

Tesis de Posgrado

Desarrollo y control de un tumor experimental de ovario

Chamson, Astrid de Reig

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Chamson, Astrid de Reig. (1999). Desarrollo y control de un tumor experimental de ovario. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3210_Chamson.pdf

Cita tipo Chicago:

Chamson, Astrid de Reig. "Desarrollo y control de un tumor experimental de ovario". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3210_Chamson.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DESARROLLO Y CONTROL
DE UN TUMOR EXPERIMENTAL
DE OVARIO

Autora: Lic. Astrid Chamson de Reig

Director: Dr. Carlos Libertun

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

R.

Laboratorio de Neuroendocrinología
Instituto de Biología y Medicina Experimental

1999

A Fernando
A Joaquín y Matías

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Libertun, por su gran calidez y comprensión, por haberme otorgado un lugar en el laboratorio, por el apoyo que siempre me brindó, permitiendo mi desarrollo intelectual, y por la paciencia que tuvo, esperando la versión final de esta tesis.

A la Dra. Victoria Lux de Lantos, Co-Directora de esta Tesis Doctoral, por su gran sensibilidad e interés en los demás, por su amistad, por las largas charlas compartidas. Porque fue mi guía desde que ingresé al laboratorio, por su dedicación a la ciencia, entusiasmo y sentido de responsabilidad. Por su apoyo permanente y su inmensa participación en todos mis trabajos. Porque sin su ayuda y supervisión esta tesis no sería lo mismo.

A Eleonora, Silvia, Pablo y Estela, por crear un ambiente donde da gusto trabajar, por la buena predisposición de todos y la colaboración en la realización de esta tesis, especialmente en el cuidado de Matías.

A la Becu-cueva: Dama, Gra, Bettina, Artu, Rita y Claudia, porque seguimos compartiendo muchas cosas.

Al IbyME, por brindarme un excelente lugar de trabajo y equipamiento de gran nivel. A todos sus integrantes, por el compañerismo que existe y por la ayuda que siempre me brindaron.

A Stella Campo, por las determinaciones de inhibinas.

A la Universidad de Buenos Aires, por la confianza que depositó en mí, otorgándome las becas de investigación desde mi condición de estudiante y por el apoyo económico brindado al laboratorio, que permitieron la realización de esta tesis de doctorado.

Al CONICET y ANPCyT, por el apoyo material otorgado al laboratorio donde desarrollé la tesis.

A mis padres, por la gran ayuda que me brindaron siempre en todos los aspectos de mi vida. A mis hermanos, y en especial a Abner que siempre resolvió todos mis inconvenientes informáticos. A mi Abuelo, por sus permanentes inquietudes científicas. A mis suegros, porque sé que puedo contar con ellos.

A Fernando, Joaquín y Matías, mis tres grandes amores, por el apoyo y la comprensión, por estar siempre a mi lado, les dedico esta tesis con todo mi corazón.

Resumen

El objetivo de esta tesis fue el estudio de un modelo animal de tumor ovárico con ciertas similitudes con patologías ováricas hormono-dependientes y endocrinamente funcionales. El luteoma se desarrolla al autoinjertar un ovario en el bazo de una rata hembra adulta bilateralmente ovariectomizada, por la hipergonadotrofinemia resultante. En estudios de un año de duración determinamos que son tumores benignos y no modifican el estado general del animal. La mayoría de los animales portadores de tumor cursan con gonadotrofinas elevadas por un período de tiempo prolongado. Los luteomas secretan inhibina determinando un patrón particular de secreción de FSH. *In vitro* estos tumores presentan la esteroidogénesis basal alterada.

La administración crónica de buserelina (análogo de GnRH) tuvo un claro efecto antitumoral: redujo la aparición de tumores e inhibió su crecimiento. A través de receptores específicos de afinidad similar al ovario control, la buserelina ejerce un efecto directo sobre las células de luteomas: inhibe la secreción de progesterona estimulada por LH. Las células tumorales son más sensibles a este efecto que las células lúteas control. Sin embargo, los receptores para GnRH en las células de los luteomas se encuentran desacoplados de su vía clásica de segundos mensajeros: fosfolipasa C.

En nuestros trabajos caracterizamos los luteomas en diversos aspectos que abarcan al animal entero hasta estudios subcelulares.

Palabras clave

Luteoma
Ovario
Tumores ováricos
GnRH
Segundos mensajeros
Hormonas esteroideas
Gonadotrofinas

Abstract

The aim of the present thesis was the study of an animal model of ovarian tumor. The interest of this tumor lies in its similarities with ovarian pathologies which are hormone-dependent and endocrinologically active. This luteoma develops when an ovary is grafted into the spleen of a bilaterally ovariectomized adult female rat, as a consequence of the resulting hypergonadotrophinemia. In a year-long study we determined that these tumors are benign and do not alter the general condition of the animals. The majority of the tumor-bearing animals display high gonadotrophin levels for long periods of time. Luteoma secrete inhibins, which determine the particular FSH secretion pattern. *In vitro* these tumors show basal steroidogenesis alterations.

Chronic buserelin (a GnRH analog) administration had a clear antitumoral effect: it inhibited initial tumor development and induced a reduction in tumor volume. Buserelin, acting on specific receptors with affinity similar to that in control ovaries, has a direct effect on luteoma cells: it inhibits LH-stimulated progesterone secretion. Tumoral cells are more sensitive to this effect than control luteal cells. However, GnRH receptors in luteoma cells are uncoupled from their classic second messenger generating system: phospholipase C.

In our work we have characterized these luteoma in a variety of aspects including the whole animal and subcellular studies.

Keywords

Luteoma
Ovary
Ovarian tumors ováricos
GnRH
Second messengers
Steroid hormones
Gonadotropins

Los resultados presentados en esta tesis de doctorado dieron origen a cuatro trabajos que fueron publicados en revistas internacionales con arbitraje.

"Alterations in intracellular messengers mobilized by gonadotropin-releasing hormone in an experimental ovarian tumor". Chamson-Reig, A; Pignataro, OP; Libertun, C & Lux-Lantos, VAR. **Endocrinology** **140**(8):3573-3580, 1999.

"Development of an experimental ovarian tumor over a year in the rat". Chamson-Reig, A; Bianchi, MS; Rey-Roldán, EB; Sorianello, EM; Libertun, C & Lux-Lantos, VAR. **Life Sciences** **65** (12):1275-1285, 1999.

"GnRH receptors and GnRH endocrine effects on luteoma cells". Chamson-Reig, A; Tesone, M; Lux-Lantos, VAR & Libertun, C. **Endocrine** **6** (2):165-171, 1997. Distinguido como Tapa del Número.

"Effect of a Gonadotrophin Releasing Hormone analog on an experimental ovarian tumor: direct and indirect actions". Lux-Lantos, VAR; Thyssen, SM; Chamson, A & Libertun, C. **Life Sciences** **57**:291-300, 1995.

Abreviaturas

³H, tritio
AMPC, adenosín monofosfato cíclico
ANOVA, análisis de la varianza
BSA, seroalbúmina bovina
Ca²⁺, calcio iónico
CL, cuerpo lúteo
cpm, cuentas por minuto
DAG, diacilglicerol
DNA, ácido desoxirribonucleico
E₂, estradiol
ELISA, enzimoimmunoanálisis
ES, error estándar
FSH, hormona foliculo estimulante
GnRH, hormona liberadora de gonadotrofinas
GnRH-a, análogo de GnRH
hCG, gonadotrofina coriónica humana
InsP, inositol mono fosfato
InsP₂, inositol bi fosfato
InsP₃, inositol tri fosfato
ip, intraperitoneal
Kd, constante de disociación
LH, hormona luteinizante
MCU, máxima capacidad de unión
min, minuto
mRNA, ácido ribonucleico mensajero
NEN, New England Nuclear
NIDDK, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
NIH, National Institutes of Health, Maryland, Estados Unidos
OVX, ovariectomía
P, progesterona
PA, ácido fosfatídico
PG, prostaglandina
PGE, prostaglandina E
PGF_{2α}, prostaglandina F_{2α}
PI, fosfatidil inositol
PKC, proteína quinasa C
PLA₂, fosfolipasa A₂
PLC, fosfolipasa C
PLD, fosfolipasa D
PMSG, gonadotrofinas de suero de yegua preñada
PRL, prolactina
RIA, radioinmunoanálisis
rpm, revoluciones por minuto
SNC, sistema nervioso central
SPO, ovarios de prepúberes superovuladas con PMSG y hCG
TLC, cromatografía en capa delgada
TSH, tirotrófina

Indice

Introducción general	1
1. Morfología y función del ovario	2
2. El Ciclo Estral	7
2.1. Definición	7
2.2. Patrones de secreción hormonal durante el ciclo estral	8
2.2.1. Hormonas ováricas	8
2.2.1.1. Hormonas esteroideas	9
2.2.1.2. Hormonas no esteroideas	12
2.2.2. Hormonas hipofisarias	14
2.2.2.1. Gonadotrofinas	14
2.2.2.2. Prolactina	15
3. Regulación del ciclo estral	16
3.1. Sistema Nervioso Central	17
3.2. Pars Distalis	20
3.3. Ovario	21
4. Desarrollo Folicular y Función Lútea	23
4.1. Folículos Primordiales y Primarios	23
4.2. Folículo Secundario	24
4.3. Folículo Terciario	26
4.4. Folículo Preovulatorio	28
4.5. Ovulación	29
4.6. Cuerpo Lúteo	30
4.6.1. Morfología del Cuerpo Lúteo	30
4.6.2. Funciones del Cuerpo Lúteo	31
4.6.3. Regulación del Cuerpo Lúteo	32
4.6.4. Luteólisis	34
5. Tumores ováricos	37
Objetivos generales	42
Modelo experimental: LUTEOMA	45
1. Descripción del modelo	46
2. Materiales y Métodos	48
2.1. Animales	48
2.2. Obtención de los tumores ováricos experimentales	48
3. Resultados	50
3.1. Descripción macroscópica del tumor	50
3.2. Descripción microscópica del tumor	51

Capítulo I.	Desarrollo del luteoma experimental durante un año	52
I.1.	Introducción y objetivos	53
I.2.	Materiales y Métodos	54
I.2.1.	Animales	54
I.2.2.	Volumen tumoral	54
I.2.3.	Estudios histológicos	54
I.2.4.	Obtención de las muestras sanguíneas	55
I.2.5.	Radioinmunoanálisis de hormonas esteroideas	55
I.2.5.1	Progesterona	55
I.2.5.2	Estradiol	56
I.2.6.	Radioinmunoanálisis de hormonas proteicas	57
I.2.6.1	Prolactina	58
I.2.6.2	Hormona Luteinizante	60
I.2.6.3	Hormona Foliculo Estimulante	60
I.2.7.	Medición de inhibinas diméricas por enzimo- inmunoanálisis	60
I.2.8.	Análisis Estadísticos	61
I.3.	Resultados	62
I.3.1.	Características generales	62
I.3.2.	Desarrollo tumoral	62
I.3.3.	Características histológicas	63
I.3.4.	Perfiles hormonales de los animales portadores de tumor y sham.	65
I.3.4.1	Gonadotrofinas	65
I.3.4.2	Prolactina	67
I.3.4.3	Hormonas esteroideas	67
I.3.4.4	Inhibinas	69
I.4.	Discusión	71
	Conclusiones	77
Capítulo II.	Control del crecimiento del luteoma. Efecto de la buserelina	78
II.1.	Introducción y objetivos	79
II.2.	Materiales y Métodos	81
II.2.1.	Animales	81
II.2.2.	Modelo 1: Tratamientos farmacológicos iniciados el día del injerto ovárico	81
II.2.3.	Modelo 2: Tratamientos farmacológicos iniciados al mes del injerto ovárico	81
II.2.4.	Análisis Estadísticos	82
II.3.	Resultados	83

II.3.1. Modelo 1: Crecimiento de los luteomas y variaciones de los niveles hormonales séricos en animales portadores de tumores con o sin tratamiento	83
II.3.2. Modelo 2: Crecimiento de los luteomas y variaciones de los niveles hormonales séricos en animales portadores de tumor con o sin tratamiento	86
II.4. Discusión	89
Conclusiones	92
Capítulo III. Efectos directos de la buserelina sobre los luteomas experimentales. Estudios <i>in vitro</i>	93
III.1. Introducción y objetivos	94
III.2. Materiales y Métodos	98
III.2.1. Animales	98
III.2.2. Estudio de receptores de GnRH	98
III.2.2.1 Preparación de Buserelina marcada con [¹²⁵ I]	98
III.2.2.2 Receptores de GnRH en hipófisis y ovarios	99
III.2.3. Incubaciones de órganos	100
III.2.4. Estudios histológicos	101
III.2.5. Cultivos celulares	101
III.2.6. Determinación de hormonas esteroideas	103
III.2.6.1 RIA de testosterona	103
III.2.7. Análisis Estadísticos	104
III.3. Resultados	105
III.3.1. Receptores de GnRH en tejidos ováricos e hipofisarios de ratas portadoras de luteomas con o sin tratamiento con buserelina y de ratas controles en estro	105
III.3.2. Efecto de la buserelina sobre la secreción de hormonas esteroideas de luteomas y ovarios en estro: incubaciones de órganos	106
Análisis histológico de los luteomas y de los ovarios controles de hembras superovuladas	107
III.3.4. Efecto de la buserelina sobre la secreción de hormonas esteroideas de luteomas y ovarios de hembras prepúberes superovuladas: cultivos de células	108
III.4. Discusión	113
Conclusiones	117
Capítulo IV. GnRH: receptores y segundos mensajeros en tumores experimentales de ovario	118
IV.1. Introducción y objetivos	119

IV.2. Materiales y Métodos	121
IV.2.1. Animales	121
IV.2.2. Estudio de receptores de GnRH	121
IV.2.3. Obtención de células lúteas	121
IV.2.4. Movilización de calcio intracelular	122
IV.2.5. Determinación de inositoles fosfato	124
IV.2.6. Medición de fosfatidil inositol de membrana	125
IV.2.7. Análisis Estadísticos	126
IV.2.8. Drogas	126
IV.3. Resultados	127
IV.3.1. Receptores de GnRH en tejidos ováricos de ratas portadoras de luteomas, ratas prepúberes y ratas prepúberes superovuladas	127
IV.3.2. Movilización del calcio intracelular en células de luteomas y de ovarios de hembras superovuladas	128
IV.3.3. Inositoles Fosfato en cultivos de células provenientes de luteomas o de ovarios de ratas prepúberes superovuladas	132
IV.4. Discusión	137
Conclusiones	145
Discusión General	146
Conclusiones Generales	150
Referencias	151



Introducción general

1. Morfología y función del ovario

En los mamíferos los ovarios son los órganos de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionaria/fetal o cercana al nacimiento, y también el principal asiento de las células secretoras de hormonas femeninas. Es el carácter primario de la fisiología de la reproducción: elabora la gameta femenina y secreta las hormonas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra.

En muchos representantes de éstos, el ovario quiescente es un ovoide pequeño y aplanado, de estructura compacta y con una superficie relativamente lisa (Driancourt y col. 1993). Cuando alcanza la edad reproductora, el órgano se presenta como uno de los más dinámicos y con múltiples cambios morfológicos continuos, con ciertas similitudes en las distintas especies, independientemente de tratarse de aquellas con *ovulación simple* o con *ovulación múltiple*, con reproducción estacional o no, con ovulación espontánea o refleja, y si la transformación postovulatoria del folículo en cuerpo lúteo es espontánea o inducida (Robinson y Goy 1986). El ovario comienza a aumentar de tamaño, debido al crecimiento de los folículos, y aparecen protrusiones sobre su superficie a medida que los folículos maduran. En animales de ovulación múltiple, como la rata, con varios folículos desarrollándose simultáneamente, la apariencia de la glándula es semejante a un racimo de uvas. En cambio, en otros animales con ovulación simple como los equinos, ovinos y primates, el contorno normal del ovario se halla sólo localmente alterado por la presencia de un folículo de *de Graaf* o de un gran cuerpo lúteo.

En la rata los ovarios están situados cerca de los riñones a lo largo del borde lateral del músculo psoas y se encuentran rodeados de grasa. Durante la adultez, la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una

capa monoestratificada de células cúbicas o poliédricas, llamada epitelio germinal (Maekawa 1990). Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente, llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos o criptas (Harrison y Matthews 1951). El parénquima del ovario se divide en una corteza externa y una médula interna. En la zona de la corteza se desarrollan los *foliculos* (Fig. 1), a partir de los *primordiales* que constituyen la reserva de foliculos en estado de reposo, convirtiéndose en *foliculos primarios* y *secundarios*, dando origen al *foliculo de de Graaf* (o *preovulatorio*). Se encuentran también los *cueros lúteos* (CL), originados por las células del foliculo luego de la ovulación, y los *cueros albicans*, que corresponden a tejido cicatrizal por degeneración de los CL. Los *foliculos atrésicos* son aquellos que iniciaron su desarrollo, y luego regresionan sin culminarlo. En el tejido intersticial, que separa los foliculos, cueros lúteos y cueros albicans, se encuentran también células secretoras.

La médula que ocupa cerca de un tercio del ovario entero, se compone de tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos y nervios.

Con respecto a los **cambios anatómicos** que sufre el ovario adulto, existen ciertas características generales para todos los mamíferos. Las gametas no son liberadas continuamente desde el ovario, sino en forma recurrente a intervalos de tiempo que son especie-específicos; por ejemplo, 4-5 días en la rata, 28 días en la mujer, etc. En el ovario adulto, los ovocitos se encuentran rodeados por una o varias capas de células de múltiples funciones, como protectoras y nutritivas, que crecen gradualmente en número y forman eventualmente un foliculo esférico lleno de líquido. Se observan tantos foliculos como ovocitos, pero se encuentran simultáneamente en un amplio rango de tamaños y estadios de desarrollo. Los mecanismos involucrados en el crecimiento de los foliculos actúan, en un mismo momento, sobre una pequeña proporción del

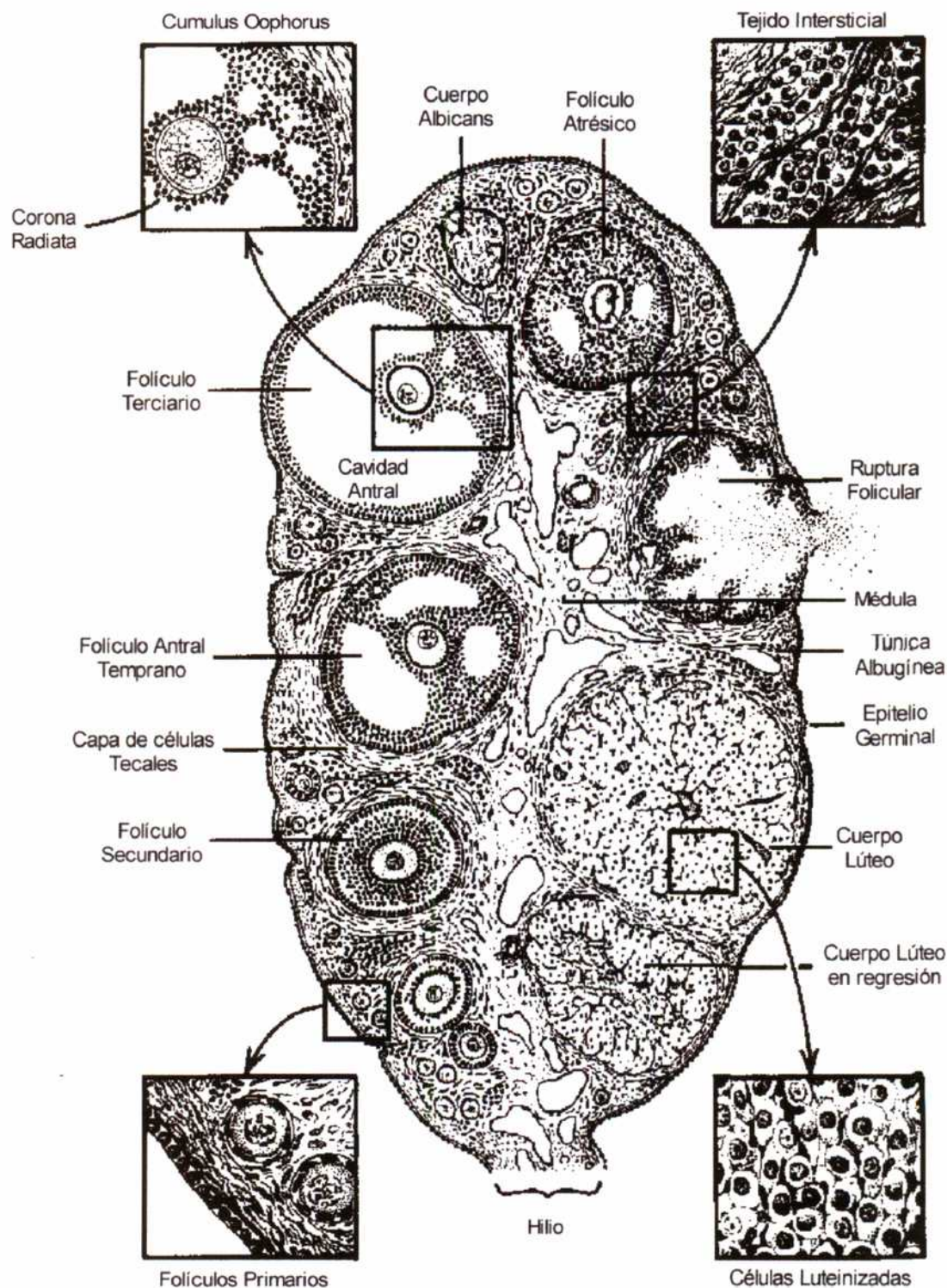


Figura 1. Corte de ovario de rata donde se observan los distintos estadios del desarrollo folicular, hasta la ovulación, formación del cuerpo lúteo y regresión. Modificado de: Freeman ME (1994).

número total de folículos. De esta pequeña población que comienza a crecer, sólo uno o unos pocos alcanzarán el tamaño especie-específico máximo que le

permita la ruptura y liberación de la gameta desde el ovario; el resto de los folículos que iniciaron el crecimiento se perderán por mecanismos que los conducen a la atresia. Una vez liberado el ovocito, las células que conformaban el folículo son transformadas, mostrando cambios anatómicos, y el fluido folicular es reemplazado por células, adquiriendo una estructura sólida conocida como cuerpo lúteo cuya duración depende de la especie (Robinson y Goy 1986).

En la **rata**, al **nacimiento**, el ovario contiene epitelio germinal y muchos folículos primordiales. Entre los 10 y 12 días de vida, tanto los folículos como el intersticio primario comienzan a incrementar su volumen. En el periodo prepuberal el ovario no se encuentra en un estado de reposo, ya que alrededor de los 18 días de edad, algunos folículos comienzan a desarrollarse llegando hasta estadios de folículos antrales antes de alcanzar la madurez sexual; y regresan. La primera ovulación ocurre en la pubertad, que para nuestra cepa de ratas es a los 40-42 días.

Durante la **adultez**, bajo la influencia de las hormonas gonadotróficas hipofisarias, se establece una maduración cíclica de los folículos ováricos. Luego de la ovulación, los capilares del estroma ovárico invaden las células de granulosa remanentes, las cuales se luteinizan formando el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo se mantiene en su máximo tamaño hasta el momento de la siguiente ovulación, luego degenera rápidamente y se transforma en un nódulo hialínico fibroso, llamado cuerpo albicans o blanco. En la rata preñada, el cuerpo lúteo crece y persiste hasta el parto (CL de la preñez). En caso de no ocurrir la fertilización, la regresión del cuerpo lúteo es seguida por el crecimiento de otros folículos, produciéndose una nueva ovulación. Los folículos menos maduros, que no ovulan, se hacen atrésicos.

