



## Trabajo original

# Inhibidores de histidina decarboxilasa atenúan la actividad proangiogénica de células de Leydig tumorales: ¿Potencial terapia neoadyuvante para el tratamiento de leydigomas?



A.M.B. Abiuso<sup>a</sup>, M.L. Varela<sup>a</sup>, L. Haro Durand<sup>b</sup>, M. Besio Moreno<sup>a</sup>, R. Ponzio<sup>c</sup>, M. Rivarola<sup>d</sup>, A. Belgorosky<sup>d</sup>, O. Pignataro<sup>a</sup>, E. Berensztein<sup>d</sup>, C. Mondillo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</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>b</sup>Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IBYME-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

<sup>c</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

<sup>d</sup>Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires, Argentina.

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 2 de febrero de 2018

Aceptado el 23 de abril de 2018

Palabras clave:

Histidina decarboxilasa

Angiogénesis

Leydigoma

Tumor Pediátrico

Histamina

Título abreviado:

Rol de HDC en angiogénesis tumoral

## RESUMEN

Los tumores de células de Leydig (TCL) son tumores endócrinos del intersticio testicular, cuya incidencia se encuentra en aumento. Los síntomas incluyen feminización o virilización en pacientes prepuberales, y pérdida de libido, disfunción eréctil, infertilidad y/o ginecomastia en adultos. Si bien son usualmente benignos, cuando malignizan en adultos no responden a radio y quimioterapia. Múltiples trabajos han reportado que la histidina decarboxilasa (HDC), enzima que cataliza la conversión de L-histidina en histamina (HA), tiene un rol importante en el desarrollo de tumores. A su vez, en nuestro laboratorio demostramos que la HA induce la proliferación de células de Leydig tumorales (CLT) murinas, mientras que la inhibición de HDC disminuye su proliferación y capacidad esteroidogénica. Además, observamos elevada expresión de HDC en TCL pediátricos vs. controles de distintos estadios de madurez sexual; y se ha descrito que ratones knock out para HDC poseen una angiogénesis incompleta. Para evaluar el rol de HDC en la modulación de la angiogénesis se empleó la línea de CLT de rata R2C, principal modelo utilizado en estudios de Leydigoma. También se realizaron estudios en TCL pediátricos. Los medios condicionados por las CLT R2C estimularon la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (empleando HUVEC y analizando el grado de vascularización de membranas corioalantoideas de codorniz, respectivamente). El efecto *in vitro* se revirtió al tratar previamente las CLT R2C con  $\alpha$ -metil-DL-histidinadihidrocloruro, inhibidor específico de HDC. A su vez, tanto la HA como los medios condicionados provenientes de TCL pediátricos, produjeron un aumento en la proliferación de las HUVEC. Nuestros resultados sugieren que las CLT producen HA y otros factores proangiogénicos, y que la inhibición selectiva de HDC atenúa la capacidad proangiogénica de las CLT. En base a estos resultados y evidencias previas del laboratorio, inhibidores específicos de HDC podrían ser utilizados como potencial terapia neoadyuvante en TCL.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carolina.mondillo@gmail.com (Carolina Mondillo)

## Histidine decarboxylase inhibitors attenuate the pro angiogenic activity of Leydig tumor cells: Potential neoadjuvant therapy for the treatment of Leydigomas?

### A B S T R A C T

**Keywords:**  
Histidine Decarboxylase  
Angiogenesis  
Leydigoma  
Pediatric tumor  
Histamine

Leydig Cell tumors (LCT) are a rare group of endocrine tumors in the testicular interstitium. Between 1 and 3% of testicular malignancies in adults and 4% in prepubertal children belong to LCT. An increasing incidence of this type of neoplasia has been reported recently all around the world. Particularly, a strong relationship between LCT and the use of anabolic steroids (which are commonly used nowadays) has been reported recently. In prepubertal boys, symptoms include feminization or virilization, depending on the major circulating steroid (estradiol or testosterone respectively). Adult patients show loss of libido, penile dysfunction, infertility and/or gynecomastia. Although the etiology still is unknown, several studies indicate that tumoral Leydig cells have an excessive production of insulin-like growth factor (IGF-1), as well as aromatase (CYP19) overexpression, which causes an enormous amount of estrogens (particularly estradiol, E2), and both factors play an important role in tumorigenesis. While usually benign, when LCT became malignant in adults they respond poorly to radio and chemotherapy. Likewise, it has been reported that both therapies increase the incidence of several tumors. All these data imply the need of new therapeutic targets to avoid the surgical dissection of the testes and the consequences of the hormonal therapies associated, which implicate not only the loss in reproductive function, but also psychological disorders. Several publications have reported that histidine decarboxylase (HDC), the only enzyme capable of catalyzing the conversion from L-histidine to histamine (HA) in mammals, has an important role in the development of several types of tumors, such as colorectal, breast and melanoma. At the same time, in our laboratory we have reported that HA induces cell proliferation of murine Leydig cells, and complementary, this cell proliferation decreases when inhibiting selectively HDC, as well as steroid synthesis (progesterone and E2). Also, we observed a higher expression of HDC in pediatric LCT (n = 3) than normal controls corresponding to different stages of sexual maturation (n = 9). It has been described that HDC knock out mice have an incomplete angiogenesis, and also that MA-10 Leydig cells HDC expression correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF). The aim of this study is to improve our knowledge about the role of HDC in LCT biology, particularly, the angiogenesis modulation. We used the R2C Leydig cell line, the most used model for in vitro studies of Leydigoma, because it overexpresses CYP19 and constitutively produces high levels of IGF-1 and E2, as well as human LCT. R2C and pediatric LCT angiogenic capability was evaluated in vitro by measuring proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). In addition, we verified R2C cells angiogenic capability in vivo, using quail embryo vasculature (chorioallantoic membrane assay). Both models have been validated for the study of angiogenesis. Conditioned medium obtained from R2C cell culture stimulated angiogenesis in vitro (p <0.001) as well as in vivo (p <0.001). The in vitro effect was reverted with a previous treatment on the R2C cell culture using  $\alpha$ -methyl-DL-histidine hydrochloride ( $\alpha$ -MHD, 10  $\mu$ M), a specific HDC activity inhibitor (p <0.001). Finally, human conditioned medium from pediatric LCT increased HUVEC proliferation (p <0.01). In the same way, the analyzed patients showed higher testosterone and estradiol levels than normal serum concentrations, which was in concordance to phenotypical features observed in presence of LCT. Our results indicate that tumoral Leydig cells (TLC) produce HA, as well as other angiogenic factors, and it could be stimulating the vascular endothelium. The selective inhibition of HDC attenuates the pro-angiogenic capability in TLC. Considering all these results and previous observations of our laboratory, specific inhibitors of HDC could be used, in the future, as a potential therapeutic target for the treatment of LCT.

