein SE, Clozan C, Bui MM, Cotter MJ, Ramakrishnan R, Ahmed J, Noyes DR, Cheong D, Gonzalez RJ, Heysek RV, Berman C, Lenox BC, Janssen W, Zager JS, Sondak VK, Letson GD, Antonia SJ, Gabrilovich DI. Combination of external beam radiotherapy (EBRT) with intratumoral injection of dendritic cells as neo-adjuvant treatment of high-risk soft tissue sarcoma patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. **2012**; 82(2): 924-32.

Flück C, Pandey A. Steroidogenesis of the testis – new genes and pathways. Annales d'Endocrinologie. **2014**; 75(2): 40-47.

Folkman J. Tumour Angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. The Molecular Basis of Cancer. **1995**: 206-32.

Form DM, Auerbach R, PGE2 and angiogenesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **1983**; 172: 214–8.

Fowler A, Gill K, Kirma N, Dillehay D, Tekmal R. Overexpression of Aromatase Leads to Development of Testicular Leydig Cell Tumors: An in Vivo Model for Hormone-Mediated Testicular Cancer. The American Journal of Pathology. **2000**; 156(1): 347-353.

Francis H, DeMorrow S, Venter J, Onori P, White M, Gaudio E, Francis T, Greene J, Tran S, Meininger C, Alpini G. Inhibition of histidine decarboxylase ablates the autocrine tumorigenic effects of histamine in human cholangiocarcinoma. Gut. **2012**; 61: 753-764.

Franklin SL, Ferry RJ, Cohen P, Cohen P, Rapid insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-3 on endothelial cell survival. J. Clin. Endocrinol. Metab. **2003**; 88: 900–7.

Ganellin CR, Parsons ME. Pharmacology of Histamine Receptors. **1986**.

Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Rodriguez F, Nunez de Castro I, Vara-Thorbeck C.
Histamine synthesis and content in benign and malignant breast tumours. Its effects on other host tissues. Surg Oncol. **1994**; 3: 167-73.

Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Campos R, Nunez de Castro I, Vara-Thorbeck C.
Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: results of a study on ten patients. Agents Actions. **1988**; 23: 357-60.

Gasheva OY, Nizamutdinova I, Hargrove L, Gobbell C, Troyanova-Wood M, Alpini SF, Pal S, Du C, Hitt AR, Yakovlev VV, Newell-Rogers MK, Zawieja DC, Meininger CJ, Alpini GD, Francis H, Gashev AA. Prolonged intake of desloratadine: mesenteric lymphatic vessel dysfunction and development of obesity/metabolic syndrome. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **2019**; 316(1): G217–G227.

Geminiani J, Marshall S, Ho T, Brandes S. Testicular Leydig Cell Tumor with Metachronous Lesions: Outcomes after Metastasis Resection and Cryoablation. Case Reports in Urology Volume **2015**, Article ID 748495, 4 pages.

Georgantzi K & Tsolakis A, Jakobson A, Christofferson R, Tiensuu Janson E, Grimelius L. Synaptic Vesicle Protein 2 and Vesicular Monoamine Transporter 1 and 2 Are Expressed in Neuroblastoma. Endocrine Pathology. **2019;** 30: 173–179.

Gheorghisan-Galateanu AA. Leydig cell tumors of the testis: a case report. BMC Res Notes. **2014**; 7: 656.

Ghosh AK, Hirasawa N, Ohtsu H, Watanabe T, Ohuchi K. Defective angiogenesis in the inflammatory granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not in mast cell-deficient mice. J Exp Med. **2002**;195(8): 973-82.

Gnessi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment. Endocrine Reviews. **1997**; 18(4): 541-609

Graf A, Meng F, Hargrove L, Kennedy L, Han Y. Knockout of histidine decarboxylase decreases bile duct ligation-induced biliary hyperplasia via downregulation of the histidine decarboxylase/VEGF axis through PKA-ERK1/2 signaling. Am Jou of Phisyology. **2014** ;307(8): G813-23.

Graff L, Frungieri M, Zanner R, Pohlinger A, Prinz C, Gratzl M. Expression of histidine
decarboxylase andsynthesis of histamine by human small cell lung carcinoma. Am J Pathol **2002**; 160: 1561-5.

Granados Loarca E. A., et al., Is necessary to practice orchiectomy in patients with post-puberal maldescended testes? Actas Urol Esp. **2005**; 29: p 969-973.

Grau de Castro JJ. Inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en la prevención del cáncer. Rev Clin Esp. **2005**; 205(9): p 446-56.

Greenfield A, Koopman P. SRY and mammalian sex determination. Curr Top Dev Biol. **1996**; 34: 1-23.

Griswold SL, Behringer RR. Fetal Leydig cell origin and development. Sex Dev. **2009**; 3(1): 1-15.

Gui T, Cao D, Shen K, Yang J, Zhang Y, Yu Q, Wan X Xiang Y, Xiao Y Guo L. A clinicopathological analysis of 40 cases of ovarian Sertoli–Leydig cell tumors. Gynecologic Oncology. **2012**; 127(2): 384-389.

Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. Physiol Rev **2008**; 88: 1183-241.

Haider, S. G., Laue, D., Schwochau, G., and Hilscher, B. Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. It. J. Anat. Embryol. **1995**; 100(1): 535–541.

Haider SG. Servos G, Tajtaraghi S, Berthold G, Mukhopadhyay AK, Kilic N, Ergün S. Functional Markers for Fetal and Postnatal Differentiation of Rat Leydig Cells. The Fate of the Male Germ Cell **.1997**; p 143-144.

Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. Journal of Reproductive Immunology. **2002**; 57: 3–18.

Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. **2011**; 144: 646–674.

Haro Durand LA, Góngora A, Porto López, JM, Boccaccini, A, Zago, P, Baldi, A Gorustovich, A. An vitro endothelial cell response to ionic dissolution products from boron-doped bioactive glass in the SiO2–CaO–P2O5–Na2O system. J. Mater. Chem. B. **2014**; 2: 7620.

Hattori Y, Seifert R. Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease. **2017**.

Hayes-Lattin, B, Nichols CR. Testicular cancer: a prototypic tumor of young adults. Semin Oncol, **2009**. 36(5): p 432-8.

Heer R, Jackson MJ, El-Sherif A, Thomas DJ. Twenty-nine Leydig cell tumors: Histological features, outcomes and implications for management. Int Journal of Urology. **2010**; 17: 886–889.

Hegyesi H, Somlai B, Varga VL, et al. Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides. J Invest Dermatol **2001**; 117:151-3.

Henley JD, Young RH, Ulbright TM. Malignant Sertoli Cell Tumors of the Testis: A Study of 13 Examples of a Neoplasm Frequently Misinterpreted as Seminoma. The American Journal of Surgical Pathology: May **2002** - Volume 26 - Issue 5 - p 541-550.

Holzer A, Manorek GH and Howell SB. Contribution of the Major Copper Influx Transporter CTR1 to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. Molecular Pharmacology October **2006**; 70 (4): 1390-1394.

Huseby RA. Demonstration of a direct carcinogenic effect of estradiol on Leydig cells of the mouse. Cancer research; 1980; 40: 1006-1013.

Hung P, Wu B, Chen H, Chen Y, Chen C, Wu M, Liu H, Lee M, and Kao Y. Antimitogenic effect of green tea ()-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways. Am J Physiol Cell Physiol. **2005;** 288: C1094–C1108.

Hutson JM, Hasthorpe S. Abnormalities of testicular descent. Cell Tissue Res. **2005**; 322(1): 155-8.

Ichikawa A, Sugimoto Y, Tanaka S. Molecular biology of histidine decarboxylase and prostaglandin receptors. Proc. jpn. Acad. **2010**.

Inkster S, Yue W, Brodie A. Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. **1995**, 80(6): 1941–1947.

Ishikawa T, Kamidono S, and Fujisawa M. Fertility after high-dose chemotherapy for testicular cancer. Urology. **2014**; 63: 137–140.

Jahan S, Hasanat MA, Alam F, Fariduddin M, Tofail T. Leydig cell hypoplasia - a unique paradox in diagnosis of 46XY DSD. ACCR **2019** - 0152.

Jerzak KJ, Manshadi SD, Ng P, Maganti M, McCuaig JM, Bulter M, Oza A, Mackay HJ. Prevention of carboplatin-induced hypersensitivity reactions in women with ovarian cancer. Journal of Oncology Pharmacy Practice. **2018**; 24(2).

Johnson C, Huynh V, Hargrove L, Kennedy L, Graf-Eaton A, Owens J, Trzeciakowski JP, Hodges K, DeMorrow S, Han Y, Wong L, Alpini G, Francis H. Inhibition of Mast Cell-Derived Histamine Decreases Human Cholangiocarcinoma Growth and Differentiation via c-Kit/Stem Cell Factor–Dependent Signaling. The American Journal of Pathology. **2016**, 186(1): 123-133.

Jonker-Pool G, Hoekstra HJ, van Imhoff GW, Sonneveld DJ., Sleijfer DT, van Driel MF, Koops HS, van de Wiel HB., Male sexuality after cancer treatment—needs for information and support: testicular cancer compared to malignant lymphoma. Patient Educ. Couns. 2004; 52: 143–150.

Jun S, Jae PD, Ro Y, Park YW, Kim K, Ayala AG. Ectopic Leydig cells of testis: An immunohistochemical study on tissue microarray. Annals of Diagnostic Pathology. **2008**, 12(1): 29-32.

Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. Nature. **2001**; 413: 420-5.

Jutel M. Akdis C. A. Akdis. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. Clinical and experimental allergy. 2009; 39(12): 1786-1800.

Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME, Cid MC, Martin MB, Kleinman HK, Greene GL, Schnaper HW, Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. Circulation. 1994; 89: 1943–50.

Kahlson G, Rosengren E. New approaches to the physiology of histamine. Annu Rev Physiol. **1965**; 48: 155-96.

Kennedy L, Hodges K, Meng F, Alpini G, Francis H. Histamine and histamine receptor regulation of gastrointestinal cancers. Transl Gastrointest Cancer. **2012**; 1(3):215-227.

Kennedy L, Hargrove L, Demieville J, Karstens W, Jones H, DeMorrow S, Meng F, Invernizzi P, Bernuzzi F, Alpini G, Smith S, Akers A, Meadows V, Francis H. Blocking H1/H2 histamine receptors inhibits damage/fibrosis in Mdr2-/- mice and human cholangiocarcinoma tumorigenesis. Hepatology. **2018**; 68(3): 1042-1056.

Khardori N, Khan RA, Tripathi T. Biomedical Aspects of Histamine: Current Perspectives. **2010**.

Kheradmand F, Reza Hashemnia M, Valizadeh N, Roshan-Milani S. The Effects of Imatinib Mesylate on Cellular Viability, Platelet Derived Growth Factor and Stem Cell Factor in Mouse Testicular Normal Leydig Cells. J Reprod Infertil. **2016**; 17(2): 82–87.

Kim I, Young RH, Scully, RE. Leydig cell tumor of the testis. The American Journal of Surgical Pathology. **1985**; 9(3): 177-192.