En la **senectud**, los ovarios de las ratas mayores de 18 meses se hayan atrofiados, aunque la morfología y función del ovario envejecido varía en diferentes cepas. La atrofia de la corteza se caracteriza por la disminución del número de folículos y cuerpos lúteos. La médula de estos ovarios se compone de grupos de células intersticiales ubicados al azar y un número elevado de células fagocíticas, junto a un estroma fibroso y vascular.

2. El Ciclo Estral

2.1. Definición

El término “estro” fue empleado por primera vez por Heape (1900) para describir el “período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho, y es posible en la mayoría, aunque no en todos los mamíferos, un coito fecundante”. El período anterior al estro lo denominó proestro caracterizado como el “momento en que el animal entra en celo”. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el metaestro, también conocido como diestro 1. El período siguiente, diestro (o diestro 2), tiene una duración variable de acuerdo a las especies, y es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en estro. En la rata dura normalmente uno o dos días, determinando que el ciclo estral tenga una duración de 4 ó 5 días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia.

En el ovario evolucionan coordinadamente los folículos desde uno *primario* hasta uno de *de Graaf*, con la posterior formación del cuerpo lúteo, permitiendo la maduración del ovocito y su expulsión, y potencialmente, su fecundación. Si la fertilización del ovocito no se produce, todos los cambios morfológicos en tamaño, maduración y tipos celulares mencionados antes se repiten en el mismo orden y en todos los detalles, sobre otros folículos, generando la ciclicidad que se observa normalmente en las hembras.

A nivel vaginal, los distintos estadios del ciclo se pueden determinar por observación con microscopio a bajo aumento, según los tipos celulares presentes en el extendido: en el proestro hay predominancia de células epiteliales nucleadas, redondas, ocasionalmente algunas escamosas; el día del

estro, predominan las escamosas; durante los días de diestro 1 y 2 los leucocitos son mayoritarios. Pueden existir ciclos de 5 días en los cuales se observa un día extra de infiltración leucocitaria (diestro), o menos frecuentemente, de cornificación (estro).

En resumen, la rata de laboratorio es un mamífero no estacional, presentando un ciclo ovárico poliestral y que se continúa desde la pubertad hasta la senectud, con ovulación espontánea, normalmente cada 4-5 días con una breve fase lútea.

Estas características, además de su fácil reproducción y mantenimiento en bioterio, hacen de esta especie un excelente modelo para el estudio de la fisiología y patologías gonadales.

2.2. Patrones de secreción hormonal durante el ciclo estral

2.2.1. Hormonas ováricas

Estudios clásicos demostraron que los ovarios no sólo son la fuente de ovocitos, sino también de hormonas esteroideas, y que dichas funciones se encuentran controladas por hormonas hipofisarias. Estudios posteriores han revelado también, la existencia de sustancias ováricas no esteroideas que ejercen efectos biológicos dentro del ovario o sobre otros órganos, y permiten explicar mecanismos de regulación en la función gonadal. Es decir, a las hormonas recibidas a través de la circulación general, se suman moléculas producidas y activas en el propio ovario.

(Sharpe 1984), sugirió como criterio de hormonas intragonadales: a) que exista evidencia de producción gonadal de la hormona; b) que los receptores para dicha hormona estén presentes en la gónada; y, c) que se demuestren acciones biológicas de la hormona dentro de la gónada. Como hormonas intraováricas

se pueden mencionar sustancias muy variadas como esteroides, aminas, péptidos y eicosanoides.

2.2.1.1. *Hormonas esteroideas*

Son los productos de secreción más conocidos y mejor estudiados del ovario. Cumplen un gran número de funciones endocrinas relacionadas con la reproducción; actuando sobre tejidos y órganos del sistema reproductor, del sistema nervioso central, tejidos adiposo y cutáneo, sistemas cardiovascular e inmunológico, hígado, etc. Además tienen un papel paracrino y autocrino, puesto que funcionan como moduladores locales dentro de los folículos en los que son producidos, creando microambientes especiales en los mismos.

Se acepta que un buen índice del estadio de desarrollo ovárico es la determinación de la concentración de los distintos esteroides circulantes.

Estrógenos: Con sentido amplio, son aquellas moléculas que producen “estro”. Desde el punto de vista bioquímico, las hormonas naturales son esteroides C₁₈. Los estrógenos naturales son el 17β-estradiol, estrona y estriol, siendo el estradiol el más potente de los tres. La vía de la biosíntesis incluye su formación a partir de los andrógenos.

Son secretados principalmente por las células de granulosa del folículo ovárico, el cuerpo lúteo y la placenta. Ciertas células del estroma ovárico también pueden elaborar andrógenos y estrógenos.

En el hígado, los estrógenos son metabolizados e inactivados, siendo oxidados o conjugados a glucurónico y sulfato.

El período preovulatorio del ciclo estral se caracteriza por el crecimiento de folículos y el consecuente incremento en la secreción de estrógenos. La concentración promedio de estradiol en sangre periférica refleja el patrón hallado en sangre venosa ovárica (Smith y col. 1975; Brown-Grant y col. 1970; Nequin y col. 1979). En ratas con ciclos de 4 días, los niveles de estradiol

periféricos comienzan a aumentar significativamente en el diestro 1 tardío hasta la mañana del diestro 2. Este incremento persiste durante el diestro 2 y proestro temprano, alcanzando su máxima concentración en la mañana del

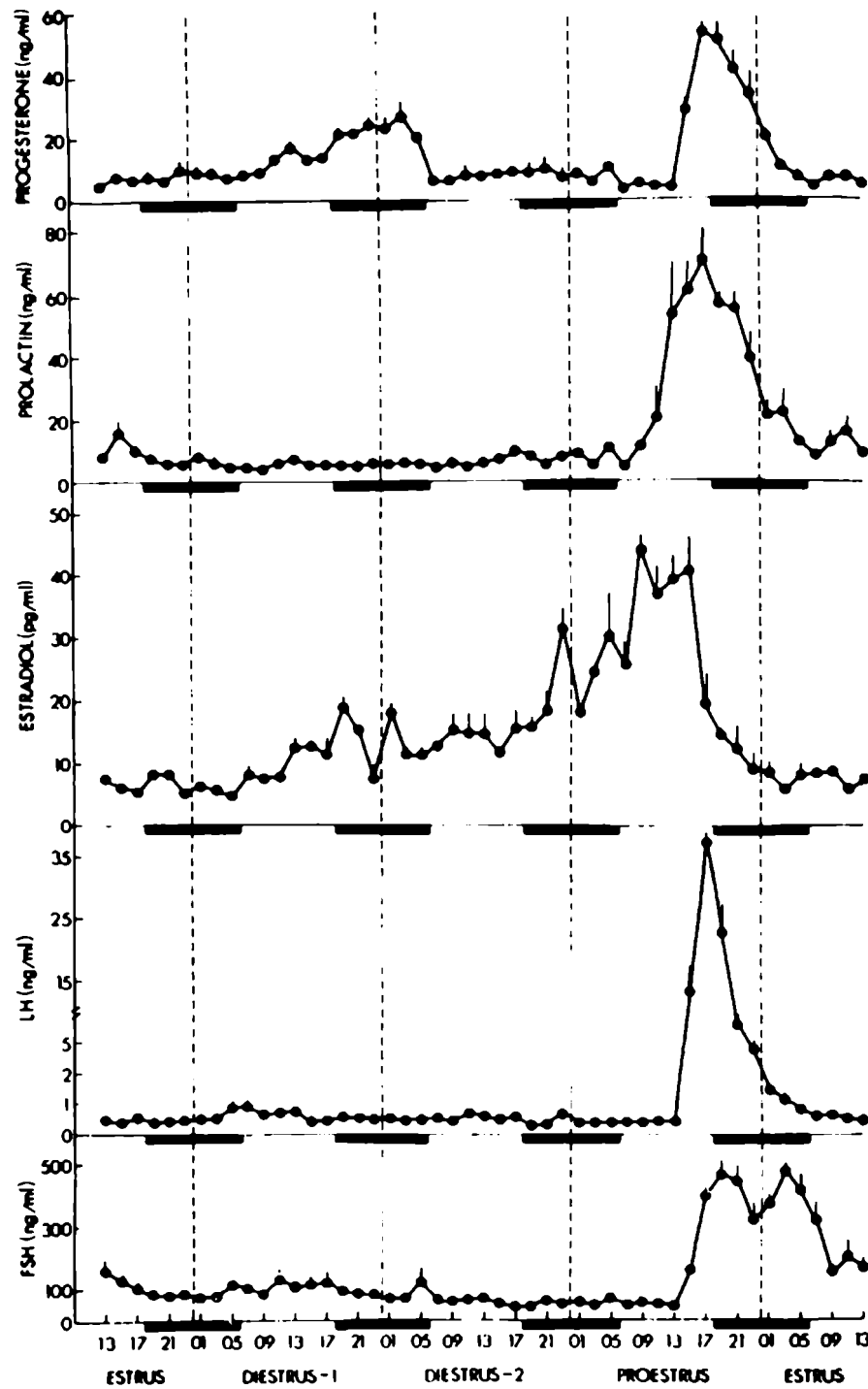


Figura 2. Niveles séricos de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH, a lo largo de los cuatro días del ciclo estral en la rata. Las barras negras representan el periodo de oscuridad (de 1800 a 0600), y los números en la abscisa indican la hora del día. De: Smith y col. (1975).

proestro. Temprano en la noche de proestro, los niveles disminuyen retornando a valores mínimos en la mañana del estro (Fig. 2).

Progestágenos: La progesterona es un esteroide C_{21} , secretado en la rata por células de la granulosa del folículo preovulatorio, el cuerpo lúteo y la placenta. También es un intermediario importante en la biosíntesis de los esteroides. Tiene una vida media corta y es convertida en hígado a pregnandiol, el cual es conjugado a ácido glucurónico y excretado en la orina.

En la rata adulta, el progestágeno mayoritario secretado en la vena ovárica durante el ciclo estral es la 20α -hidroxiprogesterona (20α -OH-P). Este progestágeno, metabolito de la progesterona y cuya síntesis se encuentra catalizada por la enzima 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, es considerablemente menos activo como progestágeno que su precursor (Wilcox y Wiest 1960). Durante el ciclo estral se observan dos picos de secreción de progesterona (Fig. 2). Un primer incremento de origen folicular (células de granulosa del folículo preovulatorio) tiene lugar durante la tarde y noche del proestro, recuperando valores basales en la mañana del estro. Este aumento ocurre prácticamente en forma simultánea con el pico de secreción de hormona luteinizante, inductor de la ovulación. Un segundo aumento, cuyo origen es luteal, comienza a mediodía del diestro 1 y se extiende hasta la mañana del diestro 2, cayendo luego, la concentración a valores basales. Esta caída en los niveles de progesterona refleja la corta vida del cuerpo lúteo recién formado.

En estos roedores los niveles de testosterona y androstenediona periféricos mantienen un patrón similar al del estradiol (Dupon y Kim 1973; Gay y Tomacari 1974). Esto sugiere que andrógenos y estrógenos provienen del mismo órgano, el ovario, y que su síntesis, secreción y control podrían estar relacionados.

2.2.1.2. Hormonas no esteroideas

La lista de factores reguladores de la función ovárica es muy extensa, mas aún hay muchas moléculas para las cuales todavía no se conoce la función precisa. Algunos de los factores se detallan en la Tabla 1 (Tsafriri y Adashi 1994).

Tabla 1. Factores Intraováricos

Ácido γ -aminobutírico (GABA)	Factores de crecimiento transformantes α y β (TGF- α , TGF- β)
Activina	Folistatina
Adenosina	Inhibidores de unión de FSH y LH (FSH-BI, LH-BI)
Catecolaminas	Inhibina
Eicosanoides	Interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-8, IL-2)
Endotelina	Oxitocina
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Péptido GnRH-simil
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Péptido intestinal vasoactivo (VIP)
Factor de crecimiento epitelial (EGF)	Prostaglandinas
Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	Proteínas ligadoras de IGF (IGF-BPs)
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	Sistema Renina/angiotensina
Factor de necrosis tumoral (TNF)	Sustancia inhibidora mülleriana (MIS)
Factores de crecimiento insulino-simil (IGF-I, IGF-II)	Sustancia P

Inhibina: Es una glicoproteína de la superfamilia del TGF- β . Presenta una estructura dimérica, compuesta por una subunidad α y una β , unidas por un puente disulfuro. Existen dos subunidades β distintas: β_A y β_B , dando origen a las inhibinas A ó B, respectivamente.

La inhibina ovárica está expresada principalmente en folículos, mientras que su presencia en cuerpo lúteo parece ser especie específica. En la rata, el mRNA de la subunidad α se encontró en todos los estadios del desarrollo folicular, mientras que el mRNA de las subunidades β se detectaron en

foliculos terciarios a lo largo del ciclo y en foliculos secundarios en estro (Vale y col. 1994). Se considera al folículo maduro, la principal fuente de inhibina durante la primer parte del ciclo, y durante la fase lútea la inhibina provendría del cuerpo lúteo. La secreción de inhibina estaría correlacionada con el patrón cíclico de desarrollo folicular durante el ciclo estral.

En la rata hembra adulta, se observaron patrones diferentes de inhibinas A y B circulantes durante el ciclo. Los niveles de inhibina A alcanzan un máximo en proestro y los niveles de inhibina B son altos en diestro 1 y 2 y proestro (Woodruff y col. 1996). Se ha demostrado que esta hormona está íntimamente involucrada en el control negativo de la secreción de FSH, mostrando una relación inversa entre los niveles de ambas hormonas. Existen también evidencias de una función paracrina/autocrina de la inhibina en el folículo ovárico.

Activina: Es una proteína que pertenece a la superfamilia del TGF- β . Presenta una estructura dimérica, compuesta por dos subunidades β , unidas por un puente disulfuro, generando activina A, B o AB, según el tipo de subunidad que la conforma. La activina promueve la secreción hipofisaria de FSH, en contraposición a la acción de inhibina. Además se ha demostrado que tiene acciones mitogénicas y a nivel reproductivo se vió que cumple funciones paracrinas/autocinas sobre las gonadas. La folistatina tiene la característica de ligar activina, neutralizando la actividad biológica de esta última.

Prostaglandinas: En particular la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) es producida en el cuerpo lúteo por células fibroblásticas. Tiene una acción inhibitoria sobre la producción de progesterona; estimula la secreción de estradiol; y es esencial durante la luteólisis (Wuttke y col. 1998).

Péptidos GnRH-símil: Son varios los efectos directos del GnRH y sus análogos en ovario. Se ha demostrado, mayormente en rata, que: a) el GnRH, como se

detallará más adelante, ejerce acciones inhibitorias y estimuladoras en el ovario; b) existen receptores para GnRH gonadales; y c) la presencia de un péptido GnRH-símil en el ovario. Podemos suponer que el GnRH podría tener un papel fisiológico, como modulador de la función ovárica *per se* (Birnbaumer y col. 1985).

2.2.2. Hormonas hipofisarias

2.2.2.1. Gonadotrofinas

Las células gonadotropas de la hipófisis anterior sintetizan dos hormonas glucoproteínicas de fundamental importancia para la reproducción: las hormonas luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH). La porción proteica de ambas hormonas está constituida por la asociación de dos subunidades, α y β . La subunidad α es común a tres hormonas hipofisarias: LH, FSH y hormona estimulante de tiroides (TSH), y es similar, también, en la gonadotrofina coriónica humana de origen placentario (hCG). Las subunidades β son diferentes, confiriéndoles especificidad hormonal.

En la rata, los niveles de LH se encuentran en su mínimo valor desde la mañana del estro, poco después de la ovulación y durante diestro 1 y 2 y mediodía del proestro (Fig. 2). En la tarde del proestro, entre las 14.00 y 15.00 horas, los niveles circulantes de LH comienzan a incrementarse rápidamente, alcanzando valores máximos aproximadamente entre las 15.00 y 19.00 hs del mismo día, según los ciclos de luz-oscuridad de los distintos bioterios, cepa, etc. Este pico de LH induce ruptura folicular y la ovulación. Inmediatamente los niveles sanguíneos comienzan a declinar hasta alcanzar su valor basal temprano en la mañana del estro. Se han descrito, además, variaciones circadianas (Wilcox y Wiest 1960) y ultradianas o pulsátiles (Gay y col. 1970; Fox y Smith 1985) en la secreción de LH.

FSH cae durante la fase folicular hasta justo antes de la ovulación, entre el estro tardío, diestro 1 y 2 y mediodía del proestro (Fig. 2). Luego de la media tarde del proestro la secreción de FSH aumenta en forma simultánea con LH, tomando valores de pico entre las 15.00 y 19.00 del proestro. Aunque, posteriormente la secreción de ambas gonadotrofinas comienza a declinar hacia valores basales, temprano en la mañana del estro ocurre un segundo pico de FSH, disminuyendo poco después a valores basales hacia la tarde del estro.

2.2.2.2. *Prolactina*

La prolactina es sintetizada por las células lactotropas de la adenohipófisis. Es una hormona proteica de 23-24kD de peso molecular, compuesta por una cadena polipeptídica de 197 aminoácidos, en la rata, con tres puentes disulfuro.

En general, el patrón de secreción de prolactina durante el ciclo estral es similar al de LH (Fig. 2). Algunos laboratorios han encontrado niveles elevados en distintos momentos del ciclo, pero se acepta generalmente un único pico de secreción de prolactina en la tarde del proestro.

3. Regulación del ciclo estral

La conservación de las especies ovulatorias está determinada por la aparición de la ovulación en el momento más indicado para que si sobreviene la fecundación, puedan tener lugar la preñez y el parto y lograr un máximo de posibilidades de supervivencia para las crías. Los mecanismos de regulación de los ciclos ovulatorios son por lo tanto de vital importancia.

La regulación de la función reproductora es muy compleja, está integrada por los sistemas nervioso y endocrino. El SNC es el receptor y coordinador de los estímulos que influyen sobre la función sexual. Sobre el hipotálamo actúan factores ambientales, factores locales, neurotransmisores, hormonas periféricas, etc. y éste a su vez elabora hormonas hipotalámicas que son liberadas de las terminales nerviosas de la eminencia media. Son transportadas por la circulación del sistema porta hipofisario, a la pars distalis estimulando la secreción de hormonas hipofisarias a la circulación general. Las hormonas hipofisarias actúan sobre la función gametogénica y endocrina gonadal. La secreción gonadal además de desarrollar y mantener los caracteres sexuales, actúa sobre el hipotálamo y la hipófisis regulando la liberación hormonal.

En consecuencia existen tres niveles de regulación de la función reproductora de la hembra (Fig. 3): 1) el SNC, mediante la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y la dopamina, 2) la adenohipófisis, a través de las gonadotrofinas, LH y FSH; y de la prolactina, y 3) los ovarios que, como hemos mencionado antes, secretan hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona fundamentalmente y también testosterona) y hormonas proteicas (como la inhibina). La interacción de estos tres niveles de secreción y regulación hormonal da origen a los ciclos ovulatorios en las distintas especies.

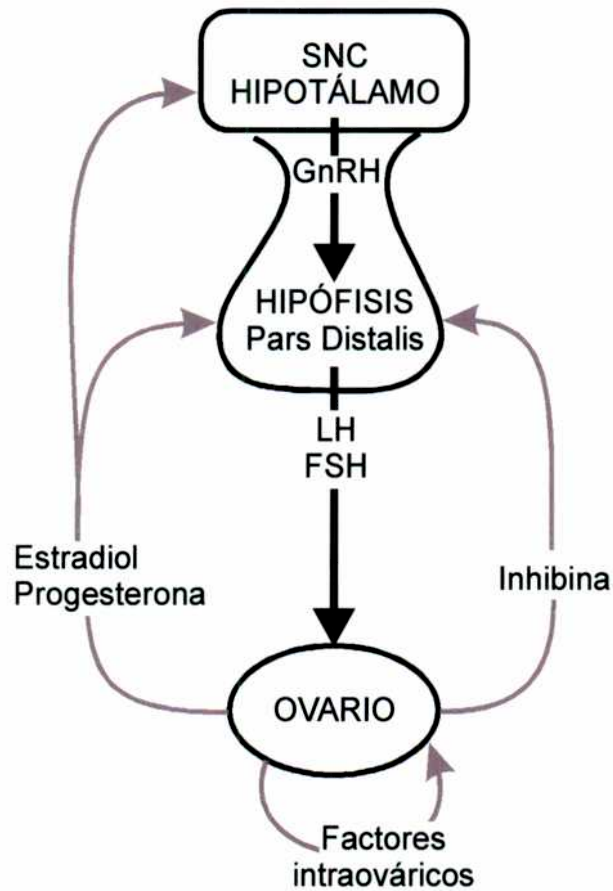


Figura 3. Eje hipotálamo hipófisis gonadal. Las flechas grises representan regulaciones ováricas positivas o negativas del eje.

3.1. Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central elabora un mensaje -la secreción pulsátil de GnRH- el cual regula la función gonadotrófica. Este mensaje se construye luego de la integración de múltiples informaciones que alcanzan el SNC. Algunas de ellas provienen del eje reproductor, y otras del medio interno o externo. La neurona decapeptidérgica integra esta información y responde con pulsos de la neurohormona.

El GnRH es un decapeptido, cuya estructura molecular presenta muy pocos cambios a lo largo de la evolución de los vertebrados, siendo el originalmente descrito en mamíferos: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂.

Embriológicamente las neuronas GnRH provienen de la placoda olfatoria. Por migración centripeta a través del nervio olfatorio, alrededor de 500-1000 neuronas GnRH terminan localizadas en el hipotálamo, en el área preóptica-supraquiasmática y en el hipotálamo medio basal, en un centro funcional oscilador, y proyectan sus axones hacia la eminencia media (Libertun 1995). Allí es liberado el decapeptido en los capilares del sistema portal hipotálamo-hipofisario, actuando luego sobre las células gonadotropas de la adenohipófisis. El GnRH es liberado como rápidos y masivos incrementos, separados por un período silencioso y, en menos de 5 minutos, el péptido desaparece de la sangre portal hipofisaria.

En contraste con otras neuronas hipotalámicas secretoras de péptidos, las neuronas de GnRH no forman núcleos bien definidos. Si bien las neuronas decapeptidérgicas tienen pulsatilidad intrínseca, el patrón pulsátil de secreción de GnRH, sugiere la existencia de una red de conexiones que permite sincronizar dichas neuronas (Stojilkovic y col. 1994). Surgió así el concepto de un *oscilador* o *generador de pulsos* ubicado en el hipotálamo responsable de la liberación pulsátil y sincrónica de GnRH de las terminales nerviosas de neuronas decapeptidérgicas.

En general se observa que el *generador de pulsos* es sensible a los niveles de estrógenos circulantes. Existen muchos sistemas neuronales involucrados en la regulación de GnRH: noradrenalina, péptidos opiáceos, neuropéptido Y, serotonina, dopamina y GABA entre otros. Las neuronas decapeptidérgicas presentan también receptores para GnRH, permitiendo un mecanismo de retroalimentación ultracorto. Todos estos sistemas neuronales están interrelacionados y la secreción de GnRH se modula preferentemente según los niveles de estrógenos y progesterona circulantes.