## Introducción

Los tumores de células de Leydig (TCL) pertenecen a la categoría de tumores endócrinos del intersticio testicular. Si bien en el 90% de los casos resultan clínicamente benignos, un 10% de los casos reportados maligniza en adultos ocasionando tumores resistentes a la radio y a la quimioterapia, lo cual conlleva a que los pacientes posean una sobrevida de solamente dos años <sup>1-3</sup>. Además, se ha descrito que ambas terapias aumentan la incidencia de otros tumores a largo plazo <sup>4</sup>. Esto implica la necesidad de identificar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de los TCL, para así poder evitar la resección quirúrgica del testículo y las consecuentes terapias de reemplazo hormonal; lo cual podría llevar, no sólo a la pérdida de las funciones reproductivas del paciente <sup>5</sup>, sino también a trastornos psicológicos asociados <sup>6</sup>. A su vez,

se ha reportado que los TCL comprenden el 4% de los tumores testiculares en niños <sup>1,7</sup>, siendo de especial importancia en este grupo etario debido a la aparición de fenotipos como pubertad precoz o ginecomastia <sup>8,9</sup>, ambos producto de la alta concentración sérica de esteroides provenientes del tumor (testosterona o estradiol, E2, respectivamente). En los últimos años, la implementación de técnicas más precisas de diagnóstico ha permitido evidenciar que la incidencia de este tipo de tumor es superior al 4%, ascendiendo a un 15% <sup>10,11</sup>. 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, lo cual sugiere la necesidad de prestar mayor atención a este tipo de neoplasias. Lo mismo se observa a nivel mundial <sup>12,13</sup>. De forma complementaria, se ha descrito que los TCL no sólo se desarrollan en el testículo, sino también en cordón espermático, ovario y glándula adrenal <sup>14,15</sup>. Si bien

**Tabla 1 - Clasificación de testículos humanos en grupos etarios, según las características del parénquima testicular**

Grupo	Edad	Características
Neonatal	<1 mes	Células de Leydig (CL) fetales. Túbulos seminíferos inmaduros.
Infantil	1 a 7 meses	CL (activación postnatal). Túbulos seminíferos inmaduros.
Juvenil	1 a 12 años	Ausencia de CL. Túbulos seminíferos inmaduros.
Puberal	12 a 14 años	CL puberales. Túbulos seminíferos. Espermatoцитos meióticos.

**Tabla 2 - Información clínica de los pacientes analizados, según estadios del desarrollo descritos por Tanner<sup>67</sup>**

Paciente	EC (años)	VP	G	M	VT (cc)	T (ng/mL)	E2 (pg/mL)	LH (UI/L)	FSH (UI/L)
PP1	6,7	3	3	2	2	13,1	21	<0,1	1,4
PP2	3,8	3	3	1	5-6	1,46	<9	<0,1	0,42
PP3	9	3	3	1	1	0,6	<20	<0,1	1,4

EC: edad cronológica; VP: vello púbico; G: genitales; M: mamas; VT: volumen testicular. Referencias de valores séricos en niños sanos<sup>68</sup>. T (testosterona): 0,05-0,5 ng/mL; E2 (estradiol): 5-10 pg/mL; LH (hormona luteinizante): <0,9 UI/L; FSH (hormona foliculo estimulante): 0,2-3,8UI/L.

la etiología de los TCL es aún desconocida, su aparición se ha relacionado con la sobreexpresión de la enzima CYP19 aromatasas y por consiguiente altos niveles de E2, y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). Ambos factores estarían involucrados en un aumento de la proliferación celular<sup>3,16</sup>. Además, se ha reportado muy recientemente una relación causal entre estos tumores y el uso de anabólicos esteroides<sup>17</sup>.

La histidina decarboxilasa (HDC) es la única enzima presente en mamíferos capaz de catalizar la conversión de L-Histidina a Histamina (HA)<sup>18</sup>. Se ha descrito que HDC está relacionada con la agresividad tumoral, sobre la base de que está sobreexpresada en diversos tipos de tumores malignos, particularmente de mama<sup>19</sup>, colangiocarcinoma<sup>20</sup> colorrectal<sup>21,22</sup> y melanoma<sup>23</sup>. En nuestro laboratorio, hemos observado sobreexpresión de HDC<sup>24</sup> en TCL pediátricos pertenecientes a pacientes de todos los estadios del desarrollo testicular (ver tabla 1). Sumado a estas evidencias, se ha descrito que ratones knock out para el gen de HDC poseen una angiogénesis incompleta<sup>25</sup>. Además la línea de células de Leydig tumorales MA-10, que también sobreexpresa HDC, sintetiza y secreta el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)<sup>26</sup> y se ha reportado que la HA actúa de forma proangiogénica en córnea<sup>27-29</sup>.