Kim J, Zhang X, Rieger-Christ KM, Summerhayes IC, Wazer DE, Paulson KE y Yee AS. Suppression of Wnt Signaling by the Green Tea Compound ()-Epigallocatechin 3-Gallate (EGCG) in Invasive Breast Cancer Cells. The journal of biological chemistry. 2006; 281(16): 10865–10875.

Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. Dev Biol. **2004**; 270(1): 1-18.

Komi DEA & Bjermer L. Mast Cell-Mediated Orchestration of the Immune Responses in Human Allergic Asthma: Current Insights. Clinical Reviews in Allergy & Immunology. **2019**; 56: 234-247.

Kubota H. y col. Cyclooxygenase-2 protects germ cells against spermatogenesis disturbance in experimental cryptorchidism model mice. J Androl. **2013**; 32(1): p. 77-85.

Kuiri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. Horm Res Paediatr. **2014**; 82(2): 73-80.

Kumar A, Rani L, Dhole B & Chaturvedi PK. Oxygen as a regulator of MA-10 cell functions: effect of cobalt chloride on vascular endothelial growth factor production. Andrologia **2012**; 44: 615–620.

Kurland G, Christensen AK, Huseby RA. Changes in fine structure accompanying estrogen-induced tumorigenesis of Leydig cells in the mouse testis. Cancer Res. **1975** Jul; 35(7): 1671-86.

Lacroix A, Ascoli M, Puett D, McKenna TJ. Steroidogenesis in hCG-responsive Leydig cell tumor variants. J Steroid Biochem. **1979** Jun; 10(6): 669-75.

Lai TS, Greenberg CS, Histamine Regulates Binding of Cross-Linked Fibrinogen to Endothelium: Role of Histaminylation in Vascular Biology. Blood 120: **2012**.

Lammers T, Peschke P, Kühnlein R, Subr V, Ulbrich K, Huber P, Hennink W, Storm G. Effect of intratumoral injection on the biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer–based drug delivery systems. Neoplasia. **2006** Oct; 8(10): 788-95.

Lanzafame S, Leonardi R, Torrisi A, Extratesticular Leydig cell tumor of the spermatic cord. J. Urol. **2004**; 171: 1238–1239.

Laue LL, Wu SM, Kudo M, Bourdony CJ, Cutler GB, Jr, Hsueh AJ, Chan WY. Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. Molecular Endocrinology. **1996**, 10(8): 987–997.

Lee SH, Nam HJ, Kang HJ, Kwon HW, Lim YC. Epigallocatechin-3-gallate attenuates head and neck cancer stem cell traits through suppression of Notch pathway. Eur J Cancer. **2013**; 49(15): 3210-8.

Leonhartsberger, N, y col**.** Increased incidence of Leydig cell tumours of the testis in the era of improved imaging techniques. BJU Int, **2011;** 108(10): p 1603-7.

Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. Nat Rev Drug Discov. **2005**; 4: 107-20.

Leurs R, Timmerman H. The Histamine H3 Receptor: A Target for New Drugs. **1998**.

Li L, Li Y, Sottas C, Culty M, Fan J, Hu Y, Cheung G, Chemes HE, Papadopoulos V. Directing differentiation of human induced pluripotent stem cells toward androgen-producing Leydig cells rather than adrenal cells. Proc Natl Acad Sci U S A. **2019** Nov 12;116(46): 23274-23283.

Liao W, Rudling M, Möller C, Angelin B. Endogenous histamine reduces plasma insulin-like growth factor I via H1 receptor-mediated pathway in the rat. Eur J Pharmacol. **1999** Jun 25;374(3): 471-6.

Lokich J, Anderson N, Moore C, Bern M, Coco F, Sonneborn H, Dow E, Strong D. Paclitaxel, cisplatin and etoposide combination chemotherapy: a comparison of dose intensity in two multifractionated dose schemas. Eur J Cancer. **1998** Apr; 34(5): 664-7.

Ma Q, Yang T, Yin J, Peng Z, Yu M, Liu Z, Chen F, Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in regulating cell cycle progression. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2009**: 389: 150–155.

Mach CM, Lapp EA, Weddle KJ, Hunter RJ, Burns KA, Parker C, Brown J, JA Smith. Adjunct Histamine Blockers as Premedications to Prevent Carboplatin Hypersensitivity Reactions. Pharmacotherapy. **2016**; 36(5): p 482-487.

Mancinelli R, Venter J, Gaudio E, Onori P, Franchitto A, Kopriva S, DeMorrow S, Alpini G, Francis H, Abstract #3517: Variations in the local concentration of histamine

modulate cholangiocarcinoma (CCA) tumor growth by recruitment of angiogenic factors. Cancer Res. 2009; 69.

Marley PD, Thomson KA, Jachno K, Johnston MJ. Histamine-induced increases in cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells. Br. J. Pharmacol. **1991;** 104, 839-846.

Martínez-Mora J, Sáez JM, Torán N, Isnard R, Pérez-Iribarne MM, Egozcue J, Audí L. Male pseudohermaphroditism due to **Leydig** cell agenesia and absence of testicular LH receptors. Clinical endocrinology. **1991**; 34(6): 485-491.

Massari NA, Nicoud MB, Medina VA. Histamine receptors and cancer pharmacology: an update. Br J Pharmacol. **2018** Nov 10.

Mashreghi M, Azarpara H, Bazaz MR, Jafari A, Masoudifar A, Mirzaei H, Jaafari MR. Angiogenesis biomarkers and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis. J Cell Physiol. **2018** Apr; 233(4): 2949-2965.

Mayerhofer A, Bartke A, Amador AG, Began T. Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. Endocrinology **1989**; 125: 2212-2214.

Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. Br J Pharmacol. **2010** Oct; 161(4): 755-67.

Meng J, Holdcraft R, Shima J, Griswold M, and Braun R. Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier. PNAS, **2005;** 102 (46): 16696-16700.

Miller WL, Auchus RJ. The "backdoor pathway" of androgen synthesis in human male sexual development. PLoS Biol. **2019**; 17(4): e3000198.

Mitchison T. The proliferation rate paradox in antimitotic chemotherapy. Molecular Biology of the Cell. **2012** (23).

Miura K, Hamanaka K, Koizumi T, Kawakami S, Kobayashi N and Ito K. Solid component tumor doubling time is a prognostic factor in non-small cell lung cancer patients. Journal of Cardiothoracic Surgery. **2019;** 14: 57.

Mochizuki T, Yamatodani A, Okakura K, Horii A, Inagaki N, Wada H. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. Physiology & Behavior. **1992**; 51(2): 391-394.

Mondillo C, Falus A, Pignataro O, Pap E. Prolonged histamine deficiency in histidine decarboxylase gene knockout mice affects Leydig cell function. J Androl. **2007**; 28: 86-91.

Mondillo C, Pagotto RM, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, Pignataro OP. Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats. Biol Reprod **2009**; 80: 144-152.

Mondillo C, Patrignani Z, Reche C, Rivera E, Pignataro O. Dual role of histamine in modulation of Leydig cell steroidogenesis via HRH1 and HRH2 receptor subtypes. Biol Reprod **2005**; 73: 899-907.

Mondillo C, Varela ML, Abiuso AMB, Vázquez R. Potential negative effects of anti-histamines on male reproductive function. Reproduction. **2018** May;155(5):R221-R227.

Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW, Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. Circulation **1995**; 91: 755–63.

Moreno-Ancillo A, Domínguez-Noche C, Gil-Adrados AC, Cosmes PM, Duarte I, Mateos Y. Anaphylactoid reaction to carboplatin: successful "desensitization". Allergol Immunopathol (Madr). **2003** Nov-Dec; 31(6): 342-4.

Moya-García, Medina MA y Sánchez-Jiménez F. Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function Aurelio A. BioEssays, **2004**; 27: 57–63.

Muma N y Mi Z. Serotonylation and Transamidation of Other Monoamines. ACS Chem. Neurosci. **2015**, 6(7): 961-969.

Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular Cloning and Characterization of a New Human Histamine Receptor, HH4R. Biochemical and Biophysical Research Communications. **2000**, 279(2) Pages 615-620.

Nemetallah BR & Ellis LC. Ablation of the Blood-Testis Barrier in Rats and Guinea Pigs by 48/80, a Histamine Releaser, and Cadmium Chloride. Journal of Reproductive Systems. **1985**: 15(1).

Newman C, Connolly S, MacEneaney O, O'Keane C, McQuaid SE. Leydig Cell Hyperplasia Mimicking a Testicular Tumour in a Patient with Klinefelter Syndrome. European Journal of Case Reports in Internal Medicine, 06 Jun **2019**, 6(6): 001129

Niaz N, y col. Intracerebroventricular injection of histamine induces the hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation in male rats. Brain Res. **2018** Nov 15;1699: 150-157.

Nicoud MB, Sterle HA, Massari NA, Táquez Delgado MA, Formoso K, Herrero Ducloux MV, Martinel Lamas D, Cremaschi GA, Medina VA. Study of the antitumour effects and the modulation of immune response by histamine in breast cancer. Br J Cancer. **2019** Nov 21.

Nitta Y, Kikuzaki H, Ueno H. Food Components Inhibiting Recombinant Human Histidine Decarboxylase Activity. J. Agric. Food Chem. **2007**, 55: 299-304.

Nizamutdinova IT, Daisuke Maejima, Takashi Nagai, Cynthia J. Meininger, Anatoliy A. Gashev. Histamine as an Endothelium-Derived Relaxing Factor in Aged Mesenteric Lymphatic Vessels. Lymphat Res Biol. **2017** Jun 1; 15(2): 136–145.

Noy R & Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. Immunity. **2014**; 41(1): 49-61.

Norrby K. Evidence of a dual role of endogenous histamine in angiogenesis. Int J Exp Pathol. **1995** Apr;76(2): 87-92.

O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. Journal of Allergy and Clinical Immunology. **2011**; 128(6): 1153-1162.

Ohtsu H, Watanabe T, New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2003**; 305: 443–447.

Ohtsu H. Histamine Synthesis and Lessons Learned from Histidine Decarboxylase Deficient Mice. Histamine in Inflammation. **2010:** pp 21-31.

Overman MJ, Maru DM, Charnsangavej C, Loyer EM, Wang H, Pathak P, Eng C, Hoff PM, Vauthey JN, Wolff RA, Kopetz S. Oxaliplatin-mediated increase in spleen size as a

biomarker for the development of hepatic sinusoidal injury. J Clin Oncol. **2010** May 20; 28(15):2549-55.

Panza S, Malivindi R, Chemi F, Rago V, Giordano C, Barone I, Bonofiglio D, Gelsomino L, Giordano F, Andò S, Catalano S. .Glucocorticoid Receptor as a Potential Target to Decrease Aromatase Expression and Inhibit Leydig Tumor Growth. Am J Pathol. **2016** May;186(5):1328-39.

Papadimitris C, Alevizaki M, Pantazopoulos D, Nakopoulou L, Athanassiades P Dimopoulos MA. Cushing syndrome as the presenting feature of metastatic Leydig cell tumor of the testis. Urology **2000**; 56(1): 153.

