

Trabajo Original



## 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. L.<sup>1</sup>; Abiuso, A.m.b.<sup>1</sup>; Berensztein, E.<sup>2</sup>; Besio Moreno, M.<sup>1</sup>; Belgorosky, A.<sup>2</sup>; Pignataro, O. P.<sup>1</sup>; Knoblovits, P.<sup>3</sup>; Suárez, S.<sup>3</sup>; Costanzo, P. R.<sup>3</sup> Y Mondillo, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Vuelta de Obligado 2490 (C1428ADN), Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup> Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Combate de los Pozos 1881 (C1245 AAM) C.A.B.A., Argentina. <sup>3</sup> Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires. Juan D. Perón 4190 (C1181ACH) C.A.B.A., Argentina.

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de agosto de 2018

Aceptado el 15 de noviembre de 2018

Palabras clave:

Vitamina D

Células de Leydig

Leydigoma

Tumor Pediátrico

Histamina

### RESUMEN

La vitamina D (VD), un esteroide pleiotrópico, ha sido relacionada con la función reproductiva masculina, pero aún no se ha estudiado la expresión de su receptor (RVD) en el desarrollo testicular. RVD regula la expresión de componentes del sistema histaminérgico, y la histamina (HA) modula la esteroidogénesis en células de Leydig (CL). Se ha relacionado a la deficiencia de VD con múltiples patologías, entre ellas cáncer. Los tumores de células de Leydig (TCL) son los más frecuentes del intersticio testicular, y al malignizar no responden a radio/quimioterapia. VD fue descripta como tratamiento para varios tumores, pero se desconoce su aplicación en TCL. Por lo expuesto, hemos estudiado la expresión de RVD en la ontogenia de testículo de rata, evaluando su correlación con los niveles de testosterona séricos (T) y el contenido de HA; y además evaluamos la expresión de RVD en testículo humano fetal, neonatal, prepuberal, TCL e hiperplasia de CL.

En testículo de rata, se observó un aumento en la expresión de RVD en CL con la edad, en línea con el incremento de T, y en contraposición con la disminución del contenido de HA, lo cual fue consistente con la reducción en los niveles de la enzima que cataliza su síntesis, HDC. Esto sugiere que la VD podría ejercer una función en el desarrollo testicular normal, ya sea en forma directa sobre las CL o mediante la regulación de la expresión de componentes del sistema histaminérgico (HDC y/o receptores de HA). Por su parte, el TCL humano presentó sobreexpresión de RVD y HDC. Considerando que las hormonas esteroideas se encuentran aumentadas en esta patología y funcionan como factores de crecimiento, si el calcitriol pudiera modular la esteroidogénesis podría tener una aplicación terapéutica.

---

**ABSTRACT**

---

**Keywords:**

Vitamin D  
Leydig Cell  
Leydigoma  
Pediatric tumor  
Histamine

Vitamin D (VD) is a steroid hormone traditionally related to bone health. However, several authors have associated VD with reproduction and steroidogenesis in males. The presence of VD receptor (VDR) and the enzymes involved in its activation had been reported in several cell types of the testes. Until now, nobody has studied VDR expression during testicular development. In addition, VDR in association with its co-activators or co-repressors, regulates the expression of several genes, including those related to the histaminergic system. Previously, we demonstrated that histamine (HA) can modulate steroidogenesis in Leydig cells (LC) in a concentration-dependent manner. Also, we observed a decrease in the endogenous HA content, consistent with the previously described decrease of HDC (histidine decarboxylase, the enzyme responsible of HA synthesis) levels, during LC ontogeny. Epidemiologic studies strongly suggest that a relationship exists between VD deficiency and multiple pathologies, particularly cancer. Leydig cell tumors (LCT) are rare endocrine tumors of unknown etiology, which originate in the testicular interstitium. The incidence worldwide is 1-3% in adults and 4% in prepubertal boys, but recent publications indicate that these figures have been increasing. While usually benign, approximately 10% of LCT in adults become malignant and do not respond to chemo or radiotherapy. It is imperative to deeply investigate the biology of LCT, to identify new therapeutic targets. The potential role of calcitriol (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin-D<sub>3</sub>) in cancer treatment has been described for several types of tumors, but it remains unexplored in LCT. Thus, as a first step, it is worth evaluating VDR expression in LCT. In view of the aforementioned evidence, herein we studied VDR expression during the rat testicular ontogeny, evaluating a possible correlation with serum testosterone (T) levels in blood, endogenous levels of HA and the previously described HDC expression levels. We also analyzed VDR expression in human testes corresponding to three different stages of development (fetal, neonatal and juvenile), in LCT and in LC hyperplasia.

**Methods:** Rat testes of different ages (7, 21, 35, 90 y 240 days), human fetal, neonatal and pre pubertal testes, a human LCT and a human LC hyperplasia; were used for detection of VDR by immunohistochemistry.

**Results:** In the rat testes, VDR expression increased with age in LC, in line with the increase in serum testosterone; and in contrast with the decrease in the endogenous content of HA and HDC levels. Likewise, we detected an increase in VDR expression with age in the human testes samples. LCT presented VDR and HDC overexpression. We also detected VDR in LC hyperplasia.

**Conclusions:** Given that VDR testicular expression increases with age in LC, as well as testosterone serum levels, it is reasonable to speculate that VD may play a role in normal testicular development, either acting directly on LC or by regulating one of more components of the histaminergic system (HDC or HA receptors). Considering that VDR is overexpressed in LCT, and that steroids are increased in this pathology (and act like growth factors); if calcitriol could modulate steroidogenesis, it could have a therapeutic role.