La reproducción en mamíferos, tanto macho como hembra, depende críticamente de una neurosecreción apropiada del GnRH. Esto ha sido demostrado en numerosos experimentos en los cuales el bloqueo de la acción del decapeptido por inmunoneutralización o antagonismo del receptor, lleva a un cese o reducción en la secreción gonadotrófica y de la función ovárica. La esterilidad en ratones mutantes, carentes de GnRH, o la infertilidad humana asociada a una insuficiencia de GnRH demuestran las severas consecuencias reproductivas resultantes de una secreción de GnRH deficiente (Levine y col. 1991).

Se ha descrito que la secreción de LH es pulsátil con una frecuencia menor a una hora (Gay y col. 1970; Fox y Smith 1985). Cada pulso de LH es la respuesta a un pulso de GnRH que llega a la adenohipófisis (Levine y Ramirez 1982). La naturaleza pulsátil de la secreción de GnRH es esencial para mantener las gonadotrofinas en sus niveles normales. Se ha visto que en mujeres amenorreicas y en monjas con lesión hipotalámica, la administración de GnRH en forma pulsátil (1 pulso cada 60-90min) restablece la secreción de gonadotrofinas. Si la administración es pulsátil pero con alta (2-3 pulsos por hora) o baja (1 pulso cada 5 horas) frecuencia, no se logran inducir niveles normales de gonadotrofinas, o está alterada la relación entre ambas. En cambio, dosis farmacológicas o la administración constante del decapeptido, o un análogo, provoca una disminución progresiva de la sensibilidad hipofisaria, hasta lograr su refractariedad, con la consecuente caída en los niveles plasmáticos de LH y FSH a valores no detectables (Hotchkiss y Knobil 1994). Dijimos que la secreción de GnRH está fundamentalmente modulada por los esteroides gonadales: el estradiol modula principalmente la amplitud de los pulsos, mientras que la progesterona modula su frecuencia. Durante la fase folicular tardía del ciclo, luego de un primer período inhibitorio, el estradiol en

concentraciones altas y sostenidas, induce un incremento en la secreción de GnRH, provocando el pico preovulatorio de gonadotrofinas. Durante el pico de gonadotrofinas, la frecuencia de GnRH no se alteraría pero aumentaría la amplitud de cada pulso originando la descarga masiva de LH. En la fase lútea hay una marcada disminución de la frecuencia, en respuesta a los niveles muy elevados de progesterona, y la amplitud es variable, lográndose niveles medios de LH similares a los de la fase folicular (Rossmanith y col. 1990).

3.2. Pars Distalis

A nivel hipofisario también se ejercen las retroalimentaciones negativa y positiva de los estrógenos. El E_2 , retroactuando negativamente reduce la respuesta al GnRH, disminuyendo la cantidad de LH secretada ante cada pulso de GnRH. Está aceptado que el esteroide ovárico más potente para la inhibición de LH es el estrógeno, puesto que los niveles de gonadotrofinas son semejantes en la fase folicular, cuando la progesterona está prácticamente ausente, y en la fase lútea, cuando su concentración es máxima.

El inicio del pico preovulatorio de gonadotrofinas se encuentra precedido por un incremento en los niveles de E_2 circulantes (retroalimentación positiva) originado por los folículos. Para que el efecto inhibitorio del estradiol pase a ser estimulador sobre el gonadotropo, es necesario que sus niveles sobrepasen un determinado umbral y se mantengan elevados por cierto tiempo; en rata, se describió un umbral de 50 pg/ml, con una duración mínima de 8 a 12 horas para lograr la retroalimentación positiva por estradiol. La retroalimentación positiva se ejerce induciendo una mayor sensibilidad al GnRH de la glándula hipofisaria, a través de un aumento en la síntesis de LH y también del número de receptores para GnRH. El aumento de GnRH induce a nivel del gonadotropo un aumento de sus propios receptores (upregulation), además de estimular la síntesis de LH y FSH, y su secreción de la reserva

intracelular. Se ha postulado que ciertos gestágenos podrían estar actuando a este nivel, facilitando la liberación de gonadotrofinas inducida por GnRH en la mitad del ciclo. Luego del pico de LH y FSH se produce una caída abrupta de los niveles de receptores hipofisarios de GnRH, por internalización de receptores.

La simulación de los patrones de E₂ y P circulantes, a lo largo del ciclo, es suficiente para mantener los valores basales de LH e inducir el pico de LH en ratas ovariectomizadas. Sin embargo, tanto los niveles basales como los de pico de FSH son 2 a 3 veces mayores en las ratas OVX, con respecto al estado endocrino de un animal ciclante intacto. Esto indica la existencia de otro factor ovárico que actúa regulando la secreción de FSH. Las inhibinas, de origen gonadal, tienen un papel fisiológico específico que consiste en la inhibición de la secreción de FSH hipofisaria. Durante el ciclo estral, una inyección de inhibina puede prevenir el pico preovulatorio de FSH. Además, a diferencia de los antagonistas de GnRH, es capaz de inhibir el pico postovulatorio de FSH, impidiendo el reclutamiento de folículos para el siguiente ciclo. La inhibina tiene un papel regulatorio activo, puesto que la inmunoneutralización contra su subunidad α , es seguida por un incremento en los niveles de FSH. Actúa directamente a nivel hipofisario, sobre el gen que codifica para la subunidad β de FSH.

3.3. Ovario

A nivel ovárico, como veremos en detalle más adelante, los crecientes niveles de estrógenos secretados por los folículos en desarrollo, actuando a nivel hipotalámico e hipofisario, inducen el pico de gonadotrofinas, promoviendo la ovulación y la consecuente formación del cuerpo lúteo. En la fase lútea, e incluso durante la preñez, la progesterona en presencia de estrógenos altos es

el freno más potente del generador de pulsos de GnRH, inhibiendo la secreción de gonadotrofinas.

4. Desarrollo Folicular y Función Lútea

4.1. Folículos Primordiales y Primarios

En la mayoría de los mamíferos la proliferación de las ovogonias se restringe al desarrollo prenatal o cercano al nacimiento. Luego son transformadas en ovocitos primarios caracterizados por una profase meiótica prolongada y rodeados por una capa escamosa de células de pregranulosa y una membrana basal (Greenwald y Roy 1994). Estos *folículos primordiales* constituyen la reserva acumulada de folículos quiescentes, los cuales van siendo agotados progresivamente durante el período de vida reproductiva. Continuamente habría folículos primordiales que dejan el “pool” de reserva para desarrollarse en *folículos primarios*, en los cuales el ovocito, detenido en el estadio de diplotene de la profase meiótica, se encuentra rodeado por una única capa de células de granulosa cuboides (descendientes de las células de pregranulosa). El folículo evoluciona hacia su crecimiento, culminando en la ovulación o, la gran mayoría de ellos en atresia durante algún estadio subsiguiente de desarrollo. El papel de las gonadotrofinas durante el desarrollo folicular inicial no está dilucidado. Para algunos, (Peters y col. 1973), estas serían poco importantes. Para otros, (de Wolff-Exalto 1982), las gonadotrofinas adquieren mucha mayor importancia. En especial FSH, facilitando el desarrollo temprano de las células de los folículos y el crecimiento del ovocito, con una diferenciación celular normal y el desarrollo folicular progresivo.

Uno de los pasos más críticos en la foliculogénesis consiste en la transformación de los folículos primordiales en primarios, dependiendo probablemente de factores provenientes del ovocito. No se conoce claramente la naturaleza de estas señales, pero existen evidencias que indican que en

ausencia del ovocito, las células de pregranulosa son incapaces de formar folículos.

El número de folículos que se recluta por día para iniciarse en el desarrollo, parece depender del número de folículos inactivos remanentes y por consiguiente, disminuye con la edad, pero no depende del día del ciclo estral en la rata. (Schwartz y col. 1972) fueron los primeros en proponer que el pico secundario de FSH durante el estro en la rata, recluta los folículos en crecimiento, que serán ovulados en el próximo estro (4 ó 5 días después). Dichos folículos comenzaron su desarrollo aproximadamente 20 días antes, con lo cual hasta el momento de la ovulación estuvieron expuestos a 4 ó 5 picos consecutivos de LH/FSH.

4.2. Folículo Secundario

Luego de una serie de divisiones mitóticas de las células de granulosa, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio preantral multilaminar conocido como *folículo secundario*. A medida que crece el folículo en tamaño, se diferencian las células de la teca derivadas de células del estroma ovárico, formando una envoltura de células aplanadas alrededor de la membrana basal folicular.

En diferentes especies, en el folículo preantral, las células de granulosa tienen la capacidad de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos: progestágenos, andrógenos y estrógenos, este último en mayor proporción que los otros dos, en cooperación con las células intersticiales. Sin embargo, la actividad esteroidogénica en este estadio es limitada. En todos los estadios foliculares se detectaron receptores de FSH en las células de granulosa (Redmer y col. 1986; Fry y col. 1987), los cuales se encuentran funcionalmente acoplados a adenilato ciclasa, al menos a partir del estadio preantral tardío. FSH induce o activa la enzima aromatasa (Moon y col. 1975), que cataliza la aromatización

de andrógenos en estrógenos, siendo este un paso limitante en la producción ovárica de estrógenos. FSH, en combinación con los estrógenos, parece ejercer un efecto mitogénico sobre las células de granulosa promoviendo su proliferación (Goldenberg y col. 1972; Richards 1979) y la acumulación de receptores de FSH por aumento del número de células y de la densidad de receptores en cada célula (Goldenberg y col. 1972). El folículo puede por consiguiente en presencia de FSH aromatizar pequeñas cantidades de andrógenos y generar su propio microambiente estrogénico (McNatty y col. 1979; Nimrod y col. 1976). El destino del folículo preantral depende de un delicado balance entre la presencia de andrógenos y la capacidad de aromatizarlos. En bajas concentraciones, los andrógenos inducen la aromataasa y contribuyen a la producción de estrógenos. En altas concentraciones, la capacidad limitada de aromatización se encuentra sobrepasada y el microambiente folicular se torna androgénico, conduciendo al folículo a la atresia. La atresia folicular es el proceso por el cual degeneran los folículos que no fueron seleccionados para ovular y ocurre a través de la muerte celular por apoptosis (Hsueh y col. 1994; Tily 1996). El estradiol y los andrógenos regulan la apoptosis en células de la granulosa actuando como factores de supervivencia o atretogénicos, respectivamente (Billig y col. 1993). Es de interés considerar que las células de granulosa dentro del folículo están firmemente unidas y poseen uniones estrechas ("gap junctions") que permiten el libre pasaje de materiales a través del interior del folículo y un fluido intercambio celular de pequeñas moléculas. También existe un libre acceso al interior del propio ovocito, a través de las células de granulosa que lo rodean formando el cúmulus.

Las células de la teca son la principal fuente de andrógenos foliculares, por lo tanto con un desarrollo limitado de este tipo celular se minimizan los

andrógenos disponibles. La acción de LH actuando sobre receptores específicos presentes en las células tecaes en todos los estadios foliculares (Oxberry y Greenwald 1982), y la consecuente producción de AMPc, provee el principal estímulo para la actividad esteroidogénica. Aquellos folículos que comiencen su desarrollo en la fase lútea tardía o al comienzo de un nuevo ciclo, cuando FSH está elevada y LH baja, se verán favorecidos por un ambiente en el que prevalece la aromatización en las células de granulosa.

4.3. Folículo Terciario

Con la aparición de la cavidad antral, el folículo secundario es convertido en un *folículo terciario* o *antral temprano*. Si bien los primeros estadios del desarrollo folicular no parecen depender de la presencia de las hormonas gonadotróficas, LH y FSH serían indispensables para su transformación en un folículo antral.

En este estadio aparece una capa exterior, denominada teca externa, compuesta de tejido conectivo y células de músculo liso. En la capa interior conocida como teca interna, se desarrolla un fino plexo de vasos en la zona adyacente a la capa de la granulosa -que es avascular hasta después de la ovulación-, comunicado a su vez hacia el exterior por una serie de vénulas y arteriolas de la teca externa. Esta vascularización acompaña y favorece la diferenciación de la teca en un tejido esteroidogénico.

La síntesis de hormonas esteroideas parece estar compartimentalizada dentro del folículo. Si bien cada compartimento retiene la capacidad de producir progestágenos, andrógenos y estrógenos, la actividad de aromatasa de las células de granulosa excede en gran medida a la observada en células tecaes (McNatty y col. 1979; Hillier y col. 1981), carentes de receptores para FSH. Por lo tanto las células de granulosa muestran una producción preferencial de estrógenos, mientras la síntesis de andrógenos predomina en el

compartimento tecal (McNatty y col. 1980; Tsang y col. 1980). La cooperación que se observa entre ambos tipos celulares para la producción de estrógenos dio origen al concepto de “dos células, dos gonadotrofinas” en la esteroidogénesis ovárica (Fig. 4) (Gore-Langton y Armstrong 1994). En respuesta a la LH, las células tecales producen andrógenos. Estos pueden pasar al compartimento de granulosa, gracias a la amplia red de capilares, y son transformados en estrógenos por la aromatasa inducida por FSH (Moon y col. 1978).

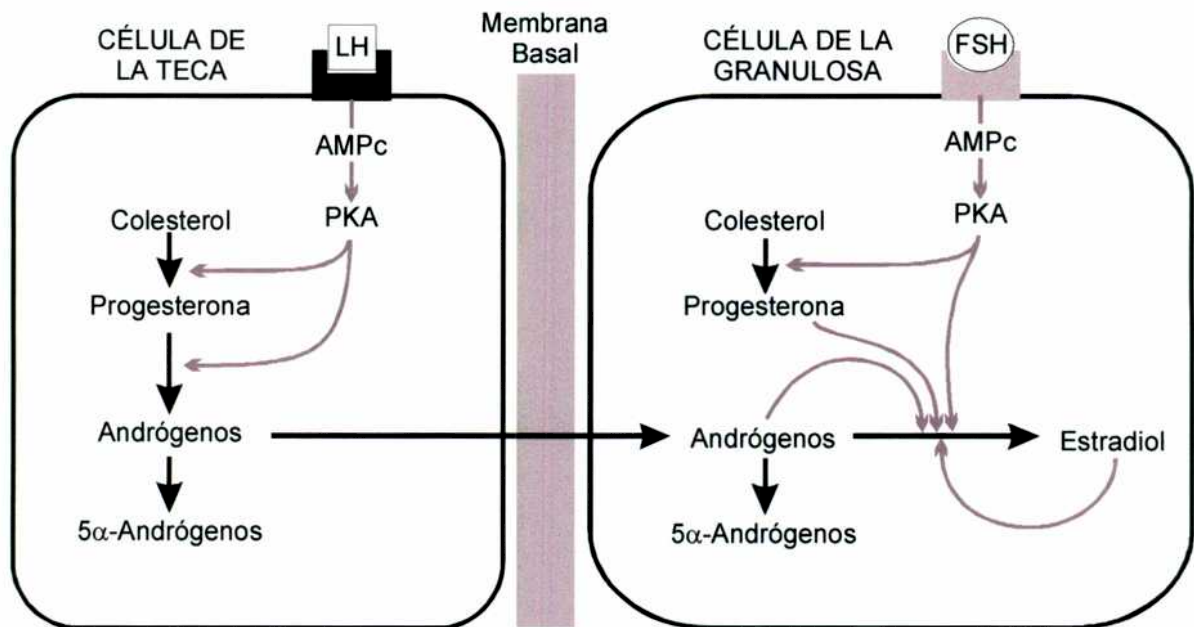


Figura 4. Hipótesis de “dos células, dos gonadotrofinas” en la regulación de la esteroidogénesis en el folículo ovárico.

Se considera al estadio antral y especialmente al folículo preovulatorio temprano, la fuente más importante de esteroides ováricos durante el ciclo femenino. El cambio en el patrón de secreción esteroidea está asociado a un incremento en el crecimiento celular y citodiferenciación del folículo, y la expansión considerable del antro. La formación de la cavidad ocurre bajo la influencia sinérgica de los estrógenos y la FSH, por aumento de la producción de fluido folicular y la vascularización del folículo. El fluido folicular contiene

productos que derivan del plasma y otros originados en la granulosa. Entre éstos se pueden mencionar proteínas plasmáticas, enzimas intra y extracelulares, mucopolisacáridos, esteroides, hormonas hipofisarias y distintos factores ováricos no esteroides (Edwards 1974; Chang y col. 1976; McNatty 1978). El fluido folicular proporciona a cada folículo un microambiente especial, permitiendo que folículos contiguos estén en diferentes estadios de crecimiento, pero todas las células en un determinado folículo están inmersas en el mismo ambiente. El compartimento antral permite el acceso de moléculas como FSH y LH hasta sus receptores celulares, proveyendo un área local para la amplificación de señales, fundamental para el desarrollo de los folículos dominantes.

4.4. Folículo Preovulatorio

Los folículos antrales, con mayor tasa de proliferación de células de granulosa, tienen ventajas con respecto a los folículos menos desarrollados presentando un microambiente óptimo, y podrán ser seleccionados como folículos dominantes. Estos lograrán completar su desarrollo preovulatorio. La retroalimentación negativa que producen los niveles crecientes de estrógenos sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipofisario, conducen a la disminución de los niveles plasmáticos de la hormona hipofisaria. El mayor desarrollo folicular se acompaña de un incremento en la vasculatura de la teca, ofreciendo acceso preferencial de FSH a estos folículos que además poseen el mayor número de receptores de la hormona. Los folículos dominantes presentan pues una alta sensibilidad a FSH a pesar de los niveles menguantes de la gonadotropina, manteniendo el estímulo para la aromatización. Bajo el estímulo de FSH, y favorecidos por la presencia de estrógenos, las células de la granulosa adquieren receptores para LH y

prolactina, en la rata (Zelevnik y col. 1974; Richards y Midgley 1976; Wang y col. 1979).

En el *foliculo preovulatorio* o *foliculo de de Graaf*, las células de granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que en las células de la teca aparecen vacuolas y aumenta la vascularización. El ovocito reanuda la meiosis, acercándose a completar la división reduccional.

Los niveles de estradiol se elevan rápidamente por sobre el umbral, induciendo el pico de gonadotrofinas. Actuando a través de sus receptores, LH promueve la luteinización de las células de granulosa y teca, lo que resulta en la producción de progesterona.

La esteroidogénesis se encuentra modificada entre el momento del pico de LH y la ovulación. La producción esteroidea es brevemente estimulada, pero las altas concentraciones de LH alcanzadas en el momento del pico preovulatorio causan una disminución por internalización transitoria de sus receptores en las células de granulosa y teca (Gore-Langton y Armstrong 1994). El incremento transitorio de la secreción de estrógenos causa la inhibición, en las células teca, de la biosíntesis androgénica, favoreciendo la producción de progesterona. Luego de la ovulación, las células recuperan su capacidad de responder a las gonadotrofinas. En los roedores, la prolactina favorece la recuperación de receptores de LH (Richards y Williams 1976) y tiene también efectos inhibitorios sobre la síntesis de estrógenos.

4.5. Ovulación

El proceso ovulatorio es iniciado en el momento en que el tejido folicular es estimulado por el pico de gonadotrofinas. Sólo ocurre en aquellos folículos maduros que adquirieron concentraciones adecuadas de receptores de LH (Leung y Steele 1992). El pico de LH parece ser el estímulo para la reanudación de la meiosis en el ovocito, la luteinización de las células de granulosa y de la

teca y la síntesis de prostaglandinas y enzimas proteolíticas, esenciales para la ruptura del folículo (LeMaire y col. 1975; Tsafirri y col. 1972; Weiss y col. 1976).

4.6. Cuerpo Lúteo

4.6.1. Morfología del Cuerpo Lúteo

Estudios morfológicos en diversas especies han mostrado que luego de la ovulación, las células provenientes tanto de la teca interna como de la capa de granulosa del folículo remanente están involucradas en la formación del cuerpo lúteo. Esta se inicia por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células del folículo preovulatorio, llamados luteinización. Antes de la ovulación hay hipertrofia de las células de granulosa y aumento de la relación citoplasma/núcleo. Luego de la ovulación, con la ruptura de la membrana basal, los vasos sanguíneos de la teca interna invaden la cavidad folicular. Estos capilares se forman tanto por migración (Basset 1943), como por mitosis de las células endoteliales (Gaede y col. 1985), en un proceso que estaría regulado por un factor angiogénico secretado directamente por las células de granulosa luego de la ruptura del folículo. Los capilares forman una red vascular que representa un 20% del volumen del cuerpo lúteo, y aproximadamente un 60% de la superficie de cada célula luteal está en contacto directo con un capilar (Dharmarajan y col. 1985). Durante la luteinización, en la rata, aparecen muchas uniones estrechas entre las células luteales, se observan una marcada proliferación del retículo endoplasmático, transformándose de predominantemente rugoso en predominantemente liso, y un incremento en la complejidad del aparato de Golgi. El contenido de mitocondrias también aumenta, y las mitocondrias pequeñas y redondas, con crestas laminares, que se observan en células de granulosa, se convierten en

mitocondrias más grandes y de formas más variadas, con crestas tubulares (Rothchild 1981). La actividad del cuerpo lúteo difiere de los folículos principalmente en la cantidad, más que en el tipo, de esteroides secretados. El cambio principal es un aumento marcado en la secreción de progesterona, acompañado por una caída e incluso pérdida (según las especies) de la capacidad estrogénica y androgénica.

El cuerpo lúteo está compuesto de dos tipos de células luteales esteroidogénicas, morfológicamente distinguibles. Las células luteales grandes presentan un tamaño que oscila entre los 20 μ m de diámetro en roedores y 40 μ m o más en humanos (Enders 1973), son de forma poliédrica, con citoplasma claro y un gran núcleo en posición central con nucléolo distinguible. Contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides (el retículo endoplasmático liso y el aparato de Golgi muy desarrollados y las mitocondrias abundantes). Presentan gránulos de secreción, cuyo contenido sería principalmente oxitocina y relaxina.

Las células luteales pequeñas tienen un diámetro de 22 μ m o menor; son de forma ahusada, presentando citoplasma oscuro, con grandes gotas lipídicas y núcleo de forma irregular. El retículo endoplasmático liso está bien desarrollado, sin embargo, con respecto a las células luteales grandes, el aparato de Golgi tiene menor desarrollo y la cantidad de mitocondrias es menor. La diferencia fundamental entre ambos tipos celulares es la ausencia de gránulos de secreción en las células pequeñas.

4.6.2. Funciones del Cuerpo Lúteo

El CL es un órgano endocrino transitorio. El requerimiento de la presencia del CL para el éxito de la preñez fue descubierto a principios de siglo por Frankel (1903) y Magnus (1901), quienes en investigaciones separadas demostraron que la ooforectomía o la ablación del CL provocaba aborto o resorción de los

embriones. El 25% al 55% de todos los embriones de mamíferos se pierden durante los primeros estadios de gestación, y muchas de estas pérdidas parecen estar causadas por una función lútea inadecuada. Por consiguiente es de gran importancia entender los factores involucrados en la regulación del tiempo de vida y de la función del cuerpo lúteo.

La principal función del CL es la producción de progesterona, ya que prepara el endometrio uterino para la implantación y mantenimiento de la preñez temprana. Para lo cual debe permanecer viable un periodo de tiempo especie-específico durante la gestación; luego, en varias especies, la placenta asumirá la función de secretar progesterona y el CL regresa. Si la fertilización o la implantación no ocurren, los ciclos ovulatorios se reanudan sólo cuando la función lútea cesa; mostrando una segunda función del CL, que consiste en bloquear la ovulación.