Parsons ME, Ganellin CR, Histamine and its receptors. Br. J. Pharmacol. **2009**; 147: 127-135.

Pagotto RM, Monzón C, Moreno MB, Pignataro OP, Mondillo C. Proliferative effect of histamine on MA-10 Leydig tumor cells mediated through HRH2 activation, transient elevation in cAMP production, and increased extracellular signal-regulated kinase phosphorylation levels. Biol Reprod. **2012**; 87(6): 150.

Pagotto RM, Pereyra EN, Monzón C, Mondillo C, Pignataro OP. Histamine inhibits adrenocortical cell proliferation but does not affect steroidogenesis. J Endocrinol. **2014** Mar 7; 221(1): 15-28.

Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocr Rev **2004**; 25(6): 947–970.

Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu W, Stark H, Thurmond R, and Haas HL. Histamine Receptors. Pharmacol Rev. 2015; 67: 601–655.

Patanè S. Cardiotoxicity: Cisplatin and long-term cancer survivors. July 15, **2014**; 175(1): 201–202.

Pollock WJ, McConnell CF, Hilton C, Lavine RL, Virilizing Leydig cell adenoma of adrenal gland. Am. J. Surg. Pathol. **1986**; 10: 816–822.

Pomara C, Barone R, Marino Gammazza A,Sangiorgi C, Barone F, Pitruzzella A, Locorotondo N, Di Gaudio F, Salerno M, Maglietta F, Sarni AL, Di Felice V, Cappello F, Turillazzi E. Effects of Nandrolone Stimulation on Testosterone Biosynthesis in Leydig Cells. J Cell Physiol. **2016** Jun; 231(6): 1385–1391.

Ponce De León Roca, J, Algaba-Arrea F, Bassas-Arnau L, Villavi- cencio-Mavrich, Tumor de células de Leydig del testículo. Arch Esp de Urol, **2000**. 53: p 453-8.

Powell JR y Brody MJ. Identification and specific blockade of two receptors for histamine in the cardiovascular system. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics January **1976**, 196 (1): 1-14.

Qin L, Zhao D, Xu J, Ren X, Terwilliger EF, Parangi S, Lawler J, Dvorak HF, Zeng H. The vascular permeabilizing factors histamine and serotonin induce angiogenesis through TR3/Nur77 and subsequently truncate it through thrombospondin-1. Blood. **2013** Mar 14;121(11): 2154-64.

Qu S, Worlikar T, Felsted AE, Ganguly A, Beems MV, Hubbard R, Pepple AL, Kevelin AA, Garavaglia H, Dib J, Toma M, Huang H, Tsung A, Xu Z, Cho CS. Non-thermal histotripsy tumor ablation promotes abscopal immune responses that enhance cancer immunotherapy. J Immunother Cancer. **2020** Jan;8 (1).

Rado Velázquez, M. A. Tumor de células de Leydig. Aportación de dos casos y revisión de la literatura. Actas Urol Esp. 2001; 25(4): p. 371-6.

Rady I, Mohamed H, Rady M, Siddiqui IA, Mukhtar H. Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences. **2018**; 5(1).

Rivera ES, Cricco GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martín GA, Bergoc RM. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. Semin Cancer Biol. **2000** Feb;10(1):15-23.

Roberts NJ, y col. Intratumoral injection of Clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses. Sci Transl Med. **2014** Aug 13;6(249): 249ra111.

Rodríguez-Caso C, Rodríguez-Agudo D, Sánchez-Jiménez F and Medina MA. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. Cell. Mol. Life Sci. **2003**; 60: 1760–1763.

Rodríguez-Caso C, Rodríguez-Agudo D, Moya-García AA, Fajardo I, Medina MA, Subramaniam V, Sánchez-Jiménez F. Local changes in the catalytic site of mammalian histidine decarboxylase can affect its global conformation and stability. Eur J Biochem. **2003** Nov;270(21): 4376-87.

Ross J. Prepubertal Testicular Tumors. Urology. **2009**; 74(1).

Ruggiero A, Rizzo D, Catalano M, Maurizi P, Mastrangelo S, Attinà G and Riccardi R. Rechallenge to Carboplatin in Children with Low Grade Glioma and Carboplatin Hypersensitivity Reactions. Front. Pharmacol., 07 April **2017**.

Ruf CG, Sanatgar N, Isbarn H, Ruf B, Simon J, Fankhauser CD, Dieckmann KP. Leydig-cell tumour of the testis: retrospective analysis of clinical and therapeutic features in 204 cases. World J Urol. **2020**.

Ruiz-Chica AJ, Soriano A, Tunon I, Sánchez-Jiménez FM, Silla E, Ramírez FJ. FT-Raman and QM/MM study of the interaction between histamine and DNA. Chemical Physics. **2006**; 324: 579–590.

Safina F, Tanaka S, Inagaki M, Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Expression of L-Histidine Decarboxylase in Mouse Male Germ Cells The Journal of Biological Chemistry. April 19, **2002**; 277: 14211-14215.

Rybak LP, Whitworth CA, Mukherje D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. Hearing Research. **2007**; 226(1-2) 157-167.

Salerno M, Cascio O, Bertozzi G, Sessa F, Messina A, Monda V, Cipolloni L, Biondi A, Daniele A, Pomara C. Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: a literature review. Oncotarget. **2018** Apr 10; 9(27): 19415–19426.

Samson M, Peale F V., Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara N, Human Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor: Expression Early in Development and in Leydig Cell Tumors Suggests Roles in Normal and Pathological Testis Angiogenesis. J. Clin. Endocrinol. Metab. **2004**; 89: 4078–4088,

Sanchez-Chapado, M. Leydig cell tumour in a man with human immunodeficiency virus. Scand J Urol Nephrol. **1995**; 29(3): p. 357-60.