Se sabe que el proceso de angiogénesis es uno de los pilares fundamentales para la progresión y malignización de una neoplasia, permitiendo la llegada de nutrientes a todo el volumen tumoral y siendo una vía de salida a la circulación<sup>30</sup>. Así, por lo expuesto, el objetivo del presente trabajo es profundizar nuestros estudios previos acerca del papel de HDC en la biología de los TCL, evaluando particularmente su rol sobre la modulación de la angiogénesis. Para ello, utilizamos el modelo de células de Leydig tumorales de rata R2C, ya validado para el estudio de Leydigomas debido a su gran similitud con el fenotipo de los TCL<sup>3,31</sup>. Además, realizamos por primera vez estudios de angiogénesis empleando medios condicionados obtenidos a partir del cultivo de células provenientes de 3 TCL pediátricos.

## Materiales, pacientes y métodos

### Reactivos generales

La [<sup>3</sup>H]-Timidina (20 Ci/mmol) se compró a New England Nuclear (North Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Los reactivos  $\alpha$ -metilhistamine dihidrocloruro ( $\alpha$ -MHD) y el dihidrocloruro de Histamina (HA) se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemical (Darmstadt, Alemania). El IGF-1 (Factor de crecimiento tipo insulina) fue gentilmente donado por la Dra. Roxana Schillaci (Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis, IBYME-CONICET). El estradiol (E2) fue gentilmente cedido por la Dra. Victoria Lux (Laboratorio de Neuroendocrinología, IBYME-CONICET). hVEGF (Factor de crecimiento de endotelio vascular humano) fue desarrollado por los Dres. Alberto Baldi y Adrián Góngora (Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IBYME-CONICET). Los reactivos para mantener en cultivo las líneas celulares se obtuvieron de Gibco-BRL (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), y las placas plásticas se compraron en Corning (Corning, Nueva York, Estados Unidos) y BD Falcon (San José, California, Estados Unidos). Los demás reactivos utilizados fueron del mejor grado disponible y comprados a los proveedores usuales.

### Material clínico

Se utilizaron muestras de TCL obtenidas a partir de biopsias de tres pacientes pediátricos (PP1, PP2, PP3), las tres 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).

### Cultivo de células de Leydig tumorales R2C y células HUVEC

La línea de células de Leydig tumorales de rata R2C fueron compradas a la ATCC (# 58649146), mientras que las células de endotelio venoso de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron gentilmente donadas por el Dr. Alberto Baldi (Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IBYME-CONICET, Buenos Aires, Argentina). Los experimentos con ambas líneas fueron realizados por triplicado, con al menos tres diferentes pasajes. Las células R2C se cultivaron 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 Estreptomina 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>. Las células HUVEC se mantuvieron en cultivo según el protocolo antes descrito<sup>32</sup>.

### Cultivo primario de células provenientes de tumor de células de Leydig

Una muestra de cada TCL (Paciente pediátrico: PP1, PP2 y PP3) fue disectada como se ha descrito previamente<sup>33,34</sup>. Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos en presencia de DMEM/Ham F12 suplementado con vitamina C (5 mg/mL), vitamina E (0,2  $\mu$ g/mL) y suero fetal bovino al 10% durante 48 h. A continuación, las células fueron lavadas e incubadas durante 6 días en DMEM/F12 libre de suero, renovándolo cada 48 horas. El medio condicionado (MC) por estas células fue coleccionado y reservado para el tratamiento de las HUVEC a -20°C (fig. 1).

### Ensayo de proliferación en células HUVEC

Los MC de las R2C para el tratamiento de las HUVEC se



**Figura 1 - Esquema de obtención de los medios condicionados por las células de Leydig R2C o por los cultivos primarios de los TCL pediátricos. Luego de 48 h de incubación se recuperaron los medios y con ellos se trataron las células HUVEC en presencia de  $^3\text{H}$ -Timidina para evaluar proliferación celular.**

obtuvieron de la siguiente manera: se sembraron R2C en placas de 6 pocillos el día 0 a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo, en un volumen total de 3 mL de medio completo. Se mantuvieron en atmósfera húmeda conteniendo 5% de  $\text{CO}_2$ . El día 3, las células se lavaron dos veces con 1 mL de medio libre de suero. Se realizaron incubaciones en un volumen final de 0,8 mL por pocillo a  $37^\circ\text{C}$  con medio Ham's/F12 completo, solo o suplementado con  $\alpha$ -MHD  $10 \mu\text{M}$ , IGF-1  $100 \text{ ng/mL}$ , E2  $10 \mu\text{M}$  e Histamina (HA)  $10 \mu\text{M}$ . A las 48 h, los medios fueron colectados y preservados a  $-20^\circ\text{C}$  para el posterior tratamiento de las HUVEC junto con los medios provenientes de los cultivos primarios de los TCL. El efecto de esos medios sobre la proliferación de las HUVEC fue evaluado como se ha descrito previamente <sup>32</sup>.