De este modo, el cuerpo lúteo puede ser visto como la última etapa del folículo ovárico, que luego de expulsar al ovocito, continúa manteniendo el huevo (fertilizado) a través de la producción de progesterona. Los cambios progesteronales que ocurren en el útero deben preceder la llegada del cigoto y requieren la transformación de un folículo mayoritariamente productor de estrógenos, en un cuerpo lúteo principalmente productor de progesterona.

4.6.3. Regulación del Cuerpo Lúteo

El factor más importante que inicia la luteinización y estimula la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo en las distintas especies es la LH (Hsueh y col. 1984; Amsterdam y col. 1989), mientras que la molécula que parece inhibir tanto la síntesis como la secreción de progesterona es la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Además, tanto las células de granulosa como las luteales son capaces de sintetizar numerosos factores intraováricos, los cuales actúan en forma autocrina y paracrina modulando positiva o negativamente, la diferenciación y

función luteal y la producción de progesterona. Los factores más estudiados han sido la inhibina, activina, GnRH, relaxina, factores de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) y tipo II (IGF-II), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento transformante beta (β TGF), entre otros. Estos factores son sintetizados por las células de granulosa, existiendo en la mayoría de los casos receptores para estas moléculas en células del folículo. Son numerosas las evidencias que indican que una función lútea normal requiere un desarrollo folicular preovulatorio óptimo (Stouffer y Hodgen 1980). Por ejemplo, la acumulación de receptores de LH y la adecuada producción de esteroides y otros factores durante la fase folicular predetermina el grado de luteinización y por consiguiente la capacidad funcional del cuerpo lúteo.

Durante el ciclo estral de la rata, tres o más generaciones de cuerpos lúteos provenientes de los ciclos ovulatorios precedentes, pueden estar presentes simultáneamente en el ovario (Freeman 1994). Cada generación persiste morfológicamente entre 12 y 14 días. En la rata se pueden distinguir por generaciones según características de tamaño, vasculatura y tinción. En diestro 2, los nuevos cuerpos lúteos formados alcanzaron su máximo tamaño, el cual se mantiene hasta diestro 1 del siguiente ciclo y en diestro 2 de este segundo ciclo, los cuerpos lúteos regresionan abruptamente.

Los cuerpos lúteos formados durante el ciclo estral en la rata son estructuras activas efímeras. Es decir que, con excepción de un breve intervalo poco después de la ovulación, los cuerpos lúteos no secretan suficiente progesterona para mantener una reacción decidual en el útero (Freeman 1994). La producción de progesterona en la fase lútea, y por lo tanto el ciclo de vida del cuerpo lúteo, se caracteriza por una primera etapa de crecimiento, una fase de mantenimiento y una de regresión. Con la disminución de la secreción de progesterona luteal, en diestro 2, una nueva ovulación tiene lugar

poco tiempo después, por lo cual la “fase lútea” en ratas, al igual que en hámster y ratón, es peculiar. En un animal no apareado, los cuerpos lúteos secretan progesterona sólo durante 1 ó 2 días, permitiendo los ciclos cortos que se observan en roedores. Sin embargo si existe apareamiento en proestro, la hipófisis secreta suficientes cantidades de un factor luteotrófico, la prolactina, que rescata al cuerpo lúteo en diestro 2, persistiendo éste por más tiempo en estado funcional. Si el apareamiento es fértil, la fase lútea dura todo el periodo de preñez, 20 a 22 días. Si el apareamiento es infértil o inducido artificialmente, el cuerpo lúteo persiste sólo 12 a 14 días, periodo conocido como pseudopreñez y caracterizado por niveles elevados de prolactina y progesterona (Freeman y col. 1974).

4.6.4. Luteólisis

La naturaleza efímera del cuerpo lúteo se debe principalmente a un equilibrio muy delicado entre progesterona y prostaglandinas. La luteólisis no puede ser atribuida simplemente a cambios en los niveles plasmáticos de las hormonas luteotróficas, como prolactina y LH. En distintas especies, incluyendo la rata, se describió que la prostaglandina $F_{2\alpha}$ causa luteólisis (Rothchild 1981). El origen de dicha PG es fundamentalmente uterina, como se ha podido demostrar en cobayo, conejo y hámster y rata pseudopreñadas, observando la extensión del ciclo de vida del cuerpo lúteo después de realizar una histerectomía (Niswender y Nett 1994; McCracken y col. 1999). En otras especies, como en primates y humanos, la presencia del útero no es necesaria para la luteólisis; y a diferencia de lo observado en animales pseudopreñados, los ciclos estrales normales de rata, ratón y hámster no se encuentran prolongados por histerectomía. El útero de mamíferos también produce prostaglandina de la serie E que presenta un efecto luteotrófico. El balance

entre $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE determinaría el mantenimiento del cuerpo lúteo o su regresión.

El cuerpo lúteo de rata contiene prostaglandinas y es capaz de producirlas *in vitro*, mientras que el tratamiento con indometacina previene la luteólisis inducida por PMSG en ratas con histerectomía. En rata y otros mamíferos existe una relación inversa entre la secreción de progesterona y la producción de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ luteal. Durante la etapa de crecimiento del ciclo de vida del cuerpo lúteo, éste no responde al efecto luteolítico de $\text{PGF}_{2\alpha}$, mientras que los cuerpos lúteos de mayor edad regresionan (Rothchild 1981). Es decir, el gestágeno cambia su efecto sobre la PG del CL, de acuerdo al estado evolutivo del mismo. El efecto supresor de progesterona sobre PG, es marcado durante la fase de crecimiento del ciclo del CL, se hace más débil durante la etapa de mantenimiento y disminuye progresivamente hasta desaparecer por completo durante la fase de regresión. La progesterona es el principal estímulo para su propia secreción, cualquier cambio que produzca disminución en la producción de progesterona induciría eventualmente la regresión del cuerpo lúteo. $\text{PGF}_{2\alpha}$, a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC), inhibe la secreción de progesterona; de modo tal que en la medida que el cuerpo lúteo adquiere mayor potencial para producir prostaglandina, la habilidad potencial para la producción de progesterona se ve reducida. Una vez que el balance se vuelca hacia la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$, la regresión del cuerpo lúteo es inevitable.

Diferentes mecanismos se han propuesto para explicar los efectos luteolíticos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$: un descenso rápido y marcado en el flujo sanguíneo luteal; una disminución en el número de receptores para LH; un desacople del receptor de LH y la adenilato ciclasa; activación de PKC; incremento del calcio intracelular que induciría cambios apoptóticos produciendo un efecto citotóxico.

Durante la regresión del cuerpo lúteo en rata se producen numerosos cambios morfológicos (Niswender y Nett 1994). Se observan muchas gotas lipídicas en el citoplasma, y un incremento de 10 veces en la producción luteal de triglicéridos. La extensión del retículo endoplásmico liso disminuye y aumenta la cantidad de vacuolas autofágicas y heterolisosomas. Las células en degeneración parecer ser removidas por macrófagos. El volumen porcentual ocupado por vasos sanguíneos disminuye en forma lineal en el cuerpo lúteo durante los últimos días del ciclo estral. Al avanzar la regresión luteal se observa una disminución en el tamaño de las células esteroideogénicas. Todas las células que componen el cuerpo lúteo presentan una desorganización de las organelas intracelulares y el aumento de las gotas lipídicas y los lisosomas. Existen varios factores intraluteales que estarían integrados en un sistema de interacciones celulares, y controlarían el fenómeno de autodestrucción del cuerpo lúteo (Leymarie y Martal 1993). Podemos mencionar entre ellos una sustancia que inhibe la unión al receptor de LH (LH-RBI); otro péptido que inhibe la síntesis de progesterona; un péptido agonista del GnRH encontrado en ovario de rata que presenta *in vitro* efectos antagonistas de LH.

5. Tumores ováricos

Los tumores de ovario son formas frecuentes de neoplasias femeninas. Existen numerosos tipos de tumores ováricos, tanto benignos como malignos. Alrededor de 80% de los mismos son benignos y aparecen sobre todo en mujeres jóvenes, con edades comprendidas entre 20 y 45 años. Los malignos son más frecuentes en mujeres de mayor edad, entre 45 y 65 años. Epidemiológicamente se observó que el número de embarazos y el uso de anticonceptivos orales tienen una relación inversa con la incidencia de cáncer de ovario (Emons y col. 1990). Se sugiere que cada ovulación causa un trauma menor sobre la superficie del ovario, con la formación de inclusiones quísticas del epitelio celómico en el estroma que pueden generar tumores (Waterhouse 1976).

Los resultados de varios estudios indican que los factores endocrinos tienen un papel importante en el cáncer ovárico. La exposición mensual a concentraciones importantes de gonadotrofinas podría promover la proliferación de células ováricas malignas (Casagrande y col. 1979). Se ha visto además, que los tumores ováricos aparecen con alta frecuencia en mujeres durante la menopausia y postmenopausia, etapa caracterizada endocrinamente por la hipergonadotrofinemia (Vom Saal y Finch 1986; Waterhouse 1976; Rao y Slotman 1991; Cramer y Welch 1983). Ultimamente con las técnicas de fertilización asistida se ha observado también que la hiperestimulación con gonadotrofinas puede inducir la aparición de tumores de ovario principalmente de la granulosa (Willemsen y col. 1993). La alta concentración de gonadotrofinas también se ha postulado como causa de otras patologías ováricas, como en el síndrome de poliquistosis ovárica donde existe una secreción inadecuada de gonadotrofinas, presentando elevados niveles de LH y valores bajos de FSH, con una excesiva producción de

andrógenos (Yen 1980).

En todos estos casos las gonadotrofinas sobreestimularían el ovario induciendo la aparición de tumores ováricos de distintos tipos histológicos, que en muchos casos son hormono-dependientes. El ovario funcional está formado por diversos tipos celulares, y todos ellos pueden sufrir transformaciones generando tumores que se clasifican según su origen. Básicamente, los tumores del ovario surgen de alguno de los tres componentes ováricos: 1) el *epitelio celómico de superficie*, que embriológicamente tiene potencialidad para diferenciarse a un epitelio que se asemeja mucho al de las trompas uterinas o al de las glándulas endocervicales; 2) las *células germinales*, que migran hacia el ovario procedentes del saco vitelino y que son totipotenciales; y 3) el *estroma ovárico*, del que forman parte los *cordones sexuales*, precursores del aparato endocrino del ovario posnatal. Existe además un grupo de tumores que *escapan a la clasificación* y, por último, se pueden encontrar *tumores secundarios o metastásicos*, siendo el ovario una de las localizaciones más frecuentes de metástasis de diversos tumores (Tabla 1) (Robbins y Cotuan 1987).

Altos niveles de gonadotrofinas también fueron correlacionados con neoplasias ováricas en experimentos con animales, haciendo interesante el estudio de tumores en modelos animales por su posible similitud, en cuanto al desarrollo, con patologías ováricas humanas. En ratas la mayoría de los tumores de ovario, ya sean espontáneos o inducidos, derivan de los cordones sexuales y el estroma (Maekawa 1990); mientras que en humanos los tumores ováricos más frecuentes son los epiteliales. Sin embargo, Waterhouse (1976) propone que la hiperestimulación del estroma sería un intermediario para el desarrollo de tumores epiteliales, presentando concordancia en los factores de

riesgo para los tumores del estroma y los epiteliales, en especial la hipergonadotrofinemia.

Tabla 1. Clasificación de los tumores ováricos.

Tumores del epitelio de superficie	Tumores serosos Tumores mucinosos Carcinoma endometriode Adenocarcinoma de células claras Tumor de Brenner Carcinoma indiferenciado
Tumores de células germinales	Teratomas Disgerminoma Tumor del seno endodérmico Coriocarcinoma
Tumores de los cordones sexuales y el estroma	Tumores de la granulosa-teca Tumor de células de la granulosa Tecoma Luteoma - Luteoma del embarazo Fibroma Tumores de células de Sertoli-Leydig Gonadoblastoma
Tumores no clasificables	
Tumores metastásicos	

Dentro de los tumores de ovario nos referiremos en particular a los *tumores de los cordones sexuales y el estroma*, que incluyen todas las neoplasias ováricas que se originan bien en los cordones sexuales de la gónada embrionaria (que precede a la diferenciación del mesénquima gonadal en masculino o femenino) o bien los derivados del estroma ovárico. Los tumores de las células de la granulosa-teca muestran un aspecto histológico variado, formados por proporciones distintas de células de la granulosa y de la teca que pueden estar luteinizadas; existen *tumores de células de la granulosa* típicos, hasta tumores puros de células de la teca o *tecomas*. Algunos tumores de células de la granulosa contienen células grandes, poligonales, con abundante citoplasma eosinófilo o vacuolado, semejantes a células lúteas. Cuando en los tumores predomina este tipo celular se los denomina *luteomas* (Maekawa 1990). Existen diversos tipos de tumores de granulosa según su clasificación histológica que incluyen los subtipos difuso, microfolicular, trabecular, juvenil

o mixto (Palmquist Evans y col. 1995; Nogales y col. 1993; Coppes y col. 1993; Querleu 1994) y pueden o no estar asociados a otras patologías como en el síndrome de Mafucci o la enfermedad de Ollier (Tanaka y col. 1992). Estos tumores pueden aparecer en todo el espectro etario dado que se han diagnosticado casos desde la infancia (edad de 4 años) hasta la postmenopausia tardía (Palmquist Evans y col. 1995). Constituyen aproximadamente el 5 % de todos los tumores ováricos.

La importancia clínica de este grupo de tumores se debe a dos causas:

1) con frecuencia son endocrinamente funcionales (en general, los que tienen abundante componente de teca) pudiendo producir grandes cantidades de estrógenos, andrógenos o progesterona;

2) los tumores de células de la granulosa son potencialmente malignos; si bien en la mayoría de los casos son de buen pronóstico, algunos de ellos pueden comportarse agresivamente y hacer recidivas luego de varios años de haberse diagnosticado el tumor primario. Los cálculos sobre su malignidad clínica oscilan entre el 5 y 25 %. Los tumores formados predominantemente por células de la teca casi nunca son malignos.

En la literatura se han descrito algunos casos de luteomas en la mujer que se desarrollan con muy baja frecuencia. Se encontraron en pacientes con edades comprendidas entre 28 y 74 (promedio: 58.4) años, observándose virilización en 12-30% de los casos (Hayes y Scully 1987). Su aparición está correlacionada con dos situaciones fisiológicas en la mujer:

1) Si bien los desórdenes hormonales ováricos durante el embarazo son infrecuentes, en algunos casos se acompañan de tumores ováricos con células similares a las de granulosa y de la teca luteinizadas presentes en el cuerpo lúteo, denominados *luteoma del embarazo* (García-Bunuel y Brandes 1976). Se trata de un tumor benigno que se desarrolla durante el embarazo,

probablemente como consecuencia de los altos niveles de hCG. En general, luego del parto los tumores ováricos regresan espontáneamente (Joshi y Dunaif 1995).

2) En mujeres post-menopáusicas también se describieron algunos pocos casos de la presencia de estos tumores ováricos, presentando raramente hiperandrogenismo y virilización. En uno de ellos la administración de un analogo de GnRH, provocó una marcada disminución en los niveles de testosterona, FSH y LH, sugiriendo una dependencia por las gonadotrofinas de la secreción tumoral (Chico y col. 1995).



Objetivos generales

Nuestro interés por un mayor conocimiento de la fisiología ovárica y en particular de la función lútea, y la importancia epidemiológica de los tumores ováricos hormono-dependientes, nos impulsaron a estudiar los mecanismos que regulan el crecimiento y la secreción de un tumor experimental de ovario que se desarrolla en la rata en respuesta a la hipergonadotrofinemia (Biskind y Biskind 1944). Para nuestros estudios empleamos este modelo animal, interesante por su posible similitud con patologías humanas, con el cual tenemos experiencia anterior en el laboratorio (Lux y col. 1984).

Nos proponemos caracterizar aspectos fisiológicos, bioquímicos y farmacológicos de los luteomas empleados como modelo experimental, en distintos estadios de su desarrollo. Estudiamos los diferentes aspectos del tumor mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*. Concretamente, los objetivos planteados fueron los siguientes.

a) Observar la biología del luteoma en cuanto a su influencia sobre la supervivencia del animal portador; la posibilidad de malignización del tejido; la histología y evolución del mismo en función del tiempo.

b) Determinar el estado endocrino de los animales portadores mediante estudios *in vivo* a distintos tiempos de evolución del luteoma. Además, en comparación con el tejido lúteo normal, evaluar la capacidad secretora del tumor, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*.

c) Estudiar los mecanismos de control de crecimiento y secreción del tumor, y su dependencia por las gonadotrofinas, mediante la participación del GnRH como regulador a nivel hipofisario. Papel de inhibina/activina en el control endocrino del animal portador de luteoma.

d) Evaluar la posible participación del GnRH como regulador del crecimiento y secreción, a nivel gonadal y tumoral. Para ello se buscará determinar la presencia del sistema de GnRH ovárico/tumoral.

e) Caracterización de los receptores de GnRH. Estudio de las vías de segundos mensajeros involucrados en la respuesta al GnRH en el tejido tumoral, en comparación con tejido lúteo normal.



Modelo experimental:

LUTEOMA

1. Descripción del modelo

El modelo de tumor ovárico experimental que utilizaremos fue inicialmente desarrollado por Biskind y Biskind (1944), con modificaciones posteriores (Fels y Foglia 1960), incluyendo las de nuestro laboratorio (Lux y col. 1984). Consiste en autoimplantar un ovario en el bazo de una rata hembra adulta, bilateralmente ovariectomizada, en la mañana del estro.

La nueva situación anatómica del ovario, altera el estado endocrino normal del animal. Las hormonas hipofisarias, LH y FSH, se encuentran elevadas, dado

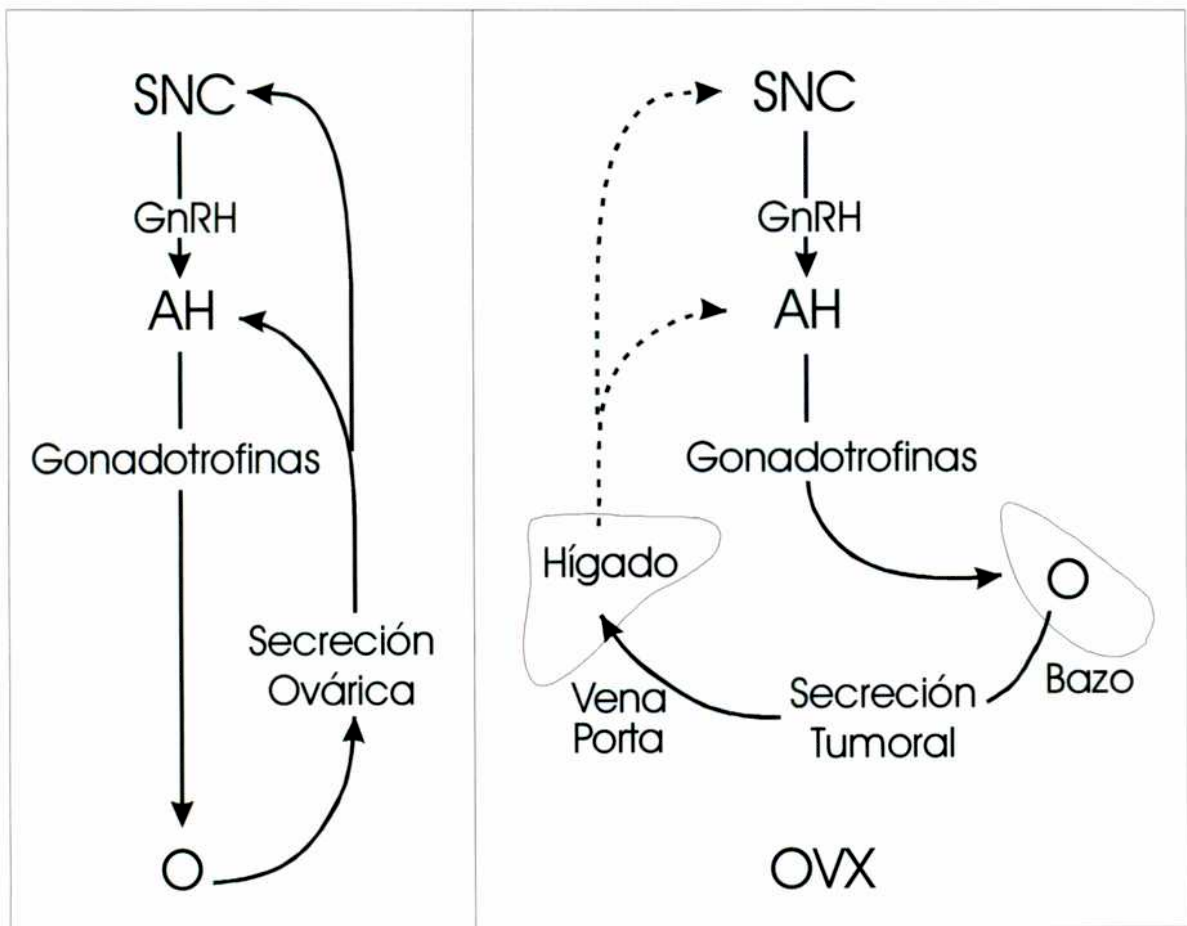


Figura 5. Panel izquierdo: eje hipotálamo-hipofisario-ovárico en una ratona hembra entera. Retroalimentación negativa de la secreción ovárica sobre las gonadotrofinas. Panel derecho: ratona a la que se extirparon los dos ovarios (OVX) y a la que se autoinjertó uno de ellos en el bazo (O). La secreción esteroidea del ovario intraesplénico es inactivada en el hígado, llevando a la hipergonadotropinemia por falta de retroalimentación negativa. SNC: Sistema Nervioso Central. AH: Adenohipófisis. O: Ovario.

que los esteroides secretados por el injerto ovárico del bazo a la vena esplénica, pasan por la circulación portal hepática, siendo degradados por el hígado (Fig. 5, panel derecho). De esta manera la retroalimentación negativa que normalmente ejercen los esteroides sobre el eje hipotálamo-hipofisario, es abolida (Fig. 5, panel izquierdo) (Uilenbroek y col. 1978). Se establece una situación endocrina similar a la del animal castrado, es decir con un marcado aumento en la secreción de LH y FSH. El ovario autotransplantado se convierte en una masa o tumor, como resultado de la hiperestimulación constante de las gonadotrofinas, que inducen el crecimiento y la actividad secretora del tumor (Clark y Holder 1984; Lux y col. 1984).

Agentes que alteran la retroalimentación negativa normal existente entre la hipófisis y el ovario pueden ser factores en la etiología del tumor ovárico. El modelo de tumor ovárico intraesplénico es un prototipo de este mecanismo. Si bien no existe una contraparte anatómica de este modelo en humanos, puede haber una contraparte funcional debido a los casos de hipergonadotrofinemia antes mencionados y además por la existencia de ciertas drogas y químicos que pueden causar un aumento en la degradación hepática del estrógeno y producir aumento en las gonadotrofinas. Entre estos factores podemos mencionar barbitúricos, pesticidas hidrocarbónicos halogenados, drogas anti-inflamatorias e antihistaminas (Willemsen y col. 1993).

2. Materiales y Métodos

2.1. Animales

En todos los experimentos que conforman esta tesis se emplearon ratas vírgenes de la especie Rattus norvegicus de la cepa Sprague Dawley, Holtzman, del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales se encontraban en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (22°C) y con un fotoperíodo de 12hs (las luces se encienden a las 7.00hs y se apagan a las 19.00hs), recibiendo alimento balanceado y agua *ad libitum*.