Satoh K, Sakamotoa Y, Ogata A, Nagaia F, Mikuriyab H, Numazawac M, Yamadac K, Aokia N. Inhibition of aromatase activity by green tea extract catechins and their endocrinological effects of oral administration in rats. Food and Chemical Toxicology. 2002; 40: 925–933.

Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ Jr, Minegishi T & Cutler GB Jr. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. Nature volume. 1993; 365: 652–654.

Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. J Physiol. **1990** Dec; 431: 379-401.

Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. Gastroenterology **2008**;134: 1842-60.

Scolnik PA, Virosco J, Haselkorn R, The wild-type gene for glutamine synthetase restores ammonia control of nitrogen fixation to Gln- (glnA) mutants of Rhodopseudomonas capsulata. J. Bacteriol. **1983**; 155: 180–5.

Sewer M y Li D. Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis by the Cytoskeleton. Lipids. **2008**; 43.

Shaul DB, Xie HW, Diaz JF, Mahnovski V, Hardy BE, Surgical treatment of testicular trauma: Effects on fertility and testicular histology. J. Pediatr. Surg. **1997**.

Sharma A, Houshyar R, Bhosale P, Choi J, Gulati R and Lall C. Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective. Clinical and Molecular Hepatology **2014**; 20:317-326.

Shaw G, Fenelon J, Sichlau M, Auchus RJ, Wilson JD, Renfree MB. Role of the alternate pathway of dihydrotestosterone formation in virilization of the Wolffian ducts of the tammar wallaby, Macropus eugenii. Endocrinology. **2006** May;147(5): 2368-73.

Shayo C, Davio C, Brodsky A, Mladovan AG, Lemos Legnazzi B, Rivera E and Baldi A. Histamine Modulates the Expression of c-fosthrough Cyclic AMP Production via the H2 Receptor in the Human Promonocytic Cell Line U937. Molecular Pharmacology. **1997**, 51(6): 983-990.

Sheng R, Zhen-lun Gu, Mei-lin Xie,Wen-xuan Zhou, Ci-yi Guo. EGCG Inhibits Proliferation of Cardiac Fibroblasts in Rats with Cardiac Hypertrophy. Planta Med. **2009**; 75: 113–120.

Shima Y, Matsuzaki S, Miyabayashi K, Otake H, Baba T, Kato S, Huhtaniemi I, Morohashi K. Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis. Mol Endocrinol. **2015** Nov;29(11): 1581-93.

Shinn EH, y col. Testis cancer survivors' health behaviors: comparison with age-matched relative and demographically matched population controls. J Clin Oncol, **2010**. 28(13): p. 2274-9.

Shirota Y, Shirota H, Klinman D. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. J Immunol **2012**; 188: 1592-1599.

Siddiqui IA, Adhami VM, Bharali DJ, Hafeez BB, Asim M, Khwaja SI, Ahmad N, Cui H, Mousa SA, Mukhtar H. Introducing nanochemoprevention as a novel approach for cancer

control: proof of principle with green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. Cancer Res. **2009** Mar 1;69(5): 1712-6.

Simons ER, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. Journal of Allergy and Clinical Immunology. **2011**, 128(6): 1139-1150.

Simpson AL, Leal JN, Pugalenthi A, Allen PJ, DeMatteo RP, Fong Y, Gönen M, Jarnagin WR, Kingham TP, Miga MI, Shia J, Weiser MR, D'Angelica MI. Chemotherapy-induced splenic volume increase is independently associated with major complications after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. J Am Coll Surg. **2015** Mar; 220(3):271-80.

Singh RK, Fidler IJ. Regulation of tumor angiogenesis by organ-specific cytokines. In: Günthert U., Birchmeier W. (eds) Attempts to Understand Metastasis Formation II. Current Topics in Microbiology and Immunology, **1996**. 213(2).

Singh T, Katiyar SK. Green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces toxicity in human skin cancer cells by targeting β-catenin signaling. Toxicol Appl Pharmacol. **2013** Dec 1;273(2): 418-24.

Sirianni R, Chimento A, Malivindi R, Mazzitelli I, Andò S, Pezzi V. Insulin-like growth factor-I, regulating aromatase expression through steroidogenic factor 1, supports estrogen-dependent tumor Leydig cell proliferation. Cancer Res. **2007** Sep 1;67(17): 8368-77.

Sirianni, R, y col. Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates aromatase activity and decreases proliferation of Leydig tumor cells. J Biol Chem, **2009**. 284(42): p. 28905-16.

Soria JC. y col. Malignant Leydig cell tumor of the testis associated with Klinefelter's syndrome. Anticancer Res **1999**; 19: p. 4491-4.

Sörbo J, Jakobsson A, Norrby K. Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine1 and histamine2. Int J Exp Pathol. **1994** Feb;75(1): 43-50.

Stark H. Histamine H4 receptor: a Novel Drug Target For Immunoregulation and Inflammation. **2013**.

Stefenelli T, Kuzmits R, Ulrich W, Glogar D. Acute vascular toxicity after combination chemotherapy with cisplatin, vinblastine, and bleomycin for testicular cancer. European Heart Journal. **1988**; 9(5): 552–556.

Steinman R. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. Eur. J. Immunol. **2007**. 37: S53–60.

Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. Critical Reviews in Oncology/Hematology. **2007**; 63: 12–31.

Stocco, DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. J. Endocrinol. **2000**; 164: 247–253.

Stuart E, Scandlyn MJ, Rosengren R. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. Life Sciences. **2006**; 79: 2329–2336.