---

## INTRODUCCIÓN

La vitamina D (VD) es una hormona esteroidea pleiotrópica tradicionalmente vinculada con la salud mineral ósea. Sin embargo, se ha demostrado ampliamente que el calcitriol ( $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina $\text{D}_3$ ), la forma activa de la VD, interviene en la regulación de múltiples procesos fisiológicos<sup>1-3</sup>. En este sentido, varios trabajos han relacionado a la VD con la función reproductiva masculina reportando la presencia del receptor de VD (RVD), y de las enzimas capaces de metabolizarla, en distintos tipos celulares del testículo<sup>4</sup>, e incluso, se ha expuesto una correlación con la producción de los esteroides sexuales, testosterona y estradiol, en dicha gónada<sup>5-7</sup>. A la fecha, no se ha estudiado la expresión de RVD a lo largo del desarrollo testicular normal. El RVD es miembro de la familia de receptores nucleares, y se encuentra presente en la mayoría de las células del cuerpo. Mediante su unión al calcitriol, y asociado a co-activadores o co-represores, regula de manera directa o indirecta entre el 3–5% del genoma humano<sup>8</sup>. Entre los genes regulados por RVD se incluye HRH1, que codifica para el receptor a histamina (HA) subtipo H1<sup>9</sup>. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la HA, mediante su interacción con HRH1 y los subtipos de receptores histaminérgicos H2 y H4 (HRH2 y HRH4, respectivamente) modula la esteroidogénesis en células de Leydig, en forma bifásica y concentración-dependiente<sup>10</sup>. Asimismo, hemos observado una disminución de la enzima que cataliza la síntesis de HA a partir de L-Histidina, Histidina descarboxilasa (HDC), durante la ontogenia de las células de Leydig<sup>11</sup>.

Estudios epidemiológicos recientes han sugerido fuertemente que la deficiencia de VD no sólo se relaciona con raquitismo y osteomalacia, sino también con mayor riesgo de diabetes y de enfermedades cardiovasculares, infecciosas, autoinmunes y oncológicas<sup>12,13</sup>. Los tumores de células de Leydig (TCL) son un tipo poco común de tumores endócrinos, de etiología aún desconocida, que se originan en el intersticio testicular. Comprenden del 1-3% de las neoplasias testiculares en adultos y el 4% en niños prepuberales, pero su incidencia se encuentra en aumento. Si bien son normalmente benignos, aproximadamente un 10% de los TCL en pacientes adultos maligniza y no responde a radioterapia y/o quimioterapia<sup>14-16</sup>.

Lo expuesto resalta la necesidad de conocer más profundamente la biología de los TCL, a fin de identificar nuevos blancos para su tratamiento. Al respecto, en publicaciones previas se ha reportado el potencial uso terapéutico del calcitriol en cáncer de mama, de próstata y colorrectal, en los que los niveles de VD circulantes correlacionan con un mejor pronóstico y una mayor supervivencia<sup>17-20</sup>. Sin embargo, poco se conoce aún acerca de su posible aplicación en TCL. En este contexto, resulta fundamental como un primer paso, investigar la expresión de RVD en estos tumores.

En el presente trabajo se planteó analizar la expresión RVD en la ontogenia de testículo de rata, evaluando una posible correlación con los niveles de testosterona (T) circulantes y el

contenido endógeno de HA. Asimismo, se estudió la expresión de RVD en testículo humano fetal, neonatal y juvenil, y también en TCL e hiperplasia de células de Leydig. Finalmente, se investigó la potencial regulación de la expresión génica de RVD por calcitriol, HA y testosterona en TCL, empleando el modelo de células de Leydig tumorales de rata R2C, ya validado para el estudio de Leydigomas debido a la similitud que presentan con el fenotipo de los TCL<sup>16-21</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Reactivos generales

El calcitriol fue generosamente donado por el Dr. Alejandro Curino (Laboratorio de Biología del Cáncer, INIBIBB-CONICET, Bahía Blanca, Argentina). La testosterona, histamina dehidrocloruro, 3,3-diaminobenzidina (DAB), HEPES, carbón activado, 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 medio Ham's/F12, fue comprado a Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU). El suero de caballo, el suero fetal bovino y la solución de tripsina/EDTA (0,25% /1 mM) fueron obtenidas en Gibco Laboratories (Grand Island, NY, EEUU). La penicilina-estreptomomicina se compró en Invitrogen (Carlsbad, CA). El material de cultivo utilizado fue de Corning y Falcon. Para la preparación de los medios, se utilizaron unidades filtrantes de acetato de celulosa (0,22  $\mu\text{m}$ ) de Corning Incorporated (Corning, NY, US). La [ $2,3,4,5$ - $^3\text{H}$ ]- Testosterona (80 Ci/mmoL) fue obtenida de Amersham International (Buckinghamshire, GB). El anticuerpo anti-Testosterona fue una donación del Dr. GD Niswender (Animal Reproduction, Biotechnology Lab, Colorado State University, Fort Collins, EEUU). Los demás reactivos utilizados fueron del mejor grado disponible y obtenidos de los proveedores usuales.

### Material Clínico

Todas las muestras de material humano fueron obtenidas a partir de biopsias de pacientes pediátricos, con su correspondiente consentimiento informado firmado por los padres de los pacientes antes de las cirugías. El diseño del estudio, los procedimientos de recolección de muestras y el formulario para el consentimiento informado fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan (Buenos Aires, Argentina). La utilización de muestras humanas se realizó de acuerdo a la Declaración de Helsinki (Ratificada en 2013).