2.2. Obtención de los tumores ováricos experimentales

Se emplearon ratas vírgenes adultas (60 días) de 200g aproximadamente. Se realizó frotis vaginal de los animales diariamente y luego de dos ciclos regulares fueron operados en la mañana del estro. Los animales se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg de peso corporal, ip), se extirparon ambos ovarios y uno de ellos, elegido al azar, se limpió de adherencias y del oviducto, para ser injertado en el bazo de la misma rata, donde se desarrollará el tumor. El injerto se realiza mediante una incisión que atraviesa el bazo, donde se coloca el ovario, quedando de esta forma firmemente sujeto.

Como control del modelo experimental se empleó el grupo Sham, al cual se le realizó una operación ficticia. Los animales Sham fueron bilateralmente ovariectomizados en la mañana del estro y se les autoinjertó un trozo de músculo abdominal en el bazo.

Los animales se dejaron recuperar, permitiendo el desarrollo tumoral por periodos variables de tiempo, empleándose para estudios *in vivo* y/o *in vitro*, según las necesidades del diseño experimental.

Con relación a otros modelos fisiológicos empleados en los experimentos que componen la tesis (ratas en estro, prepúberes superovuladas con PMSG y hCG), se realizará la descripción detallada en los Materiales y Métodos del capítulo correspondiente.

3. Resultados

3.1. Descripción macroscópica del tumor

En los animales portadores del injerto ovárico intraesplénico, luego de un mes se observa el desarrollo de un tumor en 98% de los casos (*injerto positivo*). La masa tumoral puede hacer prominencia en una cara del bazo, o más frecuentemente en ambas caras (Fig. 6). En los animales operados que al cabo de un mes presentan *injerto negativo* se observa una cicatriz en el lugar del implante.



Figura 6. Sección longitudinal de un luteoma de un mes de desarrollo (aumento 10X). Nótese la abundancia de cuerpos lúteos, pocos folículos y escaso tejido glandular intersticial. Se puede observar el bazo en el que se injertó el ovario original.

El *injerto positivo* tiene el aspecto de un tumor sólido, que puede presentar eventualmente estructuras quísticas. La superficie del mismo es irregular, semejante a un racimo de uvas, generalmente de color amarillento y muy vascularizado.

En el examen histológico los trasplantes ováricos se encuentran hipertrofiados y compuestos mayoritariamente por tejido luteínico que se dispone en varios cuerpos lúteos (Fig. 6, ver Fig. III.3)

3.2. Descripción microscópica del tumor

Se observan pocos folículos, en general luteinizados, pudiendo presentar una cavidad antral. Se distinguen principalmente células lúteas (ver Fig. I.1. A, B y C), y se encuentran también células de la granulosa (ver Fig. I.1.D). La abundancia de tejido lúteo característico de estos tumores dio origen al nombre *luteoma*. Según la clasificación de los tumores ováricos presentada en la Tabla 1, el modelo experimental pertenece al grupo de tumores de la granulosa-teca entre los derivados de los cordones sexuales y el estroma.



Capítulo I.

Desarrollo del luteoma experimental
durante un año

I.1. Introducción y objetivos

Empleando los luteomas como modelo experimental, se decidió investigar en primera instancia el desarrollo de estos tumores de ovario por periodos prolongados de tiempo: un año.

Los objetivos de este capítulo consistieron en:

- a) determinar la incidencia de su presencia en la sobrevida de los animales portadores y la posibilidad de que presenten transformaciones malignas o propagación metastásica.
- b) estudiar el crecimiento del tejido luego de un año de desarrollo, realizando también la caracterización histológica de los tumores.
- c) evaluar los patrones endocrinos de estos animales, durante el período estudiado, y los mecanismos de regulación de la secreción hormonal.

I.2. Materiales y Métodos

I.2.1. Animales

Para los experimentos que abarca este capítulo se emplearon 20 ratas portadoras de luteoma y 14 ratas sham.

Luego de un año de desarrollo se evaluó el porcentaje de mortalidad y de los animales sobrevivientes, el peso y los extendidos vaginales. Se sacrificaron los animales y se investigó la posible presencia de focos metastásicos mediante estudios anátomo-patológicos.

I.2.2. Volumen tumoral

Se extrajeron los luteomas de un año de desarrollo, determinándose el volumen tumoral alcanzado. Los tumores fueron medidos, con un calibre, en sus dos dimensiones mayores. El volumen de cada uno fue calculado empleando la fórmula: $V = 4/3\pi \times R_1^2 \times R_2$, siendo R_1 y R_2 los radios menor y mayor del tumor, respectivamente, considerando al tumor con forma elipsoidal (DeSombre y Arbogast 1974).

I.2.3. Estudios histológicos

Tinción con hematoxilina - eosina

Una vez extraídos los luteomas, se guardaron inmediatamente en formol 10%, para su posterior inclusión en parafina. Se realizaron luego estudios histológicos sobre dichos tumores. Las muestras de tumores conservadas en parafina fueron cortadas y posteriormente desparafinadas con alcoholes descendientes (15 minutos en xilol y pasajes por los demás alcoholes). Luego se realizó un lavado en H₂O desionizada. Posteriormente se realizó la coloración con hematoxilina durante 10 minutos y los cortes se hicieron virar en agua corriente hasta que tomaron la coloración azul-violácea. Luego se tiñó

el citoplasma con eosina en solución acuosa al 0.5%. Se procedió a lavar rápidamente con H₂O corriente, deshidratar con alcoholes ascendentes y aclarar con xilol. Los cortes se montaron y observaron en un microscopio óptico, y se tomaron microfotografías de algunos cortes representativos. Se observan los núcleos azules (hematoxilina) y los citoplasmas rosados (eosina).

1.2.4. Obtención de las muestras sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre yugular regularmente, una por mes, en horas de la mañana (9.00-11.00hs), durante un año, bajo leve anestesia con éter. La primer muestra fue tomada el día del injerto, previo a la operación y corresponde al valor inicial (tiempo 0). Las sangres se dejaron a temperatura ambiente para la formación del coágulo, y se separaron los sueros por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min. Los sueros se guardaron a -20°C para la determinación de los niveles de LH, FSH, PRL, progesterona y estradiol mediante radioinmunoanálisis, e inhibina mediante enzimoimmunoanálisis, una vez recolectadas todas las muestras del experimento.

1.2.5. Radioinmunoanálisis de hormonas esteroideas

En general, los RIA se realizaron según Libertun (1980).

1.2.5.1 Progesterona

Preparación de la muestra: 100 µl de suero fueron extraídos dos veces con 1ml de hexano. El extracto se evaporó en un baño a 50°C con aire y se disolvió, posteriormente, en 1.25 ml de buffer fosfato 0.075 M, pH 7.5, conteniendo 0.5% (P/V) de gelatina (buffer fosfato gelatina). Las muestras permanecieron luego 24 horas a 4°C para la disolución de la progesterona en el buffer. Para el RIA se tomaron 2 alícuotas de 500 µl, de cada extracto.

Estándares: se prepararon a partir de una solución de progesterona de 1 µg/ml (Sigma) en etanol, en un rango de 25 a 6400 pg por tubo en 500 µl de buffer fosfato gelatina.

Antisuero: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 200 µl de antiprogesterona (Niswender GDN 337), disuelta en buffer fosfato gelatina en una dilución de 1:2400.

Hormona radioactiva: la progesterona tritiada (New England Nuclear) de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, se agregó disuelta en buffer fosfato gelatina (aproximadamente 10.000 cpm/100 µl), a todos los tubos del ensayo.

Las muestras y la curva, con el trazador y el anticuerpo, se incubaron 24 horas a 4°C.

Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo: la separación se logró por el agregado de una suspensión de Carbón (0.5%)-Dextrano (0.05%) en buffer fosfato, recientemente preparada. Esta suspensión absorbe la hormona libre. Se agregaron 200 µl, se agitó con vortex y se incubó 10 minutos a 4°C. Luego se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Finalmente, se tomaron 700 µl del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 3 ml de tolueno omnifluor (4 g/1000 ml de tolueno). Se leyeron los viales en un contador de centelleo líquido. En todos los RIA los resultados fueron analizados con el programa RIAIAEA. La sensibilidad del ensayo fue de 1.25 pg/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.5% y 11.9%, respectivamente.

1.2.5.2 Estradiol

Preparación de la muestra: 400 µl de suero fueron extraídos dos veces con 2 ml de éter. El extracto se evaporó en un baño a 50°C y se disolvió en 0.75 ml de buffer fosfato 0.04 M, pH 7.0, conteniendo 0.1% (P/V) de gelatina (buffer

fosfato gelatina-E₂). Las muestras permanecieron luego 24 horas a 4°C para la disolución del estradiol en el buffer. Para el RIA se tomaron 2 alícuotas de 300 µl de cada extracto.

Estándares: se prepararon a partir de una solución madre de estradiol (Sigma) de 7.5 µg/ml en etanol, en un rango de 1.7 a 900 pg por tubo en 300 µl de buffer fosfato gelatina-E₂.

Antisuero: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 100 µl de antiestradiol (Niswender) disuelta en buffer fosfato gelatina-E₂ en una dilución de 1:50.000.

Hormona radioactiva: todos los tubos del ensayo recibieron el estradiol tritiado (NEN), de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, disuelto en buffer fosfato gelatina-E₂ (aproximadamente 10.000 cpm/100 µl).

Las muestras y la curva, con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 horas a 4°C.

Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo: la separación se logró siguiendo la misma técnica que para progesterona. Finalmente, se tomaron 500 µl del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 3ml de tolueno omnifluor (4 g/1000 ml de tolueno). Se leyeron los viales en un contador de centelleo líquido y se analizaron los resultados.

La sensibilidad del ensayo fue de 3.5 pg/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 9.3% y 11.4%, respectivamente.

I.2.6. Radioinmunoanálisis de hormonas proteicas

Se utilizó el radioinmunoanálisis por doble anticuerpo (Libertun 1980). Las muestras fueron evaluadas por duplicado en alícuotas que oscilaban entre 20 y 100 µl de suero de rata. A continuación se detalla el protocolo para

prolactina, siendo éste esencialmente el mismo para las otras hormonas proteicas.

I.2.6.1 Prolactina

Se cuantificó usando el kit de reactivos provistos por el NIDDK.

Marcación: Se utilizó 5 µg de prolactina de rata purificada (NIDDK rPRL-I-6), con una actividad biológica de 30 UI/mg por el análisis de Nicoll del buche de paloma, y contaminación con somatotrofina y tirotofina menor al 0.3%. La hormona liofilizada fue disuelta en solución de CO₃HNa 0.01 M a una concentración final de 200 µg/ml. La marcación se efectuó en tubos de vidrio, bajo campana. Se usó ¹²⁵I (NEN), libre de portador y apto para marcar proteínas. Las soluciones empleadas fueron: buffer fosfato 0.5 M pH 7.5; buffer fosfato 0.05 M pH 7.5; buffer fosfosalino compuesto por buffer fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M y azida sódica 0.01% pH final 7.4; solución de transferencia: 100 mg de IK, 0.8 g de sacarosa, 10 ml de H₂O csp; solución de cloramina-T: 150 mg/80 ml de buffer fosfato 0.05 M preparada inmediatamente antes de su uso; solución de metabisulfito de sodio: 45 mg/10 ml de buffer fosfato 0.05 M.

La columna de cromatografía usada para la separación de la hormona marcada del ¹²⁵I libre fue de Biogel P60, 100-200 mesh, en buffer fosfato 0.05 M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 1ml de buffer fosfosalino con EDTA 0.05 M y 2% de BSA.

Procedimiento de marcación: a la hormona disuelta en la solución de CO₃HNa se le añadieron 35 µl de buffer fosfato 0.5 M y luego 1 mCi de ¹²⁵I. La oxidación se efectuó con 25 µl de la solución de cloramina-T, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción fue detenida con 50 µl de metabisulfito de sodio. Luego se agregaron 100 µl de la solución de transferencia (que testea si

hubo un exceso de agente oxidante), y el contenido del tubo de marcación fue pasado por la columna de separación. El buffer de corrida fue el buffer fosfato 0.05 M. Se recogieron aproximadamente 500 μ l de eluido por tubo, y se leyeron 10 μ l de cada uno en un contador gamma. Con las columnas empleadas se obtuvo una buena separación de los picos de hormona marcada y de ^{125}I que no fue incorporado. Los mejores tubos de la marcación se reunieron en uno y se congelaron en alícuotas para su posterior uso en RIA.

Radioinmunoanálisis: El primer antisuero contra PRL de rata fue NIDDK-anti-rPRL-S-9 obtenido al inmunizar conejos con PRL de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rPRL-I-6. Se diluyó en buffer fosfosalino, EDTA 0.05 M con 2% de suero de conejo normal, pH 7.4, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo (entre 1:1500 y 1:2500). El standard de referencia fue PRL de rata NIDDK-rPRL-RP-3, con una actividad biológica de 30 UI/mg. Los patrones (0.0396 a 10 ng por tubo) se prepararon en buffer fosfosalino con 1% de albúmina de huevo (buffer EA). La separación se logró por segundo anticuerpo, usando antisuero de oveja contra globulina de conejo, en diluciones de trabajo establecidas previamente.

El protocolo de rutina fue el siguiente: se agregaron el primer anticuerpo y la hormona trazadora (aproximadamente 15.000 cpm) a las alícuotas experimentales preparadas en buffer EA; luego de una incubación de 24 horas a 4°C se agregó el segundo anticuerpo; y luego de 24 horas se separó la hormona libre de la complejada, por centrifugación a 2400 rpm, durante 30 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se leyó la radioactividad en el precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma.

Todos los RIA fueron elaborados de manera muy similar, por lo que se describirá en los próximos, sólo aquellos puntos que difieran.

I.2.6.2 Hormona Luteinizante

Se utilizó el método heterólogo desarrollado por Niswender y col. (1968). La hormona trazadora fue en este caso NIDDK-rLH-I-9 purificada, aislada de glándulas hipofisarias ovinas por Reichert y col. (LER 1056). Como primer antisuero se utilizó el obtenido por NIDDK-Anti-Rat-LH-RIA-11. La dilución inicial fue de 1:196.000. Como preparación de referencia se utilizó la LH purificada de hipófisis de rata (NIDDK-Rat-LH-RP3), con un mínimo de contaminante de FSH y TSH. La curva patrón se extiende de 0.015 a 8 ng por tubo. La sensibilidad del ensayo fue de 0.6 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.2% y 11.4%, respectivamente.

I.2.6.3 Hormona Foliculo Estimulante

La hormona trazadora fue NIDDK-Rat-FSH-I-8. El primer antisuero fue obtenido en conejos contra FSH purificado de rata (NIDDK-Anti Rat FSH Serum-11), y la dilución inicial fue 1:30.000. El estándar de referencia fue FSH purificado de rata (NIDDK-Rat-FSH-RP2) con casi nula contaminación de LH y TSH. La curva patrón se extiende de 0.11 a 15 ng por tubo. La sensibilidad del ensayo fue de 1.5 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 8.0% y 13.2%, respectivamente.

I.2.7. Medición de inhibinas diméricas por enzimoimmunoanálisis

La determinación de las inhibinas A y B en suero se realizó por el método de enzimoimmunoanálisis de dos sitios (ELISA), empleando anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los péptidos, como se describió previamente (Groome y O'Brien 1993). Brevemente, las muestras y los estándar se trataron con SDS al 6%, se calentaron a 100°C por 3 min y se trataron con una solución de H₂O₂ por 30 min a temperatura ambiente para aumentar la afinidad del epítopo por el anticuerpo. Se agregaron los

anticuerpos acoplados a la fosfatasa alcalina como sistema de amplificación. Las absorbancias fueron determinadas en un lector de ELISA a 490 nm. Como estándares se utilizaron inhibinas A y B recombinantes humanas. Activina A, B y folistatina presentan una reacción cruzada <0.1% en ambos ensayos. Inhibina A presenta una reacción cruzada <0.5% en el ensayo de inhibina B, e inhibina B cruza <0.1% en el ensayo de inhibina A (Groome y O'Brien 1993).

1.2.8. Análisis Estadísticos

En general, el análisis estadístico de los datos a lo largo de la tesis se realizó según Sokal y Rohlf (1995).

Los niveles de las hormonas séricas extraídas de sangre yugular o troncal, se compararon por múltiple análisis de varianza para medidas repetidas (MANOVA). Como test a posteriori se empleó el test de Tuckey. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statistica v5.0.

Para evaluar las diferencias entre porcentajes se utilizó el test de comparación de dos proporciones (Lison 1976).

Para evaluar las diferencias de volumen de los tumores desarrollados se utilizó el test de Student para varianzas desiguales.

En todos los casos $p < 0.05$ fue considerado significativo.

I.3. Resultados

I.3.1. Características generales

Los animales sham y los portadores de tumores ováricos intraesplénicos mostraron índices de mortalidad semejantes, al año de haberse efectuado los injertos. Tampoco se encontraron diferencias entre estos grupos, ni en el peso corporal, ni en los extendidos vaginales realizados el día del sacrificio (éstos eran mayormente anestros) (Tabla I.1).

Tabla I.1. Tasa de mortalidad, peso corporal y frotis vaginales luego de 12 meses, en ratas portadoras de luteoma y animales sham.

Animales	Tasa de mortalidad	Peso corporal (g)	Frotis vaginales
Luteoma	20% (4/20)	373.8±13.8	Anestros: 87.5% (14/16) Estros: 12.5% (2/16)
Sham	14.3% (2/14)	414.2±12.2	Anestros: 100% (12/12)

En la autopsia se investigó la presencia de alteraciones inducidas por el tumor o propagación metastásica. Se inspeccionaron los pulmones, el hígado y los nódulos linfáticos para verificar la presencia de propagación y/o infecciones. La incidencia de enfermedades infecciosas fue similar en ambos grupo y estaría, por lo tanto, relacionada con la edad de los animales. No se observaron masas tumorales con características del luteoma fuera del tumor original, sugiriendo la ausencia de propagación metastásica.

I.3.2. Desarrollo tumoral

En los animales sham sólo se observó una cicatriz en el sitio de inserción del trozo de músculo en el bazo. Todos los animales (100%) a los que se les injertó un ovario en el bazo desarrollaron un tumor, aún los que fallecieron antes de concluir el experimento al año. Luego de un año de desarrollo, los volúmenes

de los tumores variaron en un rango de 56 a 3489 mm³. Se clasificaron los tumores de acuerdo a los niveles de gonadotrofinas observados durante el desarrollo tumoral. Esto dio origen a dos grupos: la mayoría de los animales (81.3%) tenían niveles muy altos de gonadotrofinas y desarrollaron tumores grandes (volumen >400mm³); una minoría de los animales portadores de tumor (18.7%) mostraban niveles de gonadotrofinas muy bajos y desarrollaban tumores pequeños (volumen <400mm³), (Tabla I.2). El volumen de los tumores con gonadotrofinas altas fue significativamente mayor (p<0.02) que el de los animales con LH y FSH bajas.

Tabla I.2. Características de tumores experimentales ováricos luego de 12 meses de desarrollo.

Tumores	Volumen Tumoral (mm ³)	Presencia de quistes	Porcentaje de predominancia de células lúteas
<i>Grandes:</i> Altas gonadotrofinas	1391.6 ± 318.1 (13/16)	31% (4/13)	77% (10/13)
<i>Pequeños:</i> Bajas gonadotrofinas	235.9 ± 78.5 (3/16)	67% (2/3)	100% (3/3)

Se observó la formación de quistes en ambos tipos de tumores (Tabla I.2). La presencia de quistes no modificó los perfiles hormonales.

I.3.3. Características histológicas

Según la clasificación histológica de tumores de ovario, los luteomas obtenidos al sacrificar los animales luego de un año indicaron que pertenecen a los tumores del estroma y cordones sexuales, en particular de células de la granulosa y células lúteas.

Según la predominancia de un tipo celular u otro, los tumores se clasificaron en: tumores de células de granulosa y tumores de células lúteas (Tabla I.2). Se

observó una mayor incidencia de tumores con predominancia de células lúteas ($p < 0.05$).

Tumores con predominancia de células lúteas: 81.25% de los casos. Los tumores eran benignos, con pocas mitosis y no se hallaron anomalías nucleares. Estos tumores contenían gran número de cuerpos lúteos, algunos folículos y prácticamente no se encontró tejido intersticial glandular (ver Fig. 6). Aunque se observó desarrollo folicular, la mayoría de éstos eran anovulatorios y su teca se encontraba luteinizada. En algunos casos se

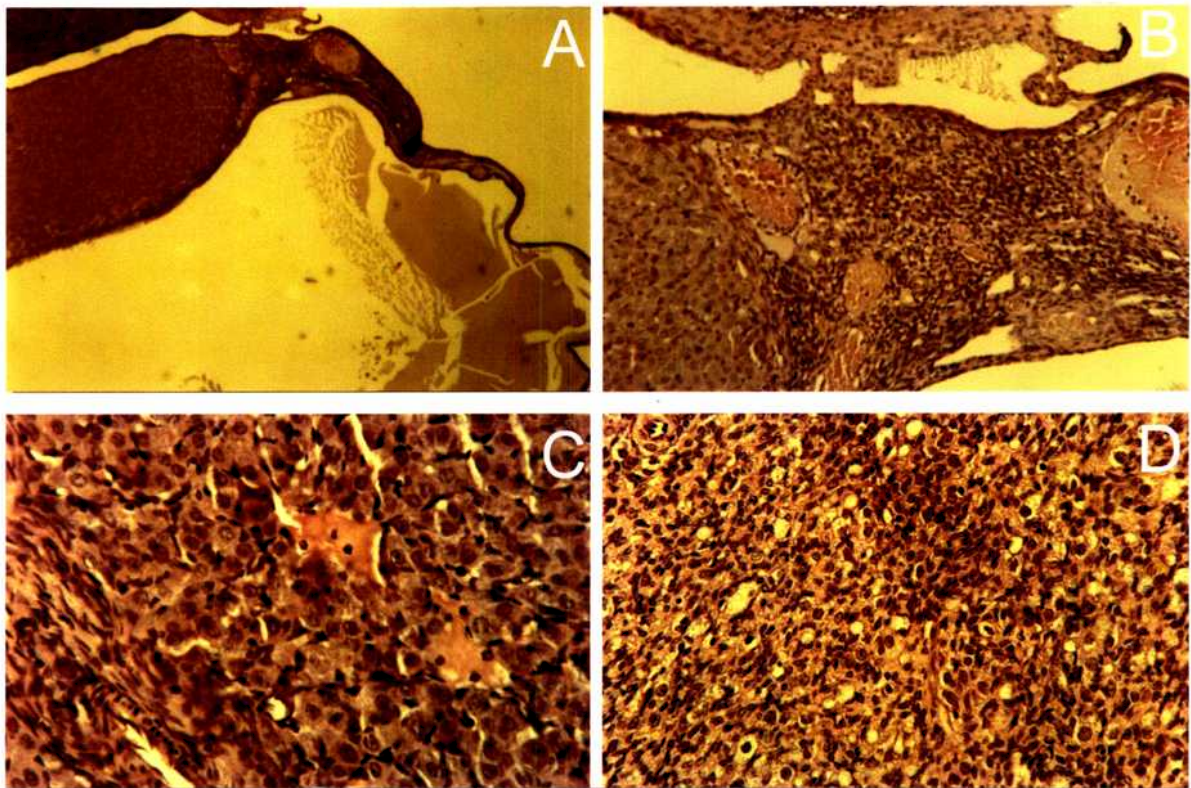


Figura I.1. Microfotografías obtenidas por microscopía óptica de cortes de tumores de 12 meses de evolución.