Tanaka S, Ichikawa A. Regulation of Mammalian Histamine Synthesis: Histidine Decarboxylase. Biomedical Aspects of Histamine. **2010**: 15-30.

Tanimoto A, Matsuki Y, Tomita T, Sasaguri T, Shimajiri S, Sasaguri Y. Histidine decarboxylase expression in pancreatic endocrine cells and related tumors. Pathol Int. **2004** Jun;54(6): 408-12.

Tazi MF, Mellas S, Fassi MJE, Farih MH. Leydig Cell Hyperplasia Revealed by Gynecomastia. Rev Urol. **2008** Spring; 10(2): 164–167.

Teerds K y Rijntjes E. Dynamics of Leydig Cell Regeneration after EDS: A Model for Postnatal Leydig Cell Development. En: Payne A y Hardy M (eds.),Leydig Cell in Health and Disease. Human Press Inc.; **2007**: 91-115.

Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, Church MK, Saluja R. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. Front Immunol. **2018** Aug 13;9: 1873.

Thurmond RL. Histamine in inflammation. **2010**.

Triaca V y col. Cancer stem cells-driven tumor growth and immune escape: the Janus face of neurotrophins. Aging. **2019** Dec 15; 11(23): 11770–11792.

Triggiani M, Gentile M, Secondo A, Granata F, Oriente A, Taglialatela M, Annunziato L, Marone G. Histamine Induces Exocytosis and IL-6 Production from Human Lung Macrophages Through Interaction with H1 Receptors. J Immunol. March 15, **2001**, 166 (6) 4083-4091.

Van der Ven LT, Van Buul-Offers SC, Gloudemans T, Roholl PJ, Sussenbach JS, Den Otter W. Histamine-stimulated expression of insulin-like growth factors in human glioma cells. Br J Cancer. **1997**;75(8): 1091-7.

Vega, A. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. Front Endocrinol. **2012**. 3: 150.

Verhoeven G, Dierickx P, de Moor P. Stimulation effect of neurotransmitters on the aromatization of testosterone by Sertoli cell-enriched cultures. Molecular and Cellular Endocrinology. **1979**; 13(3): 241-253.

Vowinckel J, Stahlberg S, Paulmann N, Bluemlein K, Grohmann M, Ralser M, Walther DJ. Histaminylation of glutamine residues is a novel posttranslational modification implicated in G-protein signaling. FEBS Lett**. 2012** Nov 2; 586(21): 3819-24.

Wagner AE, Piegholdt S, Rabe D, Baenas N, Schloesser A, Eggersdorfer M, Stocker A, Rimbach G . Epigallocatechin gallate affects glucose metabolism and increases fitness and lifespan in Drosophila melanogaster. Oncotarget. **2015** Oct 13; 6(31): 30568-78.

Wang CT Chang HH Hsiao CH, Lee MJ, Ku HC, Hu YJ, Kao YH. The effects of green tea (−)-epigallocatechin-3-gallate on reactive oxygen species in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes depend on the glutathione and 67 kDa laminin receptor pathways. Molecular nutrition and food research. **2009**; 53(3): p 349-360.

Wang X, Jiang P, Wang P, Yang CS, Wang X, Feng Q. EGCG Enhances Cisplatin Sensitivity by Regulating Expression of the Copper and Cisplatin Influx Transporter CTR1 in Ovary. Cancer. PLoS ONE **2015** 10(4).

Weber MA, Groos S, Höpfl U, Spielmann M, Aumüller G, Konrad L. Glucocorticoid receptor distribution in rat testis during postnatal development and effects of dexamethasone on immature peritubular cells in vitro. Andrologia**. 2000** Jan; 32(1): 23-30.

Weisburger J, Rivenson A, Reinhardt J, Braley J, Pittman B, Zang E. On the occurrence of Leydig cell tumors in the F344 rat. Cancer Letters. **2002**; 182: 213–216.

Weroha SJ, Haluska P. The insulin-like growth factor system in cancer. Endocrinology and Metabolism Clinics, **2012**.

Windom HH, McGuire WP, Hamilton RG, Adkinson NF, Jr. Anaphylaxis to carboplatin-A new platinum chemotherapeutic agent. J Allergy clin immunol. October **1992.**

Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. Roles for growth factors in cancerprogression. Physiology 2010; 25, 85–101.

Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, Wang Y, Teixeira SR, Riegger C, Weber P. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. J Nutr. **2006** Oct; 136(10): 2512-8.

Wu D, Liu Z, Li J, Zhang Q, Zhong P, Teng T, Chen M, Xie Z, Ji A, Li Y. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the growth and increases the apoptosis of human thyroid carcinoma cells through suppression of EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway. Cancer Cell Int. **2019**;19: 43.

Xu S, Wang X, Zhao J, Yang S, Dong L, Qin B. GPER-mediated, estrogen-dependent visceral hypersensitivity in stressed rats is associated with mast cell tryptase and histamine expression. Fundam Clin Pharmacol. **2020**.

Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. J Clin Diagn Res. **2015** Jun; 9(6): XE01–XE05.

Yoshikawa T, Yanai K. Histamine Clearance Through Polyspecific Transporters in the Brain. Handb Exp Pharmacol. **2017**; 241: 173-187

Young AB, Pert CD, Brown DG, Taylor KM, Snyder SH. Nuclear Localization of Histamine in Neonatal Rat Brain. Science. **1971**; 173(3993): 247-249.