### Inmunohistoquímica en cortes de testículo

Se utilizaron muestras de testículo normal fetales, neonatales y prepuberales, hiperplasias de Leydig y tumores de Leydig, cortadas en secciones de 10  $\mu\text{m}$ , las cuales se incubaron con anticuerpo primario monoclonal anti-receptor de vitamina D hecho en ratón (Concentración 1:50, sc-13133, Santa Cruz, CA, USA). Luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón

hecho en caballo (Vector Laboratories, CA, EE.UU.). La inmunomarca se generó por el método de estreptavidina-biotina y peroxidasa, según indicaciones del fabricante (DAKO Catalyzed Signal Amplification System, HRP, Dako Cytomation, CA, EE.UU.). Se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por suero de ratón según correspondiera. En este caso no se detectó inmunoreactividad.

#### **Modelo animal**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 7, 21, 35, 90 y 240 días, criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, respetándose en todo momento las reglas de la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH).

#### **Inmunohistoquímica en testículos de rata**

Los testículos de ratas se fijaron en Bouin y se incluyeron en parafina. Se utilizaron secciones de 10  $\mu$ m, las cuales se incubaron con anticuerpo primario policlonal anti-histamina hecho en conejo (concentración 1:100, HIST12-A, Alpha Diagnostics International, TX, EE.UU.) o con anticuerpo primario monoclonal anti-receptor de vitamina D hecho en ratón (Concentración 1:50, sc-13133, Santa Cruz, CA, USA). Luego se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo hecho en cabra o anticuerpo secundario anti-ratón hecho en caballo (Vector Laboratories, CA, EE.UU.) según corresponda. La inmunomarca se generó por el método de estreptavidina-biotina y peroxidasa, según indicaciones del fabricante (DAKO Catalyzed Signal Amplification System, HRP, Dako Cytomation, CA, EE.UU.). Se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por suero de conejo o ratón según correspondiera. En ninguno de los dos casos se detectó inmunoreactividad.

#### **Cuantificación de los niveles de esteroides en suero de rata**

##### **Extracción de Testosterona de suero de rata**

Para medir los niveles de testosterona en suero de rata, inmediatamente luego de sacrificar al animal por asfixia en cámara de CO<sub>2</sub>, se tomó una muestra de sangre por punción cardíaca. Después de la formación del coágulo el tubo fue centrifugado a 800 x g por 15 minutos a 4°C y el suero obtenido se separó y se reservó a -20°C. Los esteroides se extrajeron del suero mediante una separación en fase orgánica. Para ello se tomó una alícuota de 200  $\mu$ l de suero y se la colocó en un tubo de vidrio cónico. Se agregaron 2,5 mL de éter etílico (fase orgánica), se agitó en un vórtex en forma continua por 30 segundos y se dejó decantar por 15 minutos a -70°C. La fase orgánica superior conteniendo los esteroides fue recuperada y con la fase inferior (suero) se repitió una vez más el proceso de extracción. Los dos extractos orgánicos se juntaron en un único tubo y se llevó a evaporación bajo flujo continuo de N<sub>2</sub>, sobre una plancha caliente. El extracto seco se disolvió en 300  $\mu$ L de buffer RIA y se reservó a -20°C hasta la posterior determinación de testosterona.

#### **Dosaje de esteroides por Radioinunoensayo (RIA)**

Para cuantificar los niveles de esteroides en el suero de ratas, se empleó la técnica de radioinunoensayo (RIA). La cuantificación de testosterona se realizó por duplicado. Se utilizaron anticuerpos específicos previamente titulados para determinar la dilución óptima a usar, correspondiente al 40% de unión de la hormona tritiada de referencia (aproximadamente 10000 cpm). Brevemente, alícuotas de 100  $\mu$ l del medio de incubación (o de la dilución adecuada) fueron transferidas a tubos de plástico, donde se agregaron 200  $\mu$ L de buffer RIA (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM; NaCl 150 mM; azida sódica 0,01% y gelatina 0,1%; pH 7,0), 100  $\mu$ L de hormona tritiada y 100  $\mu$ L de la dilución óptima del anticuerpo. Las muestras fueron incubadas durante 16 h a 4°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 (Opti/Phase Hi Safe 3, ETC, Buenos Aires, Argentina). La radioactividad de los mismos se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Perkin-Elmer Tri Carb 2800TR (65% de eficiencia). El rango de utilidad del ensayo fue de 25 a 1600 pg/tubo para progesterona, y de 12,5 a 800 pg/tubo para testosterona (volumen final/tubo: 500  $\mu$ L). Los coeficientes de variación intra e interensayo en ambos casos fueron menores al 12%.

#### **Cultivo de células de Leydig tumorales R2C**

La línea de células de Leydig tumorales de rata R2C fue comprada a la ATCC (# 58649146). Se cultivó en medio rico en nutrientes Ham's/F12, conteniendo 1,2 g/L de bicarbonato de sodio, Glutamina 2 mM, Penicilina 100 U/mL y Estreptomicina 100  $\mu$ g/mL, suplementado con suero de caballo al 12,5% y suero fetal bovino al 2,5% (medio de crecimiento), a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **Cuantificación de niveles de mensajero por RT-qPCR**