#### Ensayo de angiogénesis en membrana corioalantoidea de embrión de codorniz (Ensayo CAM)

Los experimentos se llevaron a cabo en embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) crecidos en placa de 6 pocillos según lo descrito <sup>35</sup>. Discos de 5 mm de diámetro de papel de filtro embebidos en los tratamientos fueron dispuestos sobre la membrana corioalantoidea de los embriones el día 7, a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h. Cada experimento de diez embriones por grupo experimental se repitió dos veces. Finalmente se fijaron, procesaron y analizaron las membranas, contabilizando el número de bifurcaciones en los vasos por unidad de área, según lo descrito <sup>36</sup>.

#### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía. Seguidos del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Para comprar la media de dos grupos se utilizó el test T de Student. En todos los casos un valor  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## Resultados

#### Efecto de medios condicionados por tumores pediátricos de células de Leydig sobre la proliferación del endotelio vascular in vitro

En primer lugar, se estudió la presencia de factores angiogénicos en MC por células provenientes de TLC pediátricos (PP1, PP2 y PP3), evaluando la capacidad de dichos MC de inducir la proliferación de células HUVEC en cultivo. Como se indica en la tabla 3, los MC estimularon la proliferación de las HUVEC de forma significativa (PP1 y PP2:  $p < 0,05$ , PP3:  $p < 0,001$ ).

#### Efecto de medios condicionados por células de Leydig R2C sobre la proliferación del endotelio vascular in vitro e in vivo

Tal como se esperaba en función de lo observado para los MC por TCL pediátricos, los MC provenientes de las células de Leydig de rata R2C estimularon la formación de nueva vasculatura in vitro (fig. 2) en membranas corioalantoideas de embriones de codorniz, y aumentaron la proliferación de las células HUVEC in vitro (fig. 3,  $p < 0,001$ ).

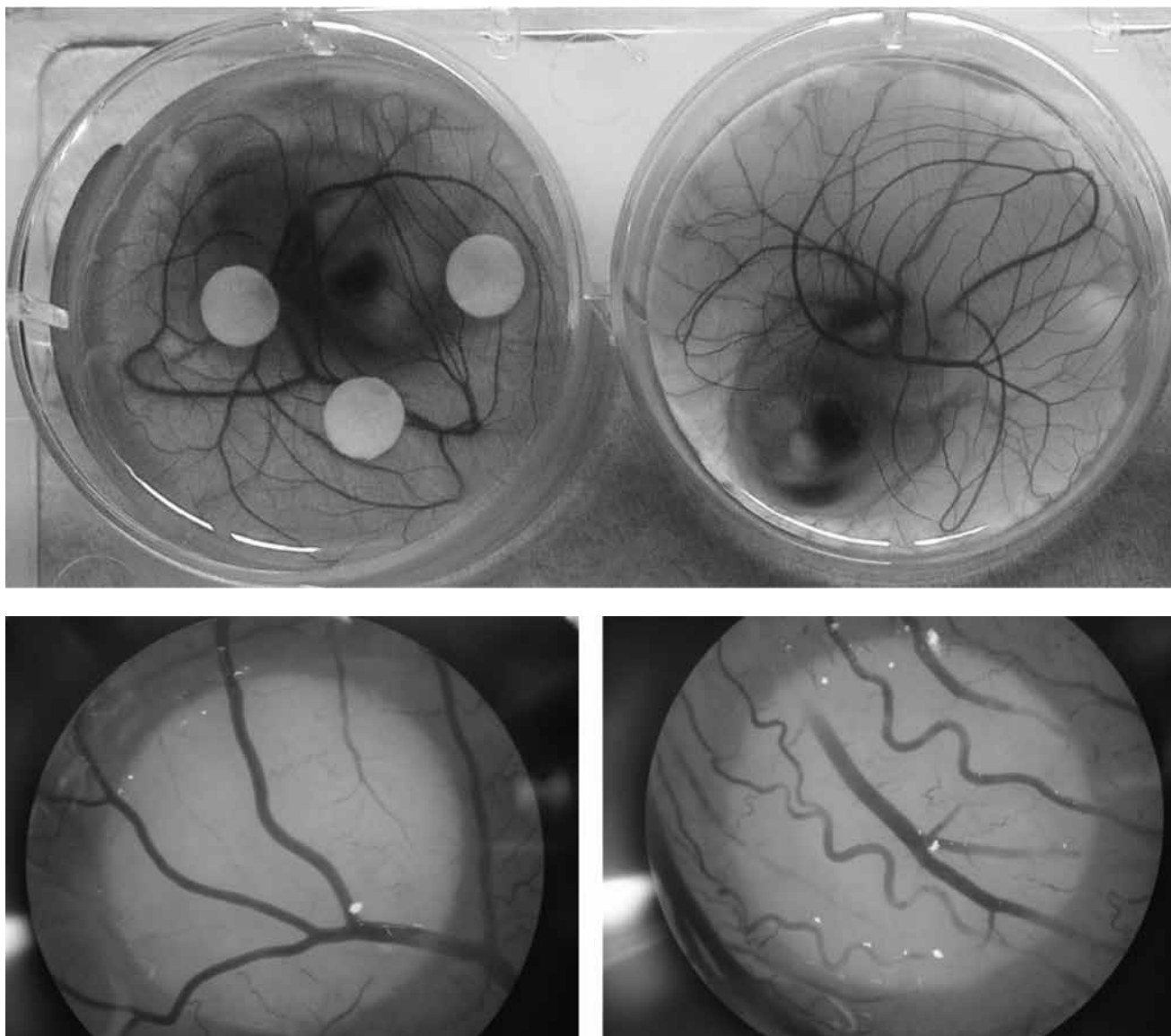
#### Identificación de los factores angiogénicos sintetizados y secretados por las células de Leydig tumorales

Para caracterizar el/los factor/es angiogénicos sintetizados por los TCL, se realizaron tratamientos directos sobre las HUVEC con factores conocidos por estar involucrados en la progresión de TCL: E2 ( $10 \mu\text{M}$ ), IGF-1 ( $100 \text{ ng/mL}$ ) e HA ( $10 \mu\text{M}$ ). De estos últimos, el único factor que indujo un aumento significativo de la proliferación del endotelio vascular fue la HA ( $p < 0,001$ ). Más aún, pretratando las células R2C con  $\alpha$ -MHD  $10 \mu\text{M}$ , inhibidor de la actividad de la enzima HDC, se observó que los sobrenadantes recuperados no eran capaces de estimular la proliferación de las HUVEC de forma significativa (tabla 3).