Zappia, CD, Granja Galeano G, Fernandez NC, Shayo, CC, Davio CA ; Fitzsimons, CP Monczor, F. Effects of histamine H1 receptor signaling on glucocorticoid receptor activity. Role of canonical and non-canonical pathways. Scientific Reports. **2015**; 5: Article number: 17476

Zeyaullah M, Patro M, Ahmad I, Ibraheem K, Sultan P, Nehal M, Ali A. Oncolytic viruses in the treatment of cancer: a review of current strategies. Pathol Oncol Res. **2012** Oct; 18(4): 771-81.

Zirkin BR, Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. Cell & Developmental Biology. **1998**: 9: 417-421.

Zirkin BR y Papadopoulos V. Leydig cell development, function, and regulation. Biology of Reproduction, **2018**; 99(1): 101-111.

ANEXO

Fe de erratas

Sección: Introducción

Página 66: El primer párrafo de esta página se completa con la oración que aparece interrumpida: "Más aún, los ratones HDC-KO presentaron testículos de tamaño significativamente menor a los de ratones de genotipo salvaje, tanto en edad adulta como prepuberal, y severas alteraciones en la morfología de las CL desde los 7 días de edad, cuando los testículos no han terminado aún de desarrollarse."

Sección: Metodología

Página 82: Se agrega a la sección 4.1. Inmunohistoquímica, al final del primer párrafo, la siguiente aclaración:

"En cada experimento, dos tumores por cada grupo experimental fueron incluidos en parafina, y para cada uno de ellos se realizaron entre cinco y siete pseudo réplicas por anticuerpo. Se tomaron 5 fotos por anticuerpo (para cada grupo experimental) para su posterior análisis y se en cada figura se muestra una foto representativa por tratamiento".

Página 89: Se modifica en la sección 4.8.3.

"Controles negativos sin *primers*", por "controles negativos de la retrotranscripción sin enzima".

Página 97: El párrafo correspondiente al análisis estadístico se reemplaza por el siguiente:

Todos los experimentos *in vitro* fueron repetidos al menos tres veces en ensayos independientes, utilizando células pertenecientes a diferentes pasajes (no

más de ocho pasajes en total), y con múltiples réplicas por ensayo. Cada figura de la sección Resultados muestra un experimento representativo. En el caso del estudio de la proliferación celular se utilizaron 12 réplicas intra-ensayo por placa. En los experimentos restantes se realizaron 2 a 4 réplicas intra-ensayo. Los ensayos de angiogénesis *in vivo* se realizaron en los embriones viables obtenidos a partir de 100 embriones iniciales (teniendo en cuenta un 60-70 % de viabilidad según el experimento). En todos los casos, el análisis estadístico fue realizado con el programa Graph Pad Prism (Versión 6.01, GraphPad Software, Inc). Las barras de error en cada gráfico representan la media ± EE (error estándar), calculados a partir de las réplicas intra-ensayo. Los experimentos con más de dos grupos se sometieron al análisis de ANOVA de una vía seguido de contraste de Tukey para múltiples comparaciones. Para comparar medias de solamente dos grupos se empleó la prueba *t* de Student. Cada ensayo *in vivo* de inoculación de TCL se realizó una vez, con entre seis y ocho animales por grupo experimental (control, α-MHD, EGCG, CP, CP + α-MHD, CP+EGCG). En cuanto al análisis estadístico, se realizó un ANOVA de dos vías para medidas repetidas, seguido la prueba de Holm-Sidak para múltiples comparaciones. En el caso de las áreas bajo la curva, el análisis se llevó a cabo por ANOVA de una vía, al igual que en el caso de los experimentos *in vitro*. Las curvas de crecimiento se ajustaron a una regresión no lineal y se puso a prueba la hipótesis de que todas ajusten a la misma curva. Del rechazo de esa hipótesis se obtuvo una curva para cada tratamiento y su correspondiente tiempo de duplicación. En todos los casos un valor de *p* menor a 0,05 fue considerado significativo."

Sección: Resultados

<u>Página 101</u>: Se agrega al epígrafe de la Figura R1:

El ensayo se realizó con muestras de veinte controles normales, pertenecientes a los cinco estadios del desarrollo testicular. A saber, para el estadio G0 el n fue de

3, para el estadio G1 el n fue de 3, para G2 el n fue de 5, para el G3 el n fue de 3 y para G4 el n fue de 6.

Página 103: Se agrega al epígrafe de la Figura R2:

"Se utilizaron muestras de cuatro pacientes con TCL."

Página 106: Se agrega al epígrafe de la Figura R3:

"Se utilizaron muestras de dos pacientes con tumores de células de Sertoli, un paciente con hiperplasia de células de Leydig y dos pacientes con tumor de células germinales."

Página 111: Se agrega al epígrafe de la Figura R5:

"Se utilizaron muestras de cuatro pacientes con TCL y dos pacientes control del mismo estadio de desarrollo gonadal".

Página 112: Se agrega al epígrafe de la Figura R6:

"Se utilizaron muestras de dos pacientes con tumores de células de Sertoli, dos pacientes con hiperplasia de células de Leydig y dos pacientes con tumor de células germinales."

Página 164: Se agrega al epígrafe de la Figura R43:

"Se utilizaron muestras de dos testículos normales correspondientes al estadio G0 de desarrollo gonadal, dos ratones con tumores MA-10, y dos ratones con tumores R2C, ambos inyectados solamente con el vehículo.

Página 165: Se agrega al epígrafe de Figura R44:

"Se utilizaron muestras de tumores desarrollados a partir de ambas líneas celulares en dos ratones, en comparación con dos testículos pertenecientes al primer estadio del desarrollo testicular (G0)".

Página 166: Se agrega al epígrafe de la Figura R45:

"Se utilizaron muestras de dos testículos pertenecientes al primer estadio del desarrollo testicular".