Se trataron células de Leydig tumorales R2C con testosterona (10  $\mu$ M, disuelta en PBS), calcitriol (1 nM, disuelta en alcohol isopropílico), histamina (1  $\mu$ M y 1 nM, disuelta en PBS), PBS (control vehículo de T y HA) o alcohol isopropílico (control vehículo del calcitriol) isopropílico, durante 5 h y se determinó mediante RT-qPCR la expresión de RVD. Brevemente, se extrajo RNA total de las células R2C usando TRIzol Reagent (Thermo Fischer Scientific) de acuerdo al protocolo del vendedor. Se realizó la transcripción reversa del RNA usando primers aleatorios y la enzima MMLV (Promega, Madison, WI, EEUU). La PCR en tiempo real se realizó utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Basilea, Suiza) en el equipo Step One Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) usando primers específicos para RVD (5'-TGA CCC CAC CTA CGC TGA CT-3'; 5'-CCT TGG AGA ATA GCT CCC TGT ACT-3, previamente utilizado<sup>23</sup>). Los parámetros configurados fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40



ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 60 segundos a 60°C. Como gen de referencia para relativizar se utilizó GAPDH (5'- GGG TGT GAA CCA CGA GAA AT -3'; 5'- ACT GTG GTC ATG AGC CCT TC -3', previamente utilizado<sup>23</sup>).

#### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., CA, EEUU) y contrastados mediante un ANOVA de una vía, seguidos del test de Tukey para comparaciones múltiples. Para comprar la media de dos grupos se utilizó el test T de Student. En todos los casos un  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo para tres ensayos independientes.

## RESULTADOS

### Expresión del receptor de vitamina D en la ontogenia del testículo de rata.

A los 7 días de edad, se detectó expresión de RVD en los túbulos seminíferos, así como también en las células peritubulares. Particularmente, se observó una marca conspicua en los nidos de células de Leydig fetales (Fig. 1 a). A los 21 días de edad, la inmunomarca en el túbulo seminífero disminuyó, en las células peritubulares se mantuvo, mientras que el intersticio no se detectó (Fig. 1 b). A los 35 días de edad se observó un aumento de la marca en el intersticio, y, particularmente, una clara expresión de RVD en las células de Leydig. Las células peritubulares y el túbulo seminífero mantuvieron la misma expresión que en la edad previa (Fig. 1 c). A los 90 días de edad la rata ya ha alcanzado la pubertad y produce espermatozoides, los cuales se pueden visualizar claramente en la luz del túbulo. A esta edad, se observó un aumento en la expresión de RVD en el intersticio, con marcación abundante en las células de Leydig. Por otro lado, se observó una disminución en la inmunomarca de las células peritubulares y un aumento en el túbulo seminífero. Por último, a los 240 días de edad las células de Leydig mantuvieron una alta expresión de RVD. En las células peritubulares no se vio alterada su expresión y se vio un aumento moderado en el túbulo seminífero (Fig. 1 c).

### Contenido endógeno de histamina en células de Leydig en la ontogenia del testículo de rata.

En los testículos de ratas de 7 días se detectó una intensa inmunomarca de HA en nidos de células de Leydig fetales (Fig. 2 a). En los cortes de 21 días de edad se observaron células de Leydig marcadas, pero en menor proporción (Fig. 2 b). A los 35 días de edad se detectó una marca más sutil y difusa en el citoplasma de células de Leydig (Fig. 2 c). A los 90 días de edad la inmunomarca de HA disminuyó en el intersticio, y, particularmente en las células de Leydig no se observó marca en su citoplasma (Fig. 2 d). Este patrón también se obtuvo en los cortes de 240 días de edad (Fig. 2 e).

### Concentración de testosterona en suero de rata a distintas edades.

Se observó que conforme aumenta la edad aumenta la concentración de testosterona en suero de ratas macho (Fig. 3).

### Expresión del receptor de vitamina D en células de Leydig en testículo humano de distintos grupos etarios y condiciones patológicas.

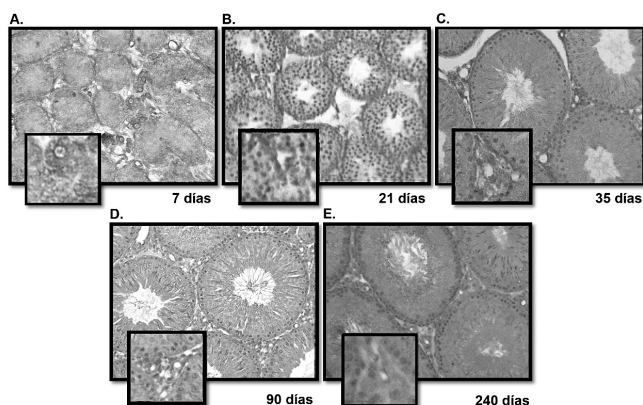
En las condiciones normales, se observó que en cortes de testículos fetales la expresión de RVD en las células de Leydig fetales resultó positiva, y muy intensa, y menor que en la observada en cortes de neonatales. En el caso del testículo prepupal se observó un intersticio mayormente negativo (Tabla I).

En cuando a las condiciones patológicas evaluadas, en las hiperplasias de células de Leydig se detectó marca positiva para RVD, pero menor que la observada en el tumor de células de Leydig. Este último, a su vez, poseía una sobreexpresión de RVD, aún mayor que la observada en las células de Leydig fetales (Tabla I).

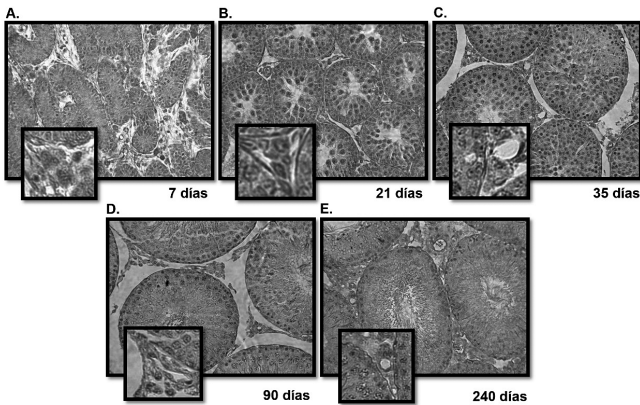
### Modulación in vitro de la expresión génica de RVD en células de Leydig tumorales de rata, R2C.