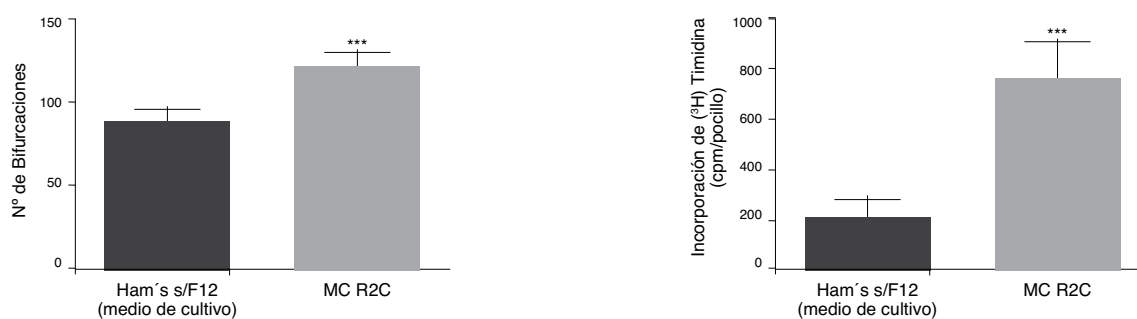
**Tabla 3 - Regulación de la proliferación en células HUVEC**

Tratamiento	Diferencias respecto al control	Valor p
Control (Ham's/F12)	NC	NC
Ham's/F12 + hVEGF	***	<0,001
MC R2C	***	<0,001
MC R2C + $\alpha$ -MHD	*	<0,05
$\alpha$ -MHD	-	>0,05
E2	-	>0,05
IGF-1	-	>0,05
HA	***	<0,001
PP1	*	<0,05
PP2	*	<0,05
PP3	***	<0,001

Se utilizó hVEGF  $1 \text{ ng/mL}$  como control positivo. MC (medio condicionado) de R2C, y MC de R2C pretratadas con  $\alpha$ -MHD  $10 \mu\text{M}$ ; E2  $10 \mu\text{M}$ , IGF-1  $100 \text{ ng/mL}$ , HA  $10 \mu\text{M}$ , y medios condicionados de los tumores pediátricos PP1, PP2 y PP3. NC: no corresponde.



**Figura 2 -** Arriba. Figura representativa de dos embriones de codorniz dispuestos en una placa de 6 pocillos para la incubación con los tratamientos mencionados. Abajo. Imagen representativa de un disco con pocos vasos, perteneciente al medio control sin factores angiogénicos (izquierda) y al medio condicionado por las células de Leydig tumorales R2C (derecha).



**Figura 3 -** Angiogénesis *in vivo* (izquierda) e *in vitro* (derecha) con medio condicionado proveniente de las células de Leydig R2C. \*\*\*,  $p < 0,001$ .

## Discusión

Si bien los TCL son mayormente benignos, cuando malignizan resultan mortales, permitiendo una supervivencia de solamente dos años a causa de la resistencia a terapias convencionales<sup>1,3</sup>. Por otro lado, las terapias actuales para los TCL benignos pueden tener consecuencias a nivel físico y/o psicológico, potencialmente irreversibles<sup>37-39</sup>. En conjunto, esto último expone la necesidad de encontrar terapias alternativas, eficaces al controlar el desarrollo de estas neoplasias pero con mínimos efectos colaterales para el paciente. Debido a que inhibir el proceso de angiogénesis es una estrategia muy utilizada para el tratamiento de tumores malignos y otros desórdenes<sup>40</sup>, el presente trabajo se centró en el estudio de la angiogénesis en los TCL.

En primer término, demostramos que las células de Leydig tumorales provenientes de pacientes pediátricos con TCL son capaces de sintetizar y secretar factores proangiogénicos para regular la generación de nueva vasculatura, con base en que las HUVEC sólo proliferan en presencia de factores proangiogénicos<sup>41</sup>. Esto se condice con lo descrito por Samson y colaboradores, quienes demostraron que las células de Leydig son capaces de secretar factores proangiogénicos tanto en situaciones normales como patológicas, desde estadios fetales hasta adultos<sup>42</sup>. Si bien en tejidos normales la síntesis de factores proangiogénicos debe ser estimulada por hCG<sup>43</sup>, este tipo de tumores lo hace de forma espontánea. En otros tumores testiculares, como aquellos que se originan en la línea germinal, la regulación de la angiogénesis no se limita a la secreción exclusiva desde las células tumorales, sino que existe una contribución por parte de otros tipos celulares asociados al tumor<sup>44</sup>. Debido a ello, a futuro nos abocaremos a dilucidar si el microambiente de TCL posee otros elementos que regulen la angiogénesis, además de los evidenciados en este trabajo por parte de las células de Leydig.