A: Quiste con un gran cuerpo lúteo situado próximo a tejido indiferenciado (50X).

B: Quiste a mayor aumento. Nótese los distintos tipos celulares. Se puede observar el bazo en el que se injertó el ovario original.

C: Tumor de células lúteas. Abundancia de células con citoplasma basófilo, núcleos esféricos y nucleolos prominentes (400X).

D: Tumor de células de granulosa. Las células tienen escaso citoplasma acidófilo de apariencia indiferenciada (400X).

observaron estructuras quísticas (Fig. I.1.A y B). Las células lúteas poseían citoplasmas basófilos y núcleos esféricos con nucléolos prominentes (Fig. I.1.C).

Tumores con predominancia de células de la granulosa: 18.75% de los casos.

Se observaron células con citoplasma escaso y acidófilo. Las células tenían apariencia indiferenciada y las mitosis eran más abundantes (Fig. I.1.D).

Al intentar relacionar los tumores clasificados según la predominancia del tipo celular, con los niveles hormonales, se verificó que el tipo celular de los tumores no condicionó los perfiles hormonales observados en los animales.

I.3.4. Perfiles hormonales de los animales portadores de tumor y sham.

Para todo el análisis de los perfiles hormonales de las ratas portadoras de tumor se utilizó la clasificación que agrupaba a los animales según los niveles de gonadotrofinas y que los dividía en dos grupos: animales con gonadotrofinas altas (tumores *Grandes*) y animales con gonadotrofinas bajas (tumores *Pequeños*) (ver I.3.2 Desarrollo tumoral). Ambos grupos se compararon con el grupo con operación ficticia (*Sham*).

I.3.4.1 Gonadotrofinas

Se observaron diferencias significativas en las gonadotrofinas séricas entre los distintos grupos. Los animales *Sham* presentaron la típica hipergonadotrofinemia de la rata ovariectomizada (Fig. I.2). La LH se encontraba significativamente elevada ya en el primer mes y permaneció elevada hasta el fin del experimento. En el grupo de tumores *Grandes* los niveles de LH aumentaban desde el mes 1 y fueron similares a los del grupo *Sham* hasta el mes 7. A partir del mes 8 los niveles de LH cayeron hasta no diferenciarse de los niveles iniciales, y siendo significativamente menores que en los animales

Sham. En el grupo de tumores *Pequeños*, la LH permaneció en niveles basales durante todo el experimento.

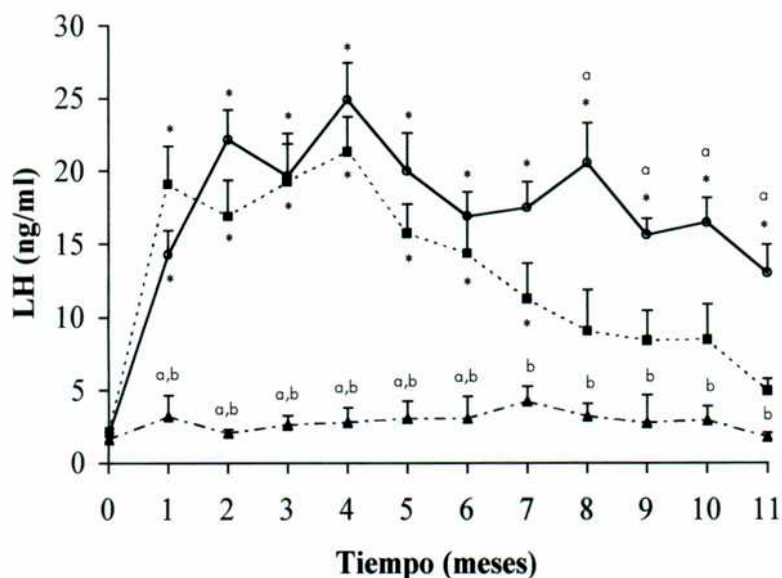


Figura I.2. Niveles de LH (ng/ml suero) en animales portadores de tumor: grupo *Pequeño* (▲), grupo *Grande* (■) y animales *Sham* (○) durante 12 meses. Múltiple análisis de la varianza indica interacción $p < 0.01$. Para ésta y las siguientes figuras: *: $p < 0.05$ o menor comparado con niveles iniciales (mes 0) en cada grupo. a: significativamente diferente de tumor *Grande* en cada tiempo, $p < 0.05$ o menor. b: significativamente distinto de *Sham* en cada tiempo, $p < 0.05$ o menor.

Con respecto a FSH (Fig. I.3), en los *Sham* se elevó significativamente a partir del mes 2 y permaneció elevada hasta el fin del experimento. La elevación en el mes 1 no fue estadísticamente significativa con respecto al valor basal del mismo grupo; sin embargo, fue significativamente mayor que el encontrado en los animales portadores de tumor, ya sean *Grandes* o *Pequeños*. En el grupo de tumores *Grandes*, la FSH se encontró elevada en los meses 3 a 5, luego disminuyó significativamente en el mes 6 y permaneció baja hasta finalizar el experimento, siendo en esta última etapa significativamente menor que los niveles encontrados en los animales *Sham*. En los animales con tumores *Pequeños*, la FSH no mostró mayores variaciones a lo largo del año y sus valores fueron más bajos que los hallados en el grupo *Sham*; aunque, dado el

bajo número de casos, propio de este grupo, sólo en algunos meses esta diferencia fue significativa.

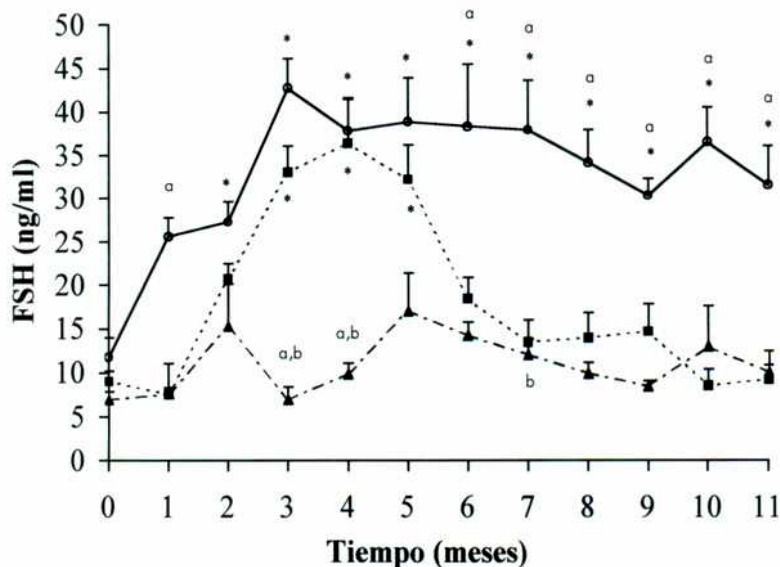


Figura 1.3. Niveles de FSH (ng/ml suero) en animales portadores de tumor: grupo *Pequeño* (▲), grupo *Grande* (■) y animales *Sham* (○) durante 12 meses. Múltiple análisis de varianza indica interacción $p < 0.01$.

I.3.4.2 Prolactina

Los niveles séricos de prolactina no presentaron mayores variaciones en los animales *Sham* y en los portadores de tumores *Grandes* (Fig. I.4). Por el contrario, en los animales con tumores *Pequeños* se observó un aumento en los meses 4° y 5° y desde el 7° al 9°, significativamente mayores que los observados en los animales *Sham* y en los portadores de tumores *Grandes*.

I.3.4.3 Hormonas esteroideas

No se observaron variaciones en los niveles de estradiol, en ninguno de los tres grupos, a lo largo del experimento (Fig. I.5).

La progesterona tampoco varió durante el año de evaluación en el grupo con tumores *Grandes* (Fig. I.6). Por el contrario, aumentó significativamente el mes 4 en el grupo *Sham*, y el mes 6 en el grupo portador de tumores *Pequeños*.

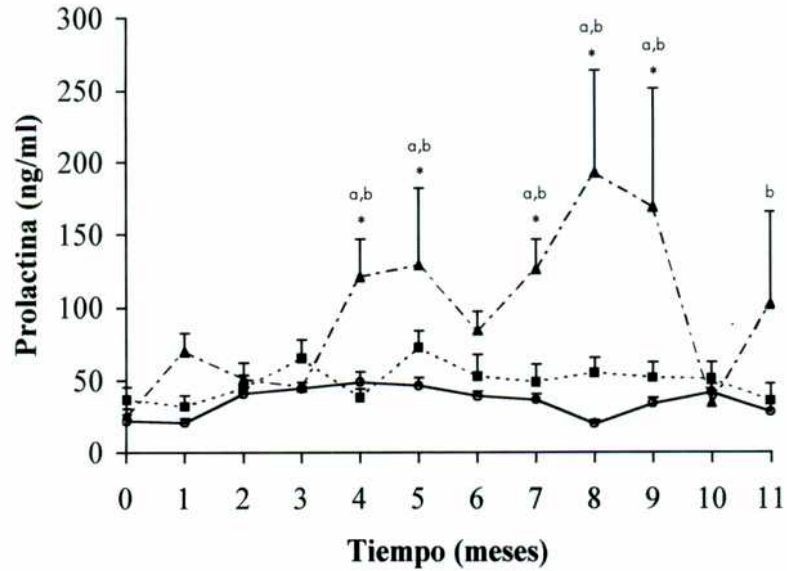


Figura I.4. Niveles de PRL (ng/ml suero) en animales portadores de tumor: grupo *Pequeño* (▲), grupo *Grande* (■) y animales *Sham* (○) durante 12 meses. Múltiple análisis de varianza indica interacción $p < 0.01$.

Estos aumentos fueron significativos con respecto a los niveles basales de cada grupo y también con respecto a los niveles del grupo con tumores *Grandes* en los respectivos meses.

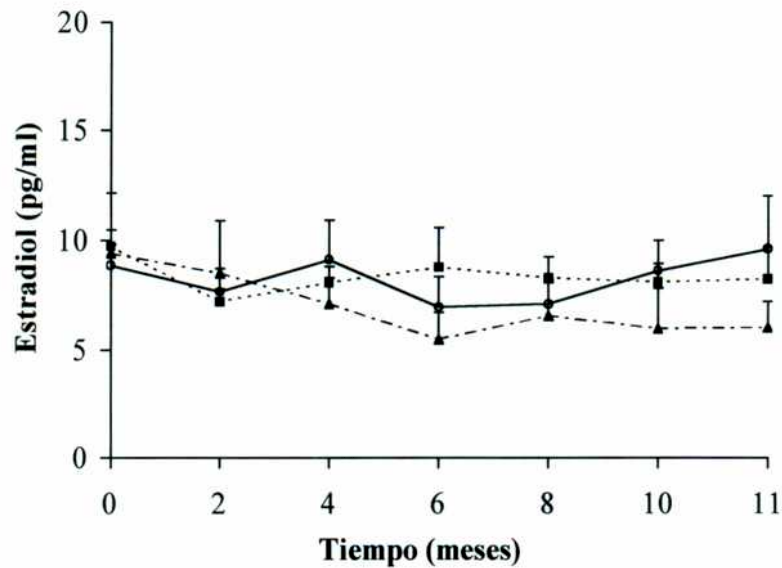


Figura I.5. Niveles de Estradiol (pg/ml suero) en animales portadores de tumor: grupo *Pequeño* (▲), grupo *Grande* (■) y animales *Sham* (○) durante 12 meses. Múltiple análisis de varianza no indica interacción.

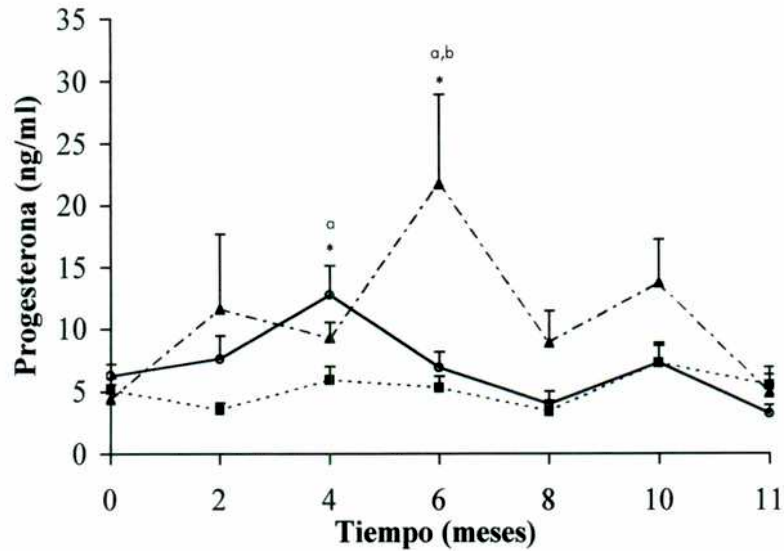


Figura 1.6. Niveles de Progesterona (ng/ml suero) en animales portadores de tumor: grupo *Pequeño* (▲), grupo *Grande* (■) y animales *Sham* (○) durante 12 meses. Múltiple análisis de varianza indica interacción $p < 0.01$.

I.3.4.4 Inhibinas

Dado que en el grupo tumor *Grande* los niveles de FSH aumentaron recién al tercer mes de desarrollo (ver I.3.4.1 Gonadotrofinas), nos interesó determinar los niveles séricos de inhibina al mes, comparativamente con los valores en los animales en estro (día del implante ovárico). Para ello se operó un nuevo lote, y se utilizaron sólo aquellos animales que al mes de desarrollo presentaron altos niveles de LH, correspondiendo al grupo tumor *Grande*. Ambas inhibinas, A y B, aumentaron marcadamente luego de un mes de desarrollo tumoral con respecto a los valores iniciales del estro (Fig. I.7), justificando la ausencia de aumento de FSH observada en el grupo tumor *Grande* en este período.

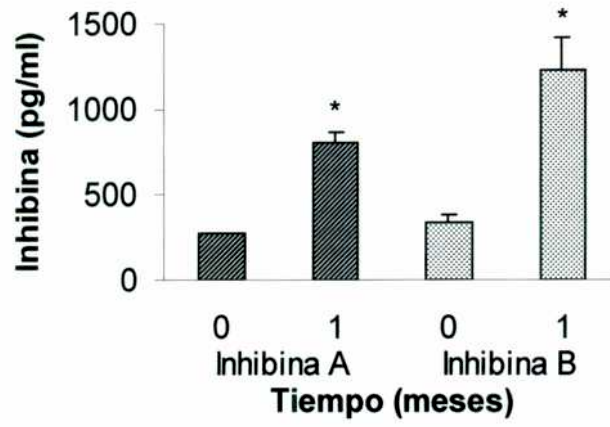


Figura I.7. Niveles séricos de inhibina A e inhibina B (pg/ml) en animales portadores de injerto ovárico. * $p < 0.01$ vs mes 0 para cada inhibina.

I.4. Discusión

Evaluamos el crecimiento tumoral, la posibilidad de transformación maligna o propagación metastásica y los patrones de secreción hormonal a lo largo de 12 meses.

Luego de un año del injerto, las ratas portadoras de tumor no mostraron alteraciones en su apariencia externa. No hubieron diferencias en las tasas de mortalidad, peso corporal o en la incidencia de enfermedades infecciosas entre los animales portadores de tumor y las ratas sham. Las autopsias revelaron la ausencia de propagación metastásica, dado que no se observaron otras masas tumorales aparte del luteoma original, en otras zonas examinadas del cuerpo como hígado, pulmones, cadenas linfáticas. Todos los animales *Sham* presentaban extendidos vaginales que correspondieron con anestros, como era de esperar en animales castrados; 87.8% de las ratas portadoras de luteoma tenían también, extendidos en anestro. El resto de los animales (2) presentaron extendido vaginal en estro, lo cual podría estar indicando que hubo un escape mínimo de estradiol de la metabolización hepática o la formación, en el sitio del trasplante, de algún vaso sanguíneo alternativo que escapa de la circulación portal. Dichos animales pertenecían al grupo tumor *Grande* (ver mas adelante) y no mostraron ninguna diferencia hormonal con respecto al resto del grupo.

Los tumores crecieron significativamente a lo largo de los 12 meses, dado que el volumen promedio alcanzado en dos meses de crecimiento del tumor corresponde a $180 \pm 30 \text{ mm}^3$ (ver Capítulo II), y luego de un año alcanzaron un volumen promedio de $1076 \pm 279 \text{ mm}^3$ (incluyendo todos los tumores, *Pequeños* y *Grandes*), aún bajo niveles decrecientes de gonadotrofinas. Esto indicaría que luego de un cierto tiempo, estos luteomas se tornarían

relativamente independientes de la estimulación gonadotrófica para su crecimiento o, al menos, su mantenimiento. El examen histológico de los tumores no mostró signos de malignización, en acuerdo con otros laboratorios (Jäger y col. 1995; Biskind y Biskind 1949), y reveló que en la mayoría de los tumores están presentes tanto células de granulosa como células lúteas, en diferentes proporciones. Se realizó una clasificación de los tumores según el tipo celular predominante en cada uno. Los más frecuentes fueron los tumores con predominancia de células lúteas (Tabla I.2), aunque el tipo tumoral no determinó el patrón hormonal del animal, según fuera descripto también por Jäger y col. (1995). Cuando se analizan los patrones hormonales de los animales portadores de luteoma, se puede establecer una relación evidente entre los niveles de gonadotrofinas y el tamaño tumoral, dividiendo los animales en dos grupos. 1) El grupo tumor *Grande*: en el cual las gonadotrofinas alcanzan títulos muy elevados, incluyendo el 81.3% de los casos. 2) El grupo tumor *Pequeño*: en el cual las gonadotrofinas no presentaron incremento; dichos tumores son menos frecuentes, y comprenden el 18.7% de los casos.

El grupo *Pequeño* tiene un entorno hormonal completamente diferente al del grupo *Grande*. Aunque en el primero no se detectó incremento de las gonadotrofinas, encontramos tumores positivos con un volumen promedio (Tabla I.2) similar al observado en tumores de dos meses de desarrollo (ver Capítulo II). No está claro si estos tumores no crecieron más debido a la falta de estimulación gonadotrófica, condición inherente a estos animales, o si las gonadotrofinas se encuentran inhibidas por algún factor producido por el propio tumor. Este factor no sería probablemente el estradiol puesto que sus niveles no fueron diferentes de los detectados en los otros grupos. Estos animales, sin embargo, mostraron incrementos en progesterona y PRL. Ambas

hormonas son capaces de inhibir las gonadotrofinas por distintos mecanismos. En determinadas situaciones fisiológicas, altos niveles de PRL inducen un incremento en el recambio de dopamina en el hipotálamo, lo cual a su vez se vio que inhibe las gonadotrofinas (Lux y col. 1988; Lacau-Mengido y col. 1993; McNeilly 1994). Elevados niveles de progesterona, por otro lado, provocan incremento en los niveles de opioides endógenos, como ocurre durante la fase lútea de los ciclos estral o menstrual (Freeman 1994; Hotchkiss y Knobil 1994), y esto último también tiene efectos supresores de gonadotrofinas. Más aún, otros esteroides o péptidos producidos por el tumor, y que no han sido determinados aquí, podrían estar involucrados en la inhibición gonadotrófica en los tumores *Pequeños*. No tenemos evidencias que nos indiquen si el incremento de progesterona en estos animales se origina en el tumor y sobrepasa la capacidad metabólica hepática, o si es secretada por algún otro tejido, como las adrenales (Leavitt y col. 1971; Eldar-Geva y col. 1998). Con respecto al control del crecimiento tumoral se ha observado que incrementos en progesterona inducen secreción de PRL como ocurre durante la pseudopreñez (Deis y Alonso 1985; Freeman 1994) o en la lactancia (Van der Schoot y col. 1978). La PRL tiene un claro efecto luteotrófico en la rata en general (Smith y col. 1975; Freeman 1994) y en estos tumores en particular (Lux y col. 1984), pudiendo ser el factor que mantiene el crecimiento del tumor en ausencia de gonadotrofinas elevadas.

En el grupo tumor *Grande* se puede observar una disociación entre la secreción de LH y FSH cuando se compara con el grupo *Sham*. En los primeros estadios del desarrollo, LH aumenta significativamente desde el primer mes al igual que ocurre en el grupo *Sham*. Sin embargo, FSH recién presentó incrementos significativos a partir del tercer mes. En los animales *Sham* las gonadotrofinas se mantienen elevadas hasta el fin del experimento,

FSH cae significativamente en el sexto mes y subsiguientes, mientras LH sólo cae luego del octavo mes y se mantiene baja hasta el final, en el grupo *Grandes*. Estas diferencias en la secreción de LH y FSH no pueden atribuirse al estradiol dado que sus niveles fueron constantes y similares a aquellos observados en los animales *Sham*, a lo largo del experimento. En nuestro laboratorio y en otros (Uilenbroek y col. 1978; Lux y col. 1984; Lux-Lantos y col. 1995) se ha propuesto que estos tumores podrían estar secretando inhibina, un péptido de origen ovárico que inhibe selectivamente la secreción de FSH (Farnworth y col. 1988; Jakubowiak y col. 1990; Mayo 1994; Stillman y col. 1983; Williams y Lipner 1982); y que podría estar involucrado en las diferencias de gonadotrofinas observadas entre animales con tumor *Grande* y animales *Sham*, y entre las propias gonadotrofinas dentro del grupo tumor *Grande*. Inclusive la inhibina se ha propuesto también como un marcador de tumores ováricos (Lappohn y col. 1992), potenciando aun más la posible importancia del péptido en este tipo de tumores. Aquí mostramos que los niveles de inhibina A y B, en animales portadores del tumor de un mes de desarrollo, estaban notoriamente incrementados con respecto a los niveles hallados en ratas en estro. Este resultado indicaría que un tejido altamente luteinizado como éste, es capaz de secretar dichas hormonas, como también fuera descrito en el cuerpo lúteo humano (Groome y col. 1996; Roberts y col. 1993). El incremento de inhibinas observado en estos animales sugiere que sus niveles podrían ser marcadores de desarrollo del tumor. Este aumento de inhibinas fue observado a un tiempo en que ya se produjo el incremento de LH (mes 1) por encima de los niveles del estro (mes 0) y FSH aún permanece baja, indicando una relación directa y específica entre inhibina y FSH séricos en este momento. A partir del patrón de secreción de FSH, esperaríamos encontrar entonces una posterior disminución de inhibinas, que permitiera el

aumento de FSH (meses 3 a 5); y se podría proponer la hipótesis de que exista un segundo incremento en los niveles de inhibina, que tendría lugar alrededor del sexto mes, induciendo la brusca caída de FSH. Estudios preliminares indicaron que luego de 6 semanas de desarrollo tumoral se produce una disminución significativa de inhibina con respecto a los valores de la cuarta semana, avalando nuestra hipótesis. Futuros estudios permitirán clarificar en mayor detalle la relación mes a mes entre inhibina y FSH. Se ha observado también una disminución en los niveles de LH (mes 8), en ausencia de fluctuaciones de estradiol. La acción de la inhibina sobre la síntesis y secreción de LH no es tan clara como sobre FSH. Algunos estudios han mostrado un efecto inhibitorio sobre los niveles basales de LH (Farnworth y col. 1988; Jakubowiak y col. 1990) otros hallaron un efecto inhibitorio sólo bajo la estimulación de GnRH (Kotsuji y col. 1988), mientras que otros aún, no encontraron efecto alguno (Stillman y col. 1983). En nuestro caso un posible efecto sobre LH estaría de acuerdo con aquellos estudios en los cuales muestran un efecto de inhibina bajo la estimulación con GnRH, puesto que en los animales injertados, al igual que en los animales castrados, el GnRH está constantemente estimulado. Esta hipótesis será también motivo de futuros estudios.