Con el fin de evaluar la modulación de la expresión génica de RVD, se trataron células de Leydig tumorales de rata (R2C) con posibles estimuladores de la misma, y se analizaron los niveles de expresión relativa. En presencia del estímulo de calcitriol (1 nM) se obtuvo un aumento de 180 veces respecto al control ( $p < 0,05$ ). En igual medida, se vio un aumento estimulado por testosterona (10  $\mu$ M) ( $p < 0,01$ ), mientras que la histamina (1nM) logró producir un aumento significativo de la expresión de RVD ( $p < 0,05$ ), pero de menor magnitud que testosterona y calcitriol (Fig. 4).

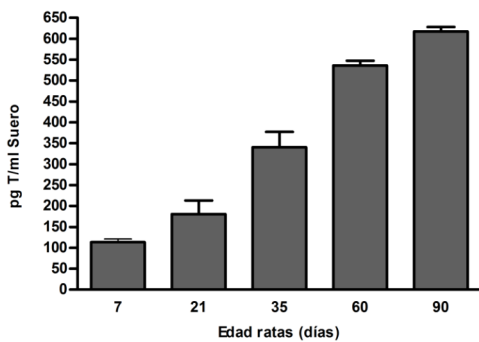
Figura 1:  
Inmunohistoquímica del receptor de Vitamina D (RVD) en cortes de testículo de rata de distintas edades (expresada en días).  
Ampliación del intersticio testicular (abajo a la izquierda).



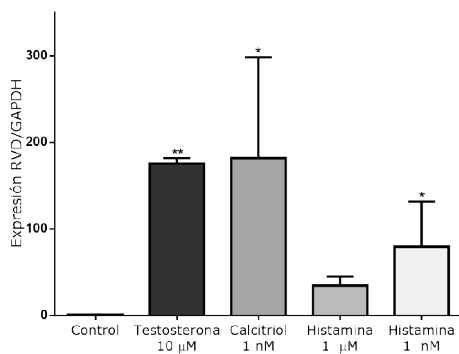
**Figura 2:** Inmunohistoquímica de Histamina en cortes de testículo de rata de distintas edades (expresada en días). Ampliación del intersticio (abajo a la izquierda).



**Figura 3:** Concentración de testosterona (pg/mL) en suero de ratas de distintas edades, expresada en días.



**Figura 4:** Expresión génica relativa del receptor de vitamina D (RVD) en células de Leydig tumorales murinas R2C expuestas a testosterona (10 µM), calcitriol (1 nM) e histamina (1 µM y 1 nM). En todos los casos la expresión génica fue relativizada a la expresión de GAPDH.



**Tabla 1.** Inmunomarcación del receptor de vitamina D (RVD) en células de Leydig en cortes de testículo de humano normales de distintos grupos etarios (fetal, neonatal y prepuberal) y en dos condiciones patológicas (hiperplasia de células de Leydig y tumor de células de Leydig [TLC]). – ausencia de inmunomarcación, + marcación moderada, ++ marcación media, y +++ marcación abundante.

RVD	NORMAL			PATOLÓGICO	
	FETAL	NEONATAL	PREPUBERAL	HIPERPLASIA	TLC
	++	+	-	+	+++

## DISCUSIÓN

Previamente se ha relacionado a la VD con la función reproductiva masculina, particularmente con la fertilidad<sup>24,25</sup> y la producción de esteroides sexuales<sup>26,27</sup>. En el presente trabajo, se evaluó la expresión del receptor de vitamina D (RVD) en las células de Leydig durante la ontogenia testicular, como un primer paso hacia la comprensión del papel de la VD a lo largo del desarrollo testicular normal.

En mamíferos, las células de Leydig (CL) existen en dos poblaciones, las fetales y las adultas, y se encuentran presentes en distintos momentos del desarrollo testicular<sup>28</sup>. Estos tipos celulares difieren en su morfología y propiedades bioquímicas, pero poseen una función en común, la producción de andrógenos. Las células de Leydig fetales (CLF) se desarrollan in utero, y son las responsables de la producción de testosterona gestacional<sup>29</sup>, que tiene el rol clave de la diferenciación del sistema urogenital masculino<sup>30</sup>. En el testículo de rata se pueden identificar grandes nidos de CLF hasta los 21 días de edad<sup>31</sup>. Las células de Leydig adultas (CLA) surgen en la pubertad, y provienen de un linaje distinto al de las fetales<sup>32</sup>. En este trabajo, en los cortes de rata de 7 y 21 días de edad, fue posible reconocer a las CLF por su ubicación intersticial, su agrupación en nidos y su morfología esférica. Estas células mostraron altos contenidos de histamina endógena (HA) y una elevada expresión de RVD. Esto último se vio replicado en los cortes de testículo fetal y neonatal de humano. Previamente nuestro grupo demostró que las CL de ratas de 7 y 21 días de edad presentan elevados niveles de expresión de la enzima histidina descarboxilasa (HDC), que cataliza la producción de HA<sup>11</sup>, lo cual explicaría el alto contenido endógeno de HA observado. Asimismo, nuestro grupo reportó que la HA en concentraciones de orden micromolar resulta inhibitoria para la esteroidogénesis en CL, en tanto que concentraciones del orden nanomolar potencian efectos estimulatorios sobre dicho proceso<sup>10,33</sup>. Teniendo en cuenta estas evidencias, es posible que la HA sea un componente regulador de la producción del pico de andrógenos, secretado por las CLF, responsable de la diferenciación sexual<sup>30</sup>. Por su parte, RVD podría modular la susceptibilidad de las CL a las acciones de la HA, dado que, unido a ligando, RVD modula la expresión génica de los receptores de HA tipo 1 (HRH1)<sup>9</sup> y tipo 4 (HRH4)<sup>34</sup>. Asimismo, RVD podría exacerbar la producción de HA endógena, ya que se ha visto que aumenta la expresión génica de HDC<sup>34</sup>. Independientemente, RVD unido a ligando es capaz de inducir la producción de testosterona por parte de las CL<sup>35</sup>, así como también de modular la expresión de aromatasas y la producción de estrógenos<sup>26,27</sup>.