Las células de Leydig tumorales R2C, originalmente obtenidas a partir de un TCL de rata, sintetizan esteroides en forma constitutiva y presentan el mismo fenotipo que la mayoría de los TCL humanos. Es por ello que constituyen un modelo validado para el estudio de Leydigomas<sup>3,31</sup>. El hecho de que los MC por las R2C sean capaces de estimular la angiogénesis *in vitro*, evidenciado en este trabajo, revela un nuevo punto en común entre el comportamiento de las R2C y el fenotipo de los TCL pediátricos. Es razonable entonces inferir que lo observado en membranas corioalantoideas de codorniz con los MC provenientes de las R2C esté de algún modo reproduciendo el comportamiento de los TLC pediátricos *in vivo*.

Se sabe que la HA está íntimamente involucrada en la regulación de la angiogénesis<sup>27-29</sup>, ya sea asociada a la transglutaminasa 2 -enzima capaz de unir histamina a residuos de ácido glutámico (histaminilar) del fibrinógeno durante el proceso de neoangiogénesis y reparación de tejidos<sup>45</sup>; o a través de sus 4 subtipos de receptores (HRH1-HRH4)<sup>46</sup>, o bien debido a su interacción directa con el ADN<sup>47</sup>. Sumado a ello, se ha descrito que la regulación de la concentración de HA local modula la producción de factores proangiogénicos, al menos en colangiocarcinoma<sup>48</sup>. Así, teniendo en cuenta estas evidencias y resultados previos de nuestro laboratorio que indicaban que la HA regula la proliferación de células de Leydig tumorales de ratón MA-10<sup>49</sup>, en este trabajo se planteó estudiar la posible participación directa de la HA en el efecto proangiogénico de las células de Leydig tumorales R2C. Efectivamente, inhibiendo la síntesis de HA en dichas células, demostramos el rol fundamental de la amina en la inducción

de angiogénesis. Sin embargo, sin duda no es la única molécula involucrada, y además se ha reportado que podría ejercer su función mediante la regulación de la expresión de VEGF<sup>50</sup> a través del subtipo de receptor HRH2, modulando la síntesis de AMPc y la vía de transducción de señales mediada por PKA<sup>51</sup>. Además, diversos autores han clasificado a la HA como agente proangiogénico<sup>52-54</sup>. De forma complementaria, se ha descrito que tejidos endócrinos (tal como es el caso de las células de Leydig del intersticio testicular), sintetizan y secretan un factor de crecimiento de endotelio vascular tejido específico, EG-VEGF, que estaría involucrado en el desarrollo de los TCL<sup>40,42,55</sup>.

En las células R2C, se ha reportado que el IGF-1 y el E2 cumplen un rol fundamental regulando su proliferación<sup>3,31</sup>. Lo mismo se observó en tumores de células de Leydig<sup>16,56-59</sup>. En este trabajo, descartamos que los factores E2 e IGF-1 intervengan en la regulación de la angiogénesis en forma directa, al menos en los tiempos ensayados. En contraposición con nuestros resultados, otros autores han descrito que el E2 regula positivamente la proliferación de las HUVEC, pero el efecto recién se observa al cabo de tres días de tratamiento<sup>60,61</sup>. A su vez, se ha descrito que el IGF-1 es capaz de revertir el arresto celular en las HUVEC<sup>62</sup> y que, a mayores concentraciones que las utilizadas en este trabajo, es capaz de aumentar su proliferación<sup>63</sup>.

Cabe agregar que las prostaglandinas, también sintetizadas por las R2C, podrían estar involucradas en el proceso de angiogénesis, con base en que se ha reportado que la PGE2 (prostaglandina E2) aumenta la angiogénesis en la córnea de conejo y en membrana corioalantoidea de embriones de pollo de 8 días de gestación<sup>64</sup>; y esto se ha ratificado con experimentos en donde la inhibición de COX-2, responsable de la síntesis de PGE2, disminuye la angiogénesis<sup>65</sup>. Sería importante evaluar, a futuro, el efecto de PGE2 en la angiogénesis *in vitro* de TLC.

En trabajos previos, reportamos que la inhibición de HDC disminuye el crecimiento tumoral y la síntesis de esteroides<sup>24</sup> y aquí describimos que revierte la estimulación de la angiogénesis *in vitro*. A su vez, como se indicó previamente, HDC está sobreexpresada en diversos tipos de tumores, tanto benignos como malignos<sup>19-23</sup>, y cumple un rol fundamental durante su desarrollo. Por todo esto, proponemos a la inhibición selectiva de HDC – impidiendo así la síntesis de HA – como estrategia terapéutica para retrasar y/o detener el crecimiento de TCL, ya sea con inhibidores solos o en combinación con bloqueantes de la síntesis de EG-VEGF<sup>66</sup>.

## Financiamiento del trabajo y agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT, PICT 2012 N° 2776 y PICT 2015 N° 2650) y la Fundación Alberto Roemmers, otorgados a CM; y subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 392) y la Universidad de Buenos Aires (UBA, UBACYT 2013-20020120100205), otorgados a OPP. Se agradece especialmente a la Fundación Williams y a la Fundación René Barón por su invaluable aporte a este trabajo.

## Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés, tanto financiero como personal, que haya influenciado el contenido de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Basciani S, Brama M, Mariani S, Luca G De, Arizzi M, Vesci L, Pisano C, Dolci S, Spera G, Gnassi L. Imatinib Mesylate Inhibits Leydig Cell Tumor Growth : Evidence for In vitro and In vivo Activity. *Cancer Res.* 2005; 65:1897–1904.
2. 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.
3. 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.
4. Travis LB, Fossa SD, Schonfeld SJ, McMaster ML, Lynch CF, Storm H, Hall P, Holowaty E, Andersen A, Pukkala E, Andersson M, Kaijser M, Gospodarowicz M, Joensuu T, Cohen RJ, Boice JD, Dores GM, Gilbert ES. Second cancers among 40 576 testicular cancer patients: Focus on long-term survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:1354–1365.
5. 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; 32(1):34–37.
6. 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.
7. 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; 67:8368–8377.
8. Kim I, Young RH, Scully RE. Leydig cell tumors of the testis. A clinico-pathological analysis of 40 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 1985; 9:177–192.
9. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ, Minegishi T, Cutler GB. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 1993; 365:652–654.
10. Leonhartsberger N, Ramoner R, Aigner F, Stoehr B, Pichler R, Zangerl F, Fritzer A, Steiner H. Increased incidence of Leydig cell tumours of the testis in the era of improved imaging techniques. *BJU Int.* 2011; 108:1603–1607.
11. Maizlin ZV, Belenky A, Kunichezkay M, Sandbank J, Strauss S. Leydig cell tumors of the testis: gray scale and color Doppler sonographic appearance. *J Ultrasound Med.* 2004; 23:959–964.
12. Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnion F, Lobaccaro JMA, Volle DH. Epigenetic: A molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2012; 3:1–12.
13. Gheorghisan-Galateanu AA. Leydig cell tumors of the testis: a case report. *BMC Res. Notes* 2014; 7:656.
14. Lanzafame S, Leonardi R, Torrisi A. Extratesticular Leydig cell tumor of the spermatic cord. *J Urol.* 2004; 171:1238–1239.
15. Pollock WJ, McConnell CF, Hilton C, Lavine RL. Virilizing Leydig cell adenoma of adrenal gland. *Am J Surg Pathol.* 1986; 10:816–822.
16. Chimento A, Sirianni R, Zolea F, Luca ADE, Pezzi V, De Luca A, Lanzino M, Catalano S, Andò S, Pezzi V. Nandrolone and Stanozolol Induce Leydig Cell Tumor Proliferation Through an Estrogen-Dependent Mechanism Involving IGF-I System. *J Cell Physiol.* 2011; 227:2079–2088.
17. Belli S, Guidi A, Simoni M, Carani C, Granata AR. Leydig cell tumor in an anabolic steroid abuser. *J Endocrinol Invest.* 2013; 36:913.
18. Medina MÁ, Quesada AR, Núñez De Castro I, Sánchez-Jiménez F. Histamine, polyamines, and cancer. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57:1341–1344.
19. Tanaka S, Sakaguchi M, Yoneyama H, Usami Y, Harusawa S. Histamine H3 receptor antagonist OUP-186 attenuates the proliferation of cultured human breast cancer cell lines. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2016; 480(3):479–485.
20. Francis H, DeMorrow S, Venter J, Onori P, White M, Gaudio E, Francis T, Greene JF, Tran S, Meininger CJ, Alpini G. Inhibition of histidine decarboxylase ablates the autocrine tumorigenic effects of histamine in human cholangiocarcinoma. *Gut* 2012; 61:753–764.
21. 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; 23:357–360.
22. Suonio E, Tuomisto L, Kangas L. Toremifene combined with cytostatics: Effects on growth and histamine concentration of human mammary cancer in mouse subrenal capsule assay (SRCA). *Agents Actions* 1993; 38:C178–C181.
23. Massari NA, Nicoud MB, Sambuco L, Cricco GP, Lamas DJM, Ducloux MVH, Blanco H, Rivera ES, Medina VA. Histamine therapeutic efficacy in metastatic melanoma: Role of histamine H4 receptor agonists and opportunity for combination with radiation. *Oncotarget* 2017; 8:26471–26491.
24. Abiuso AMB, Besio Moreno M, Belgorosky A, Rivarola M, Pignataro O, Berensztein E, Mondillo C. Histidine Decarboxylase as a novel therapeutic target for the treatment of Leydig cell tumors in prepubertal boys. *Endocr. Soc. 98th Annu. Meet. Expo Boston, MA, 2016.*
25. Ohtsu H, Watanabe T. New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305:443–447.
26. Schwarzenbach H, Chakrabarti G, Paust HJ, Mukhopadhyay AK. Gonadotropin-Mediated Regulation of the Murine VEGF Expression in MA-10 Leydig Cells. *J Androl.* 2004; 25:128–139.
27. Zauberman H, Michaelson IC, Bergmann F, Maurice DM. Stimulation of neovascularization of the cornea by biogenic amines. *Exp Eye Res.* 1969; 8:77–83.
28. Simpson JG, Fraser RA. Role of mast cells in experimental tumour angiogenesis. *En: Development of the Vascular System.* Nugent J, O'Connor M. The Pitman Press. Londres, Inglaterra, pag. 120–131, 1983.
29. Sörbo J, Jakobsson A, Norrby K. Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine1 and histamine2. *Int J Exp Pathol.* 1994; 75:43–50.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144:646–674.
31. 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.
32. Haro Durand LA, Góngora A, Porto López JM, Boccaccini AR, Zago MP, Baldi A, Gorustovich A. In vitro endothelial cell response to ionic dissolution products from boron-doped bioactive glass in the SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O system. *J Mater Chem B* 2014; 2:7620–7630.
33. Berensztein E, Saraco N, Belgorosky A, Rivarola MA. Secretion of inhibin B by human prepubertal testicular cells in culture. *Eur J Endocrinol.* 2000; 142:481–5.
34. Cowan G, Childs AJ, Anderson RA, Saunders PTK. Establishment of long-term monolayer cultures of somatic cells from human fetal testes and expansion of peritubular myoid cells in the presence of androgen. *Reproduction* 2010; 139:749–57.
35. Parsons-Wingter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, Clark JI, Sage EHH. A Novel Assay of Angiogenesis in the Quail Chorioallantoic Membrane: Stimulation by bFGF and Inhibition by Angiostatin According to Fractal Dimension and Grid Intersection. *Microvasc Res.* 1998; 55:201–214.
36. Haro Durand LA, Vargas GE, Romero NM, Vera-Mesones R,