Concluimos que estos tumores ováricos experimentales no afectan el estado general de los animales, ni sufren transformaciones malignas o inducen metástasis. Los tumores crecieron significativamente durante los 12 meses, puesto que su volumen promedio fue aproximadamente seis veces mayor que los tumores de dos meses de desarrollo. Se encuentran dos tipos histológicos (tumores con células de granulosa o células lúteas), los cuales no son distinguibles entre sí por sus patrones hormonales. De hecho, los patrones hormonales se correlacionan con el tamaño tumoral. Los luteomas chicos

tienen bajos niveles de gonadotrofinas, y prolactina y progesterona fluctuantes; mientras que en los luteomas grandes las gonadotrofinas se incrementan a niveles de castración, y PRL y progesterona no presentan variaciones. El retraso en el incremento inicial de los niveles de FSH, y la brusca disminución observada a partir del mes 6 y subsiguientes, en los tumores grandes, sugiere un papel importante de la inhibina en esta regulación, avalada por la correlación entre inhibina y FSH séricas encontrada en las ratas portadoras de tumores de un mes. Estudios futuros permitirán establecer el patrón preciso de síntesis y secreción de inhibina, y determinar su participación en el control del desarrollo de estos luteomas y de la secreción de gonadotrofinas.

Conclusiones

- 1) En los animales portadores de tumor la mortalidad no está comprometida.
- 2) No se observa propagación metastásica al cabo de un año.
- 3) Los tumores crecen a lo largo de su evolución, ya que el volumen alcanzado en un año es 20 veces mayor que el del ovario inicialmente injertado, aun en presencia de gonadotrofinas decrecientes.
- 4) El exámen histológico mostró ausencia de malignización y diferenció a los luteomas en dos grupos:
 - Tumores con predominancia de células lúteas.
 - Tumores con predominancia de células de granulosa.Esta diferencia no determina patrones hormonales distintos.
- 5) Teniendo en cuenta la presencia o ausencia de incremento de gonadotrofinas postimplante, los tumores se dividieron en dos grupos:
 - Animales con gonadotrofinas en niveles postcastración (81% de los casos), desarrollaron tumores *grandes*.
 - Animales que no presentaron aumento de gonadotrofinas (19%), desarrollaron tumores *pequeños*.
- 6) En los tumores pequeños, el crecimiento podría depender de los niveles aumentados de progesterona y prolactina.
- 7) En los tumores grandes se observa una diferencia significativa en los niveles de FSH respecto de los animales sham. Esta inhibición específica se debería a la secreción de inhibina por parte del tumor. La inhibina ha sido postulada como marcador tumoral en el caso de tumores de ovario.



Capítulo II.

Control del crecimiento del luteoma.

Efecto de la buserelina

II.1. Introducción y objetivos

La ovariectomía simple, como en animales sham, es seguida por un incremento en los niveles plasmáticos de FSH y LH, y del contenido hipofisario de sus respectivos mRNAs. En la rata, el contenido hipofisario de mRNA de FSH β comienza a aumentar inmediatamente luego de la OVX, alcanzando los niveles del plateau (4 a 10 veces los valores basales) en 4 días. El incremento en el contenido de mRNA de LH β es menor, alcanzando los valores del plateau luego de 30 días postcastración (10 a 20 veces los valores basales). Cuando un animal castrado recibe una larga exposición al estradiol en dosis suficiente, ocurre una caída en los niveles plasmáticos y contenido hipofisario de FSH y LH, y en los mRNAs hipofisarios correspondientes, en concordancia con la retroalimentación negativa ejercida por el estradiol, sobre hipotálamo e hipófisis (Rotten 1993).

En el capítulo anterior se demostró que durante el desarrollo tumoral, la mayoría de los luteomas experimentales cursan con gonadotrofinas elevadas, por un período de tiempo prolongado, demostrando la inactivación hepática de los esteroides secretados por el tumor y por ende, la pérdida de la retroalimentación negativa. Anteriormente se observó que la hipofisectomía favorece la involución de tumores ováricos intraesplénicos (Fels y Foglia 1960), sugiriendo una dependencia de las gonadotrofinas para su crecimiento y desarrollo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este capítulo se implementó una estrategia sencilla, poco invasora y no tóxica para intentar suprimir o inhibir el desarrollo tumoral, además de precisar la dependencia de los luteomas de las gonadotrofinas, tanto para su crecimiento y desarrollo inicial, como para su mantenimiento posterior. Para ello se decidió administrar un análogo de

GnRH. El tratamiento crónico con GnRH, provoca un primer efecto estimulador, aunque transitorio, y luego induce la desensibilización de los receptores de GnRH hipofisarios, provocando una marcada y constante disminución de las gonadotropinas circulantes. El GnRH sufre una rápida degradación en riñón, hígado y suero, siendo esta la principal razón para el uso de análogos agonistas de GnRH, quienes muestran mayor resistencia a la degradación enzimática (Koch y col. 1977). Por consiguiente, empleamos en nuestros estudios un agonista de GnRH de larga duración: [D-Ser(-tBu)⁶-des-Gly-NH₂¹⁰]-GnRH-N-etilamida (Buserelina, Hoechst, Buenos Aires).

Se evaluó el efecto del tratamiento prolongado con buserelina, en dos situaciones experimentales:

- a) En un primer grupo de experimentos (MODELO 1), se inició el tratamiento simultáneamente con el injerto ovárico en el bazo, para determinar la posibilidad de desarrollo del luteoma en presencia del análogo de GnRH.
- b) En otro grupo de experimentos (MODELO 2), el inicio del tratamiento se realizó en animales portadores del injerto de un mes de desarrollo. Este modelo permitió evaluar la capacidad del análogo de inhibir el crecimiento de un tumor ya instalado.

II.2. Materiales y Métodos

II.2.1. Animales

Se emplearon ratas portadoras del luteoma y ratas sham. Ambos lotes fueron subdivididos inicialmente en dos grupos, MODELO 1 y MODELO 2.

II.2.2. Modelo 1: Tratamientos farmacológicos iniciados el día del injerto ovárico

El día de la operación los animales con el implante ovárico fueron divididos en tres grupos. a) Un grupo recibió inyecciones semanales de solución salina y fue empleado como control (SAL). b) Otro grupo recibió un pellet subcutáneo de Buserelin Implant de larga duración (GnRH-a), análogo sintético del GnRH (donado por Hoechst Buenos Aires, 0.33 mg/rata). c) Al tercer grupo se le administró valerianato de estradiol (Schering Buenos Aires, 50 µg/rata sc.), en total tres inyecciones con intervalo de una semana (E₂-VAL). Finalmente, un grupo control fue sometido a operación ficticia (SHAM).

Se tomaron muestras de sangre yugular de todos los animales, el día de la operación (día 1). El mismo día se obtuvo también muestra de sangre portal hepática por laparatomía exploratoria. El día 15 se obtuvieron muestras de sangre yugular bajo ligera anestesia con éter. El día 30 se tomaron muestras de sangre portal por laparatomía bajo anestesia etérea; se sacrificaron los animales por decapitación y se recolectó sangre troncal. Los luteomas fueron inspeccionados y medidos en sus dos diámetros mayores mediante un calibre.

II.2.3. Modelo 2: Tratamientos farmacológicos iniciados al mes del injerto ovárico

Los animales fueron operados como se describió, obteniéndose un grupo con tumor y un grupo sham; ambos se dejaron recuperar un mes. En la mañana del día 30 los animales fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg de peso

corporal, ip). Se tomaron muestras de sangre yugular y portal y midió el luteoma. Los animales con el implante fueron divididos en tres grupos, como en el MODELO 1: a) un grupo control recibió inyecciones de solución salina una vez por semana (SAL); b) a otro grupo se le administró un pellet subcutáneo de busarelina (0.33 mg/rata) (GnRH-a); y c) el ultimo grupo fue inyectado semanalmente con valerianato de estradiol (50 µg/rata sc) (E₂-VAL).

Nuevas muestras de sangre yugular se recolectaron bajo anestesia con éter, los días 40 y 50. Al finalizar el experimento el día 60, bajo anestesia con éter, se realizó una laparotomía exploratoria y se tomó muestras de sangre portal. Finalmente, los animales fueron decapitados, se recolectó sangre troncal y los luteomas se inspeccionaron y midieron.

En todos los casos se conservaron las muestras de suero (-20°C) para la determinación de los niveles de LH, FSH, E₂ y P. Como se inyectó valerianato de estradiol en un grupo de animales, se lo ensayó en el RIA de estradiol, sin encontrarse reacción cruzada.

Mediante la fórmula matemática empleada en el capítulo anterior, se determinó el volumen de la masa tumoral a partir de las mediciones realizadas.

II.2.4. Análisis Estadísticos

Los resultados están expresados como la media ± ES de niveles hormonales o volumen tumoral. Las diferencias de los promedios de los distintos grupos en un determinado día fueron estudiadas por análisis de varianza seguido del test de Duncan, $p < 0.05$ fue considerado significativo. Cuando se analizaron diferencias entre dos días distintos dentro del mismo grupo se empleó el test de Student para muestras apareadas.

Las diferencias en los porcentajes se analizaron por el test de comparación de dos proporciones (Lison 1976).

II.3. Resultados

II.3.1. Modelo 1: Crecimiento de los luteomas y variaciones de los niveles hormonales séricos en animales portadores de tumores con o sin tratamiento

Se analizó el porcentaje de tumores positivos en los animales injertados. Mientras que 20/20 (100%) de los animales injertados y tratados con salina desarrollaron luteomas, sólo se observó desarrollo tumoral en 6/14 (43%) de los animales injertados y tratados con el análogo de GnRH y en 10/12 (83%) de los injertados y tratados con estradiol. La inhibición de desarrollo tumoral inducida por GnRH fue altamente significativa ($p < 0.01$) (Fig. II.1, panel izquierdo). Cuando se analizó el volumen de los tumores desarrollados, se observó una disminución significativa del volumen medio en los animales que habían sido tratados con GnRH ó estradiol con respecto al grupo tratado con salina ($p < 0.01$) (Fig. II.1, panel derecho).

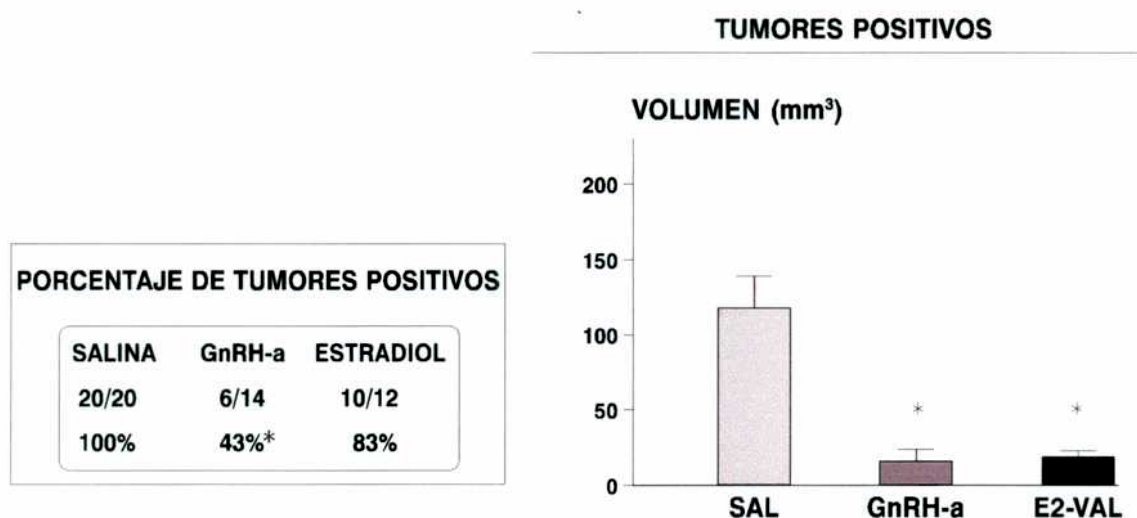


Figura II.1. MODELO 1: Porcentaje de tumores positivos (positivos/total) (panel izquierdo) desarrollados en animales con injerto ovárico luego de un mes de tratamiento con salina, GnRH-a o valerianato de estradiol. *: significativamente distinto de animales tratados con salina y estradiol. Volumen de tumores positivos (mm³) al mes de tratamiento (panel derecho) en los tres grupos anteriores. Los datos corresponden a la media \pm ES. *: significativamente distinto de animales inyectados con salina. Para esta y las siguientes figuras: SAL: tumor-salina, GnRH-a: tumor-análogo de GnRH, E₂-VAL: tumor-valerianato de estradiol, *: $p < 0.05$ o menor.

Los niveles de gonadotropinas diferían significativamente entre los distintos grupos a lo largo del experimento. En los animales con operación ficticia se observó la típica hipergonadotrofinemia postcastración. La LH también aumentó en los animales injertados tratados con salina, si bien los niveles de esta hormona no alcanzaron los de los animales Sham ($p < 0.05$). En las ratas tratadas con GnRH se observó un pequeño aumento de LH pero significativamente inferior al determinado en los animales Sham o tratados con salina ($p < 0.05$). En los animales inyectados con estradiol la LH permaneció en niveles basales durante todo el experimento (Fig. II.2, panel izquierdo).

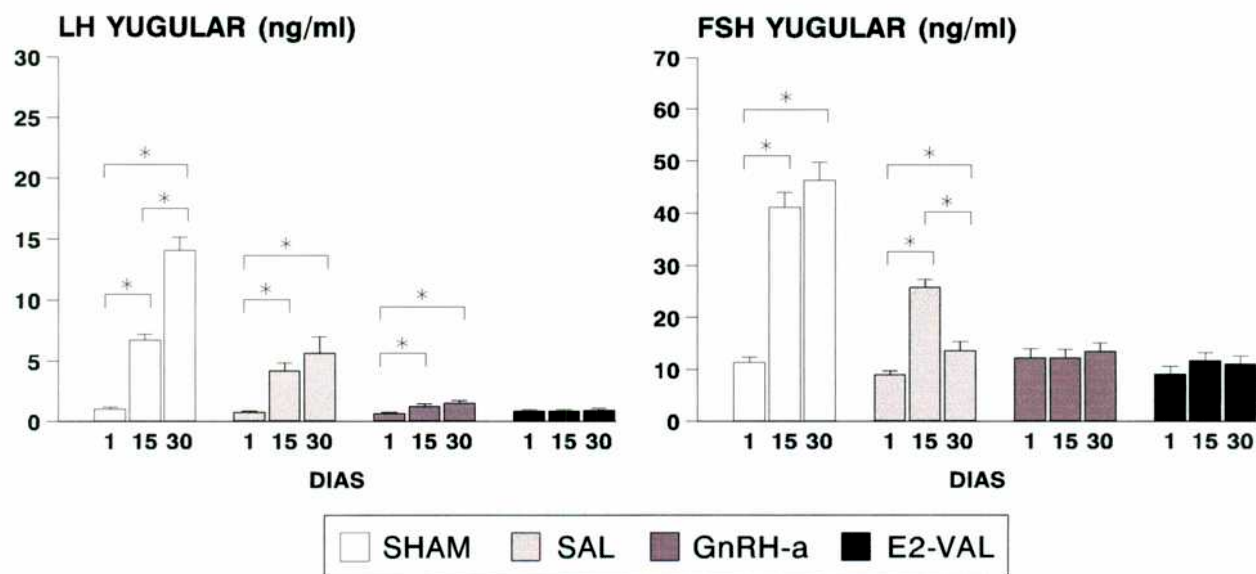


Figura II.2. MODELO 1: Cambios en la concentración de LH sérica (panel izquierdo) en animales portadores de tumor tratados con salina, GnRH-a o valerianato de E₂ y ratas Sham. Se realizó ANOVA de un factor para comparar medias de los grupos para cada día ($p < 0.05$ o menor): Día 1: sin diferencias significativas. Días 15 y 30: niveles de Sham significativamente distinto de SAL, GnRH-a y E₂-VAL. Niveles de SAL distintos de GnRH-a o E₂-VAL. Cambios en los niveles de FSH séricos (panel derecho) en los mismos grupos. Día 1: Sin diferencias significativas (ANOVA). Día 15: Valores Sham diferentes significativamente de los tres grupos tumor. SAL diferente de GnRH-a o E₂-VAL. Día 30: Sham significativamente distinto de los grupos tumor.

Con respecto a FSH, mientras que en los animales Sham, se observó aumento a lo largo del experimento, en los animales tratados con salina se produjo un

incremento el día 15 y luego una caída significativa el día 30 ($p < 0.01$). En los animales tratados con GnRH o estradiol los niveles de FSH no sufrieron variaciones (Fig. II.2, panel derecho).

Con respecto a las hormonas esteroideas, no se observaron diferencias en los niveles de estradiol de la circulación sistémica en los distintos grupos. Sin embargo en el suero portal hepático los niveles de estradiol cayeron significativamente entre los días 1 y 30 en los animales tratados con el análogo de GnRH y en los animales Sham ($p < 0.05$) mientras que no hubo variaciones en el estradiol portal del grupo de los tumores control (SAL), ni en los animales tratados con E₂-VAL, a estos tiempos (Fig. II.3, panel izquierdo).

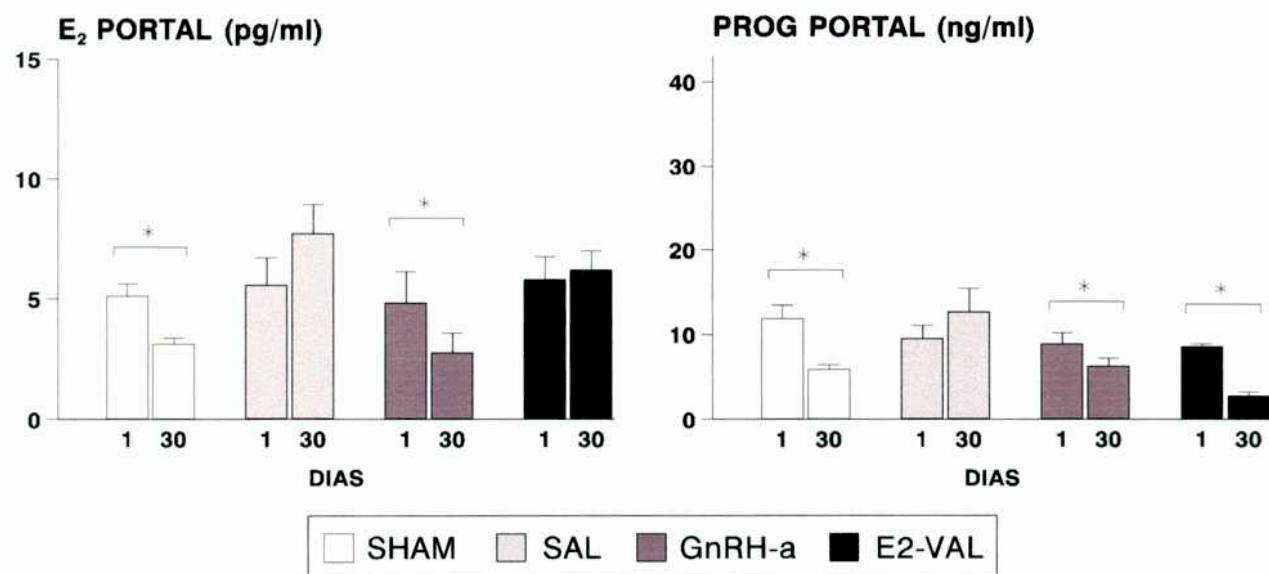


Figura II.3. MODELO 1: Niveles de estradiol en suero portal (panel izquierdo) en animales portadores de tumor y Sham. Día 1: sin diferencias significativas (ANOVA). Día 30: niveles de Sham y GnRH-a significativamente distintos de SAL o E₂-VAL. Niveles de progesterona en suero portal (panel derecho) en los mismos grupos. Día 1: Sin diferencias significativas (ANOVA). Día 30: Niveles de SAL significativamente distintos de Sham, GnRH-a o E₂-VAL.

En la circulación general no se observaron variaciones en la progesterona sérica en ninguno de los grupos estudiados; en suero portal, la progesterona disminuyó significativamente en los animales Sham y en los tratados con el

análogo de GnRH ó estradiol ($p < 0.01$). La progesterona no sufrió variaciones en los animales injertados tratados con salina (Fig. II.3, panel derecho).

II.3.2. Modelo 2: Crecimiento de los luteomas y variaciones de los niveles hormonales séricos en animales portadores de tumor con o sin tratamiento

En los animales en los que se dejó desarrollar el tumor durante un mes antes de comenzar los tratamientos, se comprobó el día 30, bajo laparatomía, un desarrollo tumoral similar en los distintos grupos. En los animales controles no se observaron diferencias en el volumen tumoral entre los días 30 y 60, mientras que tanto el tratamiento con el análogo de GnRH o con estradiol indujo una significativa inhibición del crecimiento tumoral (disminución de volumen en porcentaje de 52% y 39% respectivamente, $p < 0.02$) (Fig. II.4).

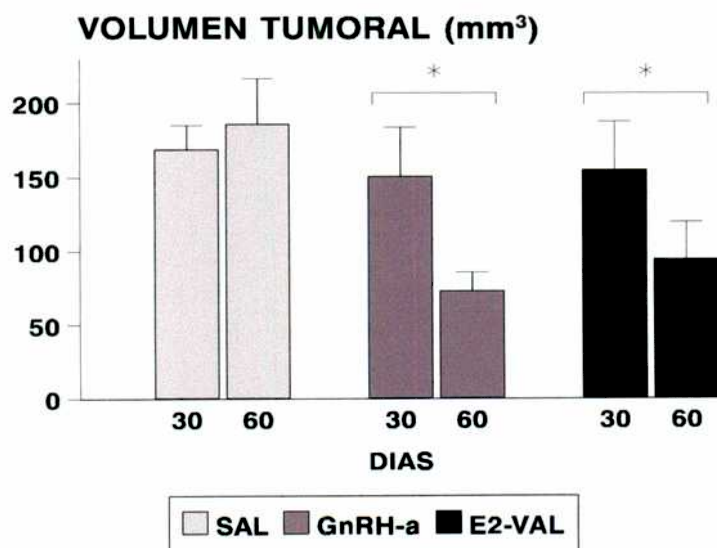


Figura II.4. MODELO 2: Volumen tumoral (mm³) medido luego de 30 y 60 días de desarrollo en animales portadores de tumor tratados con salina, GnRH-a o estradiol a partir del día 30. Día 30: Sin diferencias significativas (ANOVA). Día 60: SAL significativamente distinto de GnRH-a y E₂-VAL.

En estos grupos de animales se observaron distintos perfiles hormonales. En los animales Sham la LH aumentó significativamente entre los días 30 y 60. Un incremento similar se cuantificó en los animales injertados tratados con

salina, aunque los niveles iniciales eran significativamente inferiores a los encontrados en los animales Sham ($p < 0.03$). En los animales injertados y tratados con el análogo de GnRH ó estradiol la LH sufrió una inhibición significativa ($p < 0.01$) (Fig. II.5, panel izquierdo). Resultados similares se observaron con FSH. En los animales Sham FSH aumentó significativamente durante este período ($p < 0.01$). Los niveles de FSH, aunque elevados, fueron significativamente menores en los animales control (SAL) que en los Sham ($p < 0.01$). En las ratas portadoras de tumor y tratadas con el análogo de GnRH ó con estradiol, FSH cayó significativamente entre los días 30 y 60 ($p < 0.05$) (Fig. II.5, panel derecho).