Al analizar los cortes de testículo de 35, 90 y 240 días de edad no se encontraron CLF remanentes, y las inmunomarcas observadas se encontraron en CL inmaduras (en el caso de 35 días de edad) o en CLA (en el caso de 90 y 240 días de edad)<sup>36</sup>. En dichos tipos celulares no se encontró HA. Nuevamente, estos

resultados concuerdan con lo observado para la expresión de HDC, que disminuye en el testículo conforme avanza la edad<sup>11</sup>. En el caso de RVD, se vio que en CLA su expresión aumentaba con la edad, lo cual fue concordante con el aumento de testosterona sérica (T). Al respecto, si bien se ha correlacionado previamente a la VD y la T, sin poder determinar claramente qué hormona precede a la otra<sup>37</sup>, se ha visto que los suplementos de VD aumentan los niveles de T<sup>38, 41</sup>. En el testículo prepuberal humano no se detectó expresión de RVD. Esto puede deberse a que en dicho corte no se observaron CLA, sino solo CL inmaduras o incluso progenitoras. Es posible que RVD cumpla un rol como modulador de la esteroidogénesis luego de la pubertad, asociado a CLA, pero no a CL de estadios menos diferenciados.

En trabajos previos se ha reportado que la VD es un importante modulador de la diferenciación celular y la proliferación de células normales y tumorales, y que es capaz de regular la proliferación, apoptosis y adhesión celular en distintos tipos de células tumorales, modificando la capacidad de angiogénesis, invasión y metástasis<sup>42, 45</sup>. Por ello, en este trabajo se analizó la presencia de RVD en hiperplasia de CL y tumores de CL (TCL). Particularmente en el caso de las hiperplasias, se observó que presentaban inmunomarca de RVD. Las hiperplasias de CL se originan a partir de una desregulación de la relación entre LH (hormona luteinizante) y T. A su vez, se ha visto que los ratones knockout para RVD desarrollan más hiperplasias de CL<sup>46</sup>. Esto plantea a posibilidad de que la VD regule la relación entre LH y T, y en condiciones de hipovitaminosis, este balance se pierda dando lugar a la hiperplasia. Sin duda, estudios más profundos permitirán corroborar esta hipótesis.

En base a las publicaciones que muestran una correlación entre la hipovitaminosis D, y la incidencia y supervivencia en cáncer<sup>18, 47, 53</sup>, se ha propuesto al calcitriol, compuesto activo de VD, como tratamiento oncológico (a modo preventivo y en combinación con otras terapias)<sup>54, 56</sup>. En concordancia, si bien en el presente trabajo no fue posible saber si el origen del TCL tenía relación con los niveles séricos de VD, se detectó alta expresión de RVD. Por otro lado, resultados previos empleando la línea de células de Leydig tumorales de rata R2C - el modelo más ampliamente utilizado para el estudio de Leydigomas - mostraron que el tratamiento con calcitriol disminuye la expresión de aromatasa<sup>34</sup>, que se encuentra aumentada en TCL<sup>23</sup>, y al mismo tiempo aumenta los niveles del receptor HRH1, que media la respuesta antiproliferativa de HA<sup>34</sup> (en contraposición a la respuesta proliferativa que se produciría por la unión de la HA al receptor HRH2)<sup>10</sup>. A su vez, en este trabajo se observó que tanto la T como la HA fomentan la expresión de RVD en R2C. Estos hallazgos permitirían explicar la sobreexpresión de RVD observada en el TCL estudiado, ya que los TCL sintetizan esteroides en forma constitutiva y poseen elevados niveles de HDC<sup>57</sup>. Se ha postulado que RVD en ausencia de ligando, aumenta la proliferación celular, y que este efecto se disipa en presencia de ligando<sup>58</sup>. Así, la sobreexpresión de RVD en

condiciones de hipovitaminosis resultaría contraproducente. Esta observación cobra mayor importancia si se considera que la prevalencia de la deficiencia de la vitamina D (VD) es más alta de lo que tradicionalmente se ha supuesto, inclusive en regiones tropicales donde hay mejor exposición solar. Esta deficiencia se está convirtiendo en una situación epidémica en aumento, aún no bien reconocida, con serias implicancias en la salud de la población<sup>13, 48, 59</sup>.