- Porto-López JM, Boccaccini AR, Zago MP, Baldi A, Gorustovich A. Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass. *J Mater Chem. B* 2015; 3:1142–1148.
37. Howard R, Gilbert E, Lynch CF, Hall P, Storm H, Holowaty E, Pukkala E, Langmark F, Kaijser M, Andersson M, Joensuu H, Fossa SD, Allan JM, Travis LB. Risk of Leukemia Among Survivors of Testicular Cancer: A Population-based Study of 42,722 Patients. *Ann. Epidemiol.* 2008; 18:416–421.
38. Sprauten M, Darrah TH, Peterson DR, Campbell ME, Hannigan RE, Cvancarova M, Beard C, Haugnes HS, Fosså SD, Oldenburg J, Travis LB. Impact of long-term serum platinum concentrations on neuro- and ototoxicity in Cisplatin-treated survivors of testicular cancer. *J Clin Oncol.* 2012; 30:300–7.
39. Fossa SD, Gilbert E, Dores GM, Chen J, McGlynn KA, Schonfeld S, Storm H, Hall P, Holowaty E, Andersen A, Joensuu H, Andersson M, Kaijser M, Gospodarowicz M, Cohen R, Pukkala E, Travis LB. Noncancer Causes of Death in Survivors of Testicular Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2007; 99:533–544.
40. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438:967–974.
41. 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.
42. Samson M, Peale FV, 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.
43. Collin O, Bergh A, Leydig cells secrete factors which increase vascular permeability and endothelial cell proliferation. *Int J Androl.* 1996; 19:221–228.
44. Díez-Torre A, Silván U, Díaz-Núñez M, Arechaga J. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. *Cancer Biol Ther.* 2010; 10:529–536.
45. Lai TS, Greenberg CS. Histamine Regulates Binding of Cross-Linked Fibrinogen to Endothelium: Role of Histaminylation in Vascular Biology. *Blood* 2012; 120:3304.
46. Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2009; 147:S127–S135.
47. Scolnik PA, Viroso J, Haselkorn R. The wild-type gene for glutamine synthetase restores ammonia control of nitrogen fixation to Gln- (glnA) mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol.* 1983; 155:180–5.
48. 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; 69:3517–3517.
49. Abiuso AMB, Berensztein E, Pagotto RM, Pereyra EN, Medina V, Lamas DJM, Moreno MB, Pignataro OP, Mondillo C. H4 histamine receptors inhibit steroidogenesis and proliferation in Leydig cells. *J Endocrinol.* 2014; 223:241–253.
50. Lu Q, Wang C, Pan R, Gao X, Wei Z, Xia Y, Dai Y. Histamine synergistically promotes bFGF-induced angiogenesis by enhancing VEGF production via H1 receptor. *J Cell Biochem.* 2013; 114:1009–1019.
51. Ghosh AK. Regulation by prostaglandin E2 and histamine of angiogenesis in inflammatory granulation tissue. *Yakugaku Zasshi* 2003; 123:295–303.
52. Norrby K. Evidence of a dual role of endogenous histamine in angiogenesis. *Int J Exp Path* 1995; 76:87–92.
53. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim. Biophys. Acta - Mol Basis Dis.* 2012; 1822:2–8.
54. 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; 121:2154–2164.
55. 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; 2017:1–13.
56. Bercovici JP, Nahoul K, Tater D, Charles JF, Scholler R. Hormonal profile of Leydig cell tumors with gynecomastia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 59:625–630.
57. Valensi P, Coussieu C, Pauwels A, Attali JR, Kemeny JL, Amouroux J, Sebaoun J. Feminizing Leydig cell tumor: endocrine and incubation studies. *J Endocrinol Invest.* 1987; 10:187–193.
58. Marni C, Selvaggio G, Cerini C, Bulfamante G, Madia C, Ricciettoni G, Zuccotti GV. Atypical Leydig Cell Tumor in Children: Report of 2 Cases. *Pediatrics* 2016; 138:e20160151.
59. Peters MAJ, Mol JA, Van Wolferen ME, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Teerds KJ, van Sluijs FJ. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1:1–8.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Franklin SL, Ferry RJ, Cohen P. Rapid insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-3 on endothelial cell survival. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:900–907.
64. Form DM, Auerbach R. PGE2 and angiogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1983; 172:214–218.
65. 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; 18:1–8.
66. Feflea S, Cimpean AM, Ceausu RA, Gaje P, Raica M. Effects of antibodies to EG-VEGF on angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *In Vivo* 2012; 26:793–797.
67. Roberts C. Tanner's Puberty Scale: Exploring the historical entanglements of children, scientific photography and sex. *Sexualities* 2016; 19:328–346.
68. Belgorosky A, Chahin S, Chaler E, Maceiras M, Rivarola MA. Serum concentrations of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in normal girls and boys during prepuberty and at early puberty. *J Endocrinol Invest.* 1996; 19:88–91.