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que la VD está involucrada en múltiples vías en las CL, como lo son la esteroidogénesis y la regulación del sistema histaminérgico, en condiciones normales y patológicas. Resulta entonces prometedor considerar a la VD como un posible tratamiento adicional en TLC, lo cual amerita la realización de estudios más exhaustivos al respecto.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G.** Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* 2016, 96: 365–408.
2. **Lin R, White JH.** The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 2004, 26: 21–8.
3. **Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C.** Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int.* 2010, 78: 140–145.
4. **Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jørgensen A, Rajpert-De Meyts E, Kristensen DM, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Juul A, Leffers H.** Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Hum. Reprod.* 2010, 25: 1303–1311.
5. **Merke J, Hügel U, Ritz E.** Nuclear testicular 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in sertoli cells and seminiferous tubules of adult rodents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 127: 303–309.
6. **Uhland AM, Kwiecinski GG, DeLuca HF.** Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats. *J. Nutr.* 1992, 122: 1338–1344.
7. **Corbett ST, Hill O, Nangia AK.** Vitamin D receptor found in human sperm. *Urology* 2006, 68: 1345–1349.
8. **Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, Jurutka PW.** Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif. Tissue Int.* 2013, 92: 77–98.
9. **Pochampally RR, Ylostalo J, Penforis P, Matz RR, Smith JR, Prockop DJ.** Histamine receptor H1 and dermatopontin: new downstream targets of the vitamin D receptor. *J. Bone Miner. Res.* 2007, 22: 1338–1349.
10. **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.
11. **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: 1–10.
  12. **Hansen CM, Binderup L, Hamberg KJ, Carlberg C.** Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Front. Biosci.* 2001, 6: D820–48.
  13. **Zuluaga Espinosa NA, Alfaro Velásquez JM, González VB, Jiménez Blanco EK, Campuzano Maya G.** Vitamina D: nuevos paradigmas. *Med. Lab.* 2011, 17: 211–246.
  14. **Basciani S, Brama M, Mariani S, Luca G De, Arizzi M, Vesce 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.
  15. **Sugimoto K, Matsumoto S, Nose K, Kurita T, Uemura H, Park Y-C, Hanai J.** A malignant Leydig cell tumor of the testis. *Int. Urol. Nephrol.* 2006, 38: 291–292.
  16. **Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Zolea F, Carpino A, Rago V, Maggiolini M, Andò S, Pezzi V.** Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates aromatase activity and decreases proliferation of leydig tumor cells. *J. Biol. Chem.* 2009, 284: 28905–28916.
  17. **Swami S, Krishnan A V., Wang JY, Jensen K, Peng L, Albertelli MA, Feldman D.** Inhibitory Effects of Calcitriol on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice: Selective Modulation of Aromatase Expression in vivo. *Horm. Cancer* 2011, 2: 190–202.
  18. **Feldman D, Krishnan A V., Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ.** The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer* 2014, 14: 342–357.
  19. **Miles FL, Goodman PJ, Tangen C, Torkko KC, Schenk JM, Song X, Pollak M, Thompson IM, Neuhaus ML.** Interactions of the insulin-like growth factor axis and vitamin D in prostate cancer risk in the prostate cancer prevention trial. 2017, *Nutrients* 9: 1–13.
  20. **Krajewski W, Dzięgała M, Kołodziej A, Dembowski J, Zdrojowy R.** Vitamin D and urological cancers. *Cent. Eur. J. Urol.* 2016, 69: 139–147.
  21. **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.
  22. **Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA.** Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase- polymerase chain reaction. *J. Mol. Endocrinol.* 2003, 31: 123–32.
  23. **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.
  24. **Fu L, Chen YH, Xu S, Ji YL, Zhang C, Wang H, Yu DX, Xu DX.** Vitamin D deficiency impairs testicular development and spermatogenesis in mice. *Reprod. Toxicol.* 2017, 73: 241–249.
  25. **Jin H, Huang Y, Jin G, Xue Y, Qin X, Yao X, Yue W.** The vitamin D receptor localization and mRNA expression in ram testis and epididymis. *Anim. Reprod. Sci.* 2015, 153: 29–38.
  26. **Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y.** Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads<sup>1</sup>. *Endocrinology* 2000, 141: 1317–1324.
  27. **Zanatta L, Bouraïma-Lelong H, Delalande C, Silva FRMB, Carreau S.** Regulation of aromatase expression by 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in rat testicular cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011, 23: 725–735.
  28. **Whitehead RH.** The embryonic development of the interstitial cells of leydig. *Am. J. Anat.* 1904, 3: 167–182.
  29. **Habert R, Picon R.** Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 $\beta$  levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J. Steroid Biochem.* 1984, 21: 193–198.
  30. **Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ.** Fetal Leydig Cells: Cellular Origin, Morphology, Life Span, and Special Functional Features. *Exp. Biol. Med.* 1992, 201: 125–140.
  31. **Kerr JB, Knell CM.** The fate of fetal Ley dig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 1988, 103: 535–544.
  32. **Zirkin BR.** Where Do Adult Leydig Cells Come From?1. *Biol. Reprod.* 2010, 82: 1019–1020.
  33. **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: 144–52.
  34. **Varela ML, Abiuso AMB, Besio Moreno M, Pignataro OP, Knoblovits P, Suarez S, Costanzo P, Mondillo C.** Vitamin D modifies steroidogenesis and regulates the expresion of components of the histaminergic system in tumoral Leydig cells. *Medicina (B. Aires).* 2017, 77: 176–177.



35. **Huang Y, Jin H, Chen J, Jiang X, Li P, Ren Y, Liu W, Yao J, Folger JK, Smith GW, Lv L.** Effect of Vitamin D on basal and Luteinizing Hormone (LH) induced testosterone production and mitochondrial dehydrogenase activity in cultured Leydig cells from immature and mature rams. *Anim. Reprod. Sci.* 2015, 158: 109–114.
36. **Chen H, Ge R-S, Zirkin BR.** Leydig Cells: From Stem Cells to Ageing. *Mol. Cell Endocrinol.* 2009, 306: 9–16.
37. **Blomberg Jensen M.** Vitamin D and male reproduction. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014, 10: 175–86.
38. **Hofer D, Münzker J, Schwetz V, Ulbing M, Hutz K, Stiegler P, Zigeuner R, Pieber TR, Müller H, Obermayer-Pietsch B.** Testicular synthesis and vitamin D action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014, 99: 3766–73.
39. **Sinha RB, Banerjee P, Ganguly AK.** Serum concentration of testosterone, epididymal mast cell population and histamine content in relation to sperm count and their motility in albino rats following H2 receptor blocker treatment. *Nepal Med. Coll. J.* 2006, 8: 36–9.
40. **Roussev B, Gerova D, Kosev P, Hinev A, Svinarov D, Galunska B.** Is vitamin D associated with testosterone in benign prostate hyperplasia? *Scr. Sci. Medica* 2016, 48: 13-21
41. **Pilz S, Frisch S, Koertke H, Kuhn J, Dreier J, Obermayer-Pietsch B, Wehr E, Zittermann A.** Effect of vitamin D supplementation on testosterone levels in men. *Horm. Metab. Res.* 2011, 43: 223–225.
42. **Cheung FS, Lovicu FJ, Reichardt JK.** Current progress in using vitamin D and its analogs for cancer prevention and treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2012, 12: 811–837.
43. **Berridge MJ.** Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 460: 53–71.
44. **Schauber J, Gallo RL.** The vitamin D pathway: A new target for control of the skin's immune response? *Exp. Dermatol.* 2008, 17: 633–639.
45. **Skowronski J, Peehl M.** Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology.* 2014, 132: 1952–1960.
46. **Blomberg Jensen M, Lieben L, Nielsen JE, Willems A, Jørgensen A, Juul A, Toppari J, Carmeliet G, Rajpert-De Meyts E.** Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse model: Targeting estrogen signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013, 377: 93–102.
47. **Oliveri B, Plantalech L, Bagur A, Wittich A, Rovai G, Pusioli E, Ló Pez Giovanelli J, Ponce G, Nieva A, Chaperó N 9 A, Ladizesky M, Somoza J, Casco C, Zeni S, Parisi M, Mautalen C.** High prevalence of vitamin D insufficiency in healthy elderly people living at home in Argentina. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004, 58: 337–342.
48. **Thacher TD, Fischer PR, Strand MA, Pettifor JM.** Nutritional rickets around the world: causes and future directions. *Ann. Trop. Paediatr.* 2006, 26: 1–16.
49. **Swami S, Krishnan A V., Wang JY, Jensen K, Horst R, Albertelli MA, Feldman D.** Dietary Vitamin D<sub>3</sub> and 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) Exhibit Equivalent Anticancer Activity in Mouse Xenograft Models of Breast and Prostate Cancer. *Endocrinology.* 2012, 153: 2576–2587.
50. **Mondul AM, Weinstein SJ, Layne TM, Albanes D.** Vitamin D and cancer risk and mortality: State of the science, gaps, and challenges. *Epidemiol. Rev.* 2017, 39: 28–48.
51. **Ooi LL, Zhou H, Kalak R, Zheng Y, Conigrave AD, Seibel MJ, Dunstan CR.** Vitamin D deficiency promotes human breast cancer growth in a murine model of bone metastasis. *Cancer Res.* 2010, 70: 1835–1844.
52. **Blomberg Jensen M, Jørgensen A, Nielsen JE, Steinmeyer A, Leffers H, Juul A, Rajpert-De Meyts E.** Vitamin D Metabolism and Effects on Pluripotency Genes and Cell Differentiation in Testicular Germ Cell Tumors In Vitro and In Vivo. *Neoplasia.* 2012, 14: 952-IN18
53. **Rai V, Abdo J, Agrawal S, Agrawal DK.** Vitamin D Receptor Polymorphism and Cancer: An Update. *Anticancer Res.* 2017, 37: 3991–4003.
54. **Hansen CM, Hamberg KJ, Binderup E, Binderup L.** Seocalcitol (EB 1089): a vitamin D analogue of anti-cancer potential. Background, design, synthesis, pre-clinical and clinical evaluation. *Curr. Pharm. Des.* 2000, 6: 803–28.
55. **Chen TC, Holick MF.** Vitamin D and prostate cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003, 14: 423–430.
56. **Duffy MJ, Murray A, Synnott NC, O'Donovan N, Crown J.** Vitamin D analogues: Potential use in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2017, 112: 190–197.
57. **Abiuso, AM, Besio Moreno M, Belgorosky A, Rivarola M, Pignataro O, Berensztein EB, Mondillo C.** Histidine Decarboxylase as a Novel Therapeutic Target for the Treatment of Leydig Cell Tumors in Prepubertal Boys. *Hormone Research in Paediatrics.* 2016, 86: 81-82.
58. **Trivedi T, Zheng Y, Fournier PGJ, Murthy S, John S, Schillo S, Dunstan CR, Mohammad KS, Zhou H, Seibel MJ, Guise TA, Trivedi T, Zheng Y, Fournier PGJ, Murthy S, John S, Schillo S, Dunstan CR, Mohammad KS, Zhou H, Seibel MJ, Guise TA.** The vitamin D receptor is involved in the regulation of human breast cancer cell growth via a ligand-independent function in cytoplasm. 2017, *Oncotarget* 8: 20: 26687–26701.
59. **Tau C, Bonifacino M, Scaiola E,** Colaboradores. Deficiencia de vitamina D en la población materno-infantil del Sur Argentino. *Med. Infant.* 2004, 11: 199–204.