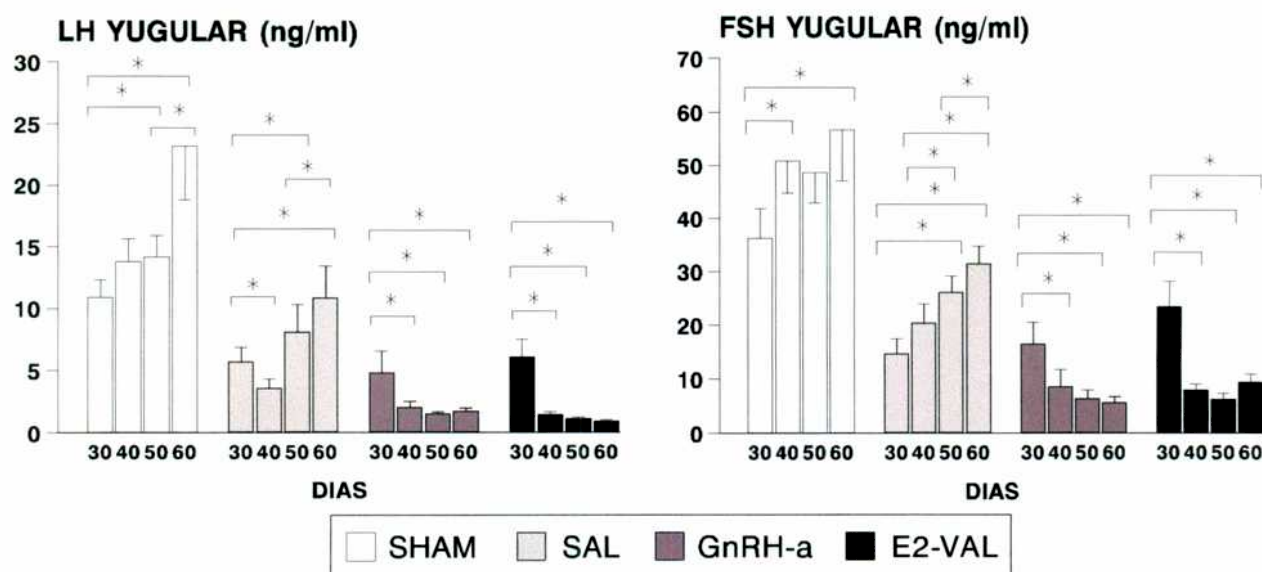


Figura II.5. MODELO 2: Cambios en los niveles de LH sérica (panel izquierdo) en animales portadores de tumor tratados con salina, GnRH-a o valerianato de estradiol y ratas Sham. Días 30 y 40: niveles de Sham significativamente distintos de los grupos tumor (ANOVA). Días 50 y 60: niveles de Sham significativamente distintos de los grupos tumor. Niveles de SAL distintos de GnRH-a o E₂-VAL.

Cambios en los niveles de FSH séricos (panel derecho) en los mismos grupos. Día 30: valores Sham significativamente diferentes de SAL y GnRH-a (ANOVA). Día 40: Sham significativamente distinto de los grupos portadores. Días 50 y 60: niveles de Sham significativamente distintos de los grupos portadores. SAL diferente de GnRH-a o E₂-VAL.

La secreción de hormonas esteroideas también fue característica de cada grupo. En la circulación portal los niveles de estradiol no variaron en los animales Sham ni en los inyectados con salina ó estradiol. Las ratas tratadas con el análogo de GnRH mostraron una caída significativa en los niveles de estradiol entre los días 30 y 60 a este nivel ($p < 0.01$) (Fig. II.6, panel izquierdo). Los niveles de progesterona portal disminuyeron significativamente en el grupo tratado con el análogo ($p < 0.05$) (Fig. II.6, panel derecho).

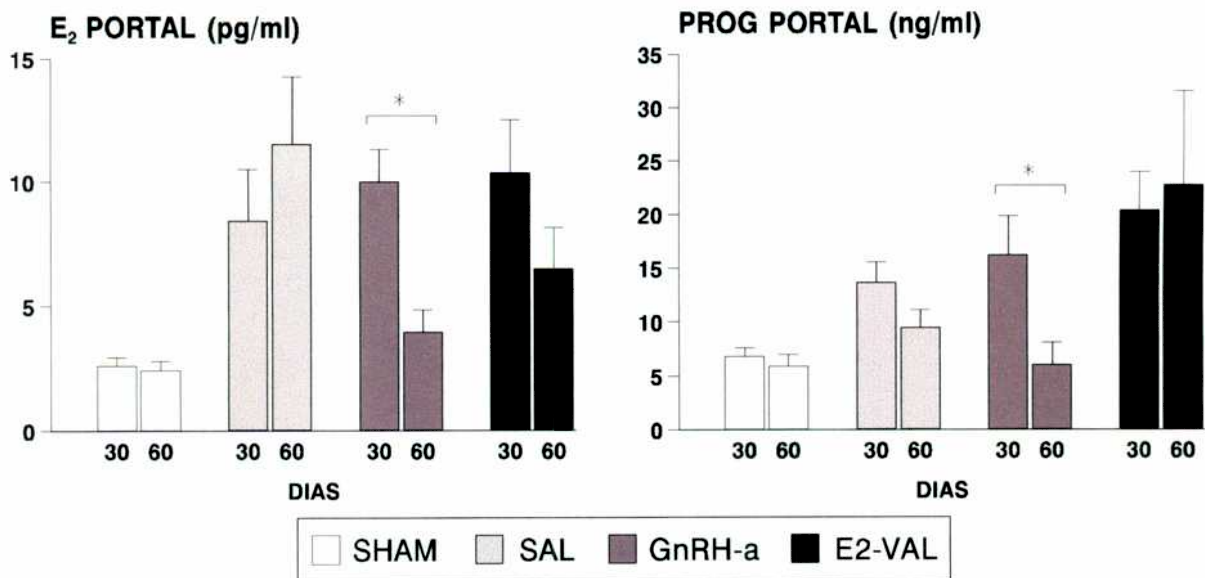


Figura II.6. MODELO 2: Niveles de estradiol en suero portal (panel izquierdo) en animales portadores de tumor y Sham. Día 30: niveles de Sham significativamente diferentes de GnRH-a o E₂-VAL (ANOVA). Día 60: niveles de SAL significativamente distintos de Sham y GnRH-a. Niveles de progesterona en suero portal (panel derecho) en los mismos grupos. Día 30: niveles de Sham significativamente diferentes de E₂-VAL (ANOVA). Día 60: E₂-VAL significativamente distintos de Sham, SAL o GnRH-a.

II.4. Discusión

Trabajos previos habían indicado que la hipofisectomía o el tratamiento intensivo con estrógenos, eran capaces de producir la involución del tumor (Fels y Foglia 1960). En este capítulo se ampliaron y profundizaron los mecanismos neuroendocrinos involucrados.

El tratamiento de estos tumores con estradiol inhibe su desarrollo o induce su regresión si este ya se encontraba formado, debido al bloqueo ejercido sobre la secreción de LH y FSH. Por esta razón en nuestros estudios empleamos valerianato de estradiol como control de regresión tumoral.

Estos experimentos muestran claramente que la administración de un agonista de GnRH de larga duración o de valerianato de estradiol, inhiben el desarrollo del luteoma cuando son administrados en forma simultánea al injerto ovárico. Es interesante destacar que mientras ambos tratamientos inhiben el volumen tumoral, sólo el GnRH-a inhibe significativamente el porcentaje de tumores positivos. Esta diferencia podría deberse a una acción directa sobre el tumor ejercida por el GnRH-a además de su acción a nivel hipofisario. Ambos tratamientos reducen significativamente el volumen tumoral cuando son administrados luego de 30 días de desarrollo del luteoma. Aunque la patogénesis y el tratamiento de tumores hormonalmente activos ó de carcinomas de ovarios pueden ser diferentes, los resultados observados con el GnRH-a en estos tumores experimentales están de acuerdo con datos provenientes de una gran variedad de tumores de ovario tratados con análogos de GnRH. Como ejemplo podemos mencionar el tratamiento con agonistas de GnRH de carcinomas ováricos humanos heterotransplantados en ratón, en los cuales el crecimiento del tumor se redujo significativamente (Peterson y Zimniski 1990; Mortel y col. 1986; Yano y col. 1994). El tratamiento con GnRH también previene el crecimiento de otros tumores experimentales en animales

(Kullander y col. 1987; Pour y col. 1988) y algunos resultados positivos fueron observados en pacientes con carcinoma ovárico (Emons y col. 1990; Parmar y col. 1988a; Parmar y col. 1988b; Bruckner y Motwani 1989).

Los niveles hormonales se vieron también afectados por la administración de GnRH-a o de valerianato de estradiol. Ambos tratamientos disminuyeron efectivamente los niveles de LH y FSH o inhibieron su incremento cuando se los compara con los animales portadores de tumor sin tratamiento, empleados como control. La acción del análogo como supresor de la secreción de gonadotrofinas se encuentra ampliamente confirmada por estos resultados.

Los niveles de LH en los animales control portadores de luteoma, a pesar de incrementar con el tiempo, son significativamente menores que aquellos observados en los animales Sham en el Modelo 1. Esta diferencia podría estar sugiriendo cierto escape de estradiol, u otra molécula, de la inactivación hepática pudiendo de alguna manera inhibir la secreción de LH. No se han encontrado cambios significativas en los niveles de estradiol sistémico en este grupo y el crecimiento tumoral no se vio afectado. Se puede postular también que el tumor podría estar secretando algún otro factor que indujera dicho efecto. Con respecto a FSH, se determinó un incremento inicial en los animales portadores de tumor del Modelo 1 en el día 15, disminuyendo significativamente los niveles de esta hormona en el día 30. Esta caída en los niveles de FSH pone en evidencia la secreción de inhibina por el luteoma que suprimiendo específicamente la secreción de FSH, coincidiendo con los resultados presentados en el capítulo anterior. Trabajos anteriores han propuesto la existencia de un péptido de esta naturaleza en estos luteomas (Clark y Holder 1984). La inhibina ha sido postulada también como marcador para determinados tumores ováricos (Lappohn y col. 1992). Por lo tanto la participación de la inhibina en el desarrollo tumoral y los mecanismos que

regulan su secreción serían de gran importancia para un mayor conocimiento de estos tumores endocrinamente activos.

En ambos modelos el tratamiento con el GnRH-a disminuyó significativamente los niveles de progesterona y estradiol en sangre portal, donde son detectados los esteroides de origen tumoral. Dicho efecto sería indirecto, a través de la inhibición gonadotrófica inducida por el análogo, que lleva a su vez a la disminución del trofismo y la secreción esteroidea del tumor. Sin embargo, también se podría postular un efecto directo del GnRH sobre el tumor, dado que se ha demostrado en el ovario normal la presencia tanto del péptido como de sus receptores. Un posible efecto directo sobre el tumor estaría de acuerdo con datos de la literatura en los que se propone que el GnRH podría tener un papel autocrino regulatorio y terapéutico en la incidencia y desarrollo de carcinomas ováricos (Ohno y col. 1993; Yano y col. 1994). La evaluación de esta hipótesis será motivo de los siguientes estudios (Capítulo III).

En conclusión, estos resultados demuestran que el análogo de GnRH induce en forma manifiesta la inhibición del desarrollo del tumor o la regresión tumoral, según el momento de administración. Este tratamiento lleva también a una supresión de la secreción hormonal esteroidea por parte del luteoma. El importante efecto que demostró este fármaco sobre el desarrollo de este tumor experimental de ovario sugiere un potencial uso de este tipo de tratamiento en tumores de ovario hormono-dependientes.

Conclusiones

En animales portadores de luteoma la administración crónica de un análogo de GnRH mostró un claro efecto antitumoral:

- 1) redujo la incidencia de tumores positivos en un 57%.
- 2) provocó una reducción del volumen tumoral del 52%.
- 3) tuvo mayor eficiencia que el valerianato de estradiol en sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento.



Capítulo III.

Efectos directos de la buserelina
sobre los luteomas experimentales.

Estudios *in vitro*

III. 1. Introducción y objetivos

En el capítulo anterior estudiamos el desarrollo y la capacidad secretora de los tumores ováricos experimentales en el animal entero, demostrando que el tratamiento crónico con buserelina inhibe significativamente ambos parámetros. El tratamiento es muy efectivo, tanto si se lo comienza al mismo tiempo en que se injerta el ovario en el bazo, como si se lo inicia luego de un mes de desarrollo del tumor. Este tratamiento crónico con GnRHa actúa sobre la hipófisis desensibilizando sus receptores y suprimiendo la secreción de gonadotrofinas. El bloqueo de las gonadotrofinas sería el mecanismo principal por el cual la buserelina inhibiría el desarrollo tumoral. Sin embargo, a pesar de que la supresión de gonadotrofinas fue mayor con el valerianato de estradiol, la buserelina demostró un mayor poder inhibitorio sobre el crecimiento del tumor, sugiriendo que el análogo pudiera tener efectos adicionales directamente sobre el tumor.

Se ha demostrado que el GnRH tiene acciones extrahipofisarias. Se han postulado acciones importantes del GnRH en la regulación del ovario (Hsueh y Jones 1981; Stojilkovic y col. 1994), participando en variadas funciones autocrinas o paracrinas. Un efecto ovárico directo del GnRH fue demostrado por Rippel y Johnson (1976), quien observó una disminución en el peso del ovario incrementado por hCG, en ratas inmaduras hipofisectomizadas tratadas con GnRH. Estudios *in vitro* demostraron efectos inhibitorios directos del GnRH sobre células de la granulosa en cultivos primarios. Siendo los principales efectos la regulación de la síntesis y secreción de hormonas esteroideas (Hsueh y Erickson 1979), suprimiendo la esteroidogénesis estimulada por FSH. También participa en la regulación de los niveles de receptores de gonadotrofinas y PRL (Hsueh y Jones 1981). La inhibición por el GnRH puede ser bloqueada por el tratamiento con antagonistas de GnRH

(Hsueh y Jones 1981). Los efectos inhibitorios sobre la actividad ovárica incluyen también la síntesis y secreción de inhibina, regulando los niveles del mRNA de las subunidades α y β_A (Rivier y Vale 1989).

La acción inhibitoria del GnRH se ejerce también en otros compartimentos ováricos, por ejemplo inhibiendo la síntesis de andrógenos basal y la estimulada por LH en células intersticiales ováricas. En células lúteas de rata, el tratamiento con el agonista de GnRH, busarelina, inhibe la secreción de progesterona estimulada por LH/hCG, tanto *in vitro* (en períodos cortos de incubación), como *in vivo*. Además, desensibiliza los receptores de LH en cultivos primarios al cabo de 24 horas de estímulo.

Se han observado también efectos estimulatorios del GnRH sobre otras actividades ováricas. Por ejemplo es capaz de estimular la producción de progesterona y prostaglandinas (Clark y col. 1980), la maduración del ovocito y la ovulación (Hillensjö y LeMaire 1980), y también la actividad de la fosfodiesterasa y la 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Los mecanismos a través de los cuales el GnRH ejerce sus múltiples acciones en ovario son complicados y podrían estar mediados por diversas vías. Sin embargo, no interfiere directamente en la unión de las gonadotrofinas a sus receptores en las células ováricas. Las acciones del GnRH estarían mediadas por sitios de unión específicos presentes en las células lúteas y de granulosa, mostrando una especificidad y afinidad por GnRH y sus análogos, similar a los receptores hipofisarios para GnRH.

Es poco probable que el GnRH hipotalámico alcance el ovario en concentraciones fisiológicamente activas, por la dilución que sufre en circulación y su rápida degradación en la hipófisis, cerebro, hígado, riñones, y suero (Tsafriri y Adashi 1994). Se ha descrito en el ovario el sistema completo de GnRH, con la presencia de un péptido GnRH-símil y de su receptor (Pieper

y col. 1981; Goubau y col. 1992; Aten y col. 1987; Clayton y col. 1979; Hazum y Nimrod 1982; Peng y col. 1994; Olofsson y col. 1995; Whitelaw y col. 1995). En general, los efectos inhibitorios del GnRH sobre tejido ovárico, permitirían suponer un papel para el péptido GnRH-símil gonadal en la regulación del desarrollo folicular y la selección del folículo como una señal fisiológica de atresia. Las acciones inhibitorias de GnRH en células lúteas son muy similares a las de $\text{PGF}_{2\alpha}$, quien actúa como un factor luteolítico natural (Williams y Behrman 1983). Tanto GnRH como $\text{PGF}_{2\alpha}$ provocan un incremento rápido y marcado del ácido fosfatídico y fosfatidil inositol en cultivo de células lúteas de rata. Es posible por lo tanto que el GnRH ovárico tenga un papel fisiológico en la regulación de la función del cuerpo lúteo.

También en tumores ováricos humanos se han descrito receptores de GnRH. Imai y col. (1994) detectaron sitios de unión de alta afinidad y mRNA del receptor de GnRH en gran proporción (>90%) de carcinomas epiteliales y tumores de estroma de ovarios humanos. La expresión del receptor permite suponer que el GnRH tendría un papel regulatorio directo sobre el crecimiento de dichos tumores. Agonistas de GnRH fueron empleados en la terapia del cáncer ovárico, con una tasa de respuesta del 15%. Esta modesta respuesta puede deberse en parte al hecho de que la terapia fue siempre iniciada como último recurso, y sobre bases empíricas, luego de que fallaran otras terapias. Estudios en animales podrán ayudar a clarificar el papel terapéutico y el mecanismo de acción de agonistas de GnRH en tratamientos de tumores ováricos, siendo de gran interés por tratarse de una terapia poco invasiva y *no tóxica*.

El siguiente grupo de experimentos se diseñó para evaluar si los tumores intraesplénicos de ovario poseen receptores de GnRH. Se estudió

comparativamente la presencia de los receptores en los ovarios de animales en
estro, siendo esa la condición inicial de los luteomas.

En estudios *in vitro* se buscó establecer los posibles efectos directos del
análogo de GnRH (buserelina) sobre la secreción tumoral.

III.2. Materiales y Métodos

III.2.1. Animales

Para receptores de GnRH: se emplearon animales portadores de luteoma. Un grupo de estos animales se sacrificó a los 60 días sin previo tratamiento. Otro grupo recibió un pellet de buserelina (0.33 mg/rata) al mes de desarrollo tumoral y se sacrificó 30 días después (día 60). Se emplearon como control ratas en la mañana del estro, cuyos ovarios presentan cuerpos lúteos frescos.

Para incubaciones de órgano: se emplearon animales portadores de luteoma de 4-6 semanas y ratas en la mañana del estro como control.

Para cultivo primario de células: se emplearon animales portadores de luteoma de 4-6 semanas. Como control se utilizaron ratas de 23-25 días de edad (prepúberes) superovuladas mediante el tratamiento con 25 UI PMSG (Novormon, Syntex, Buenos Aires) y 25 UI hCG (Endocorion, Elea, Buenos Aires) 48 hs mas tarde; se emplearon 5 días después de la inyección con hCG, dado que luego del tratamiento sus ovarios son una fuente de tejido muy luteinizado (grupo SPO).

III.2.2. Estudio de receptores de GnRH

III.2.2.1 Preparación de Buserelina marcada con [¹²⁵I]

La buserelina, análogo de GnRH, se empleó como trazador radioactivo y como hormona fría en los ensayos de unión. GnRH-a fue iodinado de acuerdo al método de cloramina-T (Clayton y Catt 1981). Brevemente, 2 µg de GnRH-a fueron iodinados en presencia de 2 mCi [¹²⁵I] (NEN) y 0.2 µg de cloramina-T. Se deja reaccionar durante 2 minutos, al cabo de los cuales se repite la operación. La reacción fue detenida por transferencia a una columna de carboximetil celulosa y separación del análogo marcado del yodo libre

mediante cromatografía de intercambio iónico. Se utilizaron soluciones de acetato de amonio 0.002 y 0.060 M para eluir el yodo libre y el análogo marcado, respectivamente. Éste último fue almacenado a 4°C en el mismo buffer y utilizado en un lapso no mayor de tres semanas de preparado. La actividad específica se determinó por autodesplazamiento usando una fracción cruda de membranas de varias hipófisis, siendo de 400-800 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ según las marcaciones. La máxima capacidad de unión, determinada con cantidades crecientes de membrana fue del orden del 40-65%. Los resultados fueron corregidos por MCU.

III.2.2.2 Receptores de GnRH en hipófisis y ovarios

Los animales portadores de tumor, con o sin tratamiento de busserelina y las ratas en estro utilizadas como control se sacrificaron por decapitación, se extrajeron rápidamente los tejidos y se conservaron a -70°C. Las hipófisis, ovarios y luteomas fueron descongelados y homogeneizados con Ultraturrax en 400 μl de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7.6, a 4°C (Marchetti y Labrie 1982). Los homogenatos fueron preparados en el momento de ser ensayados. Para la medición de receptores hipofisarios se utilizaron directamente los homogenatos dada la alta concentración de receptores en este tejido.

Los homogenatos de ovarios y luteomas fueron centrifugados 5 min a 2000 rpm y se descartaron los precipitados. Los sobrenadantes se centrifugaron 15 min a 11.000 rpm. Los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en buffer y filtrados por Nytex, para obtener la fracción de membranas.

En los análisis de Scatchard, las membranas ováricas de un pool de 3 ovarios o luteomas (dilución final 2 mg de tejido/300 μl de ensayo (Tris-HCl 10 mM, BSA 0.1% (Sigma), ditiotreitól 1 mM (Sigma), pH 7.6), se incubaron en presencia de concentraciones crecientes del análogo marcado (5000-120.000 cpm/100 μl) en un volumen total de 500 μl . Asimismo, se realizaron

incubaciones paralelas (para cada concentración del análogo marcado) conteniendo 2×10^{-7} M de GnRH-a no marcado para la determinación de la unión inespecífica. En todos los casos se incubó por 120 min en hielo, deteniéndose la reacción por centrifugación a 13.000 rpm en microcentrífuga durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y se midió inmediatamente la radioactividad presente en los precipitados en un espectrómetro γ Hewlett-Packard (eficiencia: 73%). La unión específica fue expresada en fmol/mg de tejido.

En los ensayos de saturación, los homogenatos de una hipófisis o las membranas de un ovario o un luteoma, se emplearon para preparar 5 tubos de incubación (tres para puntos máximos y dos para unión inespecífica). Cada tubo contenía aproximadamente 1 mg de tejido (para hipófisis) o 2 mg de tejido (para tejidos ováricos) en 300 μ l de buffer. Los homogenatos fueron incubados con 100 μ l de [125 I]-GnRH-a ($5-8 \times 10^4$ cpm) en un volumen total de 500 μ l. Las concentraciones del ligando fueron subsaturantes, representando aproximadamente el 85% de los sitios receptores. La unión inespecífica medida por agregado de 1×10^{-6} M de GnRH-a no marcado (concentración final en el tubo: 2×10^{-7} M), fue de un 5-8% del trazador iodinado total.

III.2.3. Incubaciones de órganos

Ratas portadoras del implante ovárico y ratas en estro fueron decapitadas y se extrajeron y pesaron el tejido tumoral y los ovarios respectivamente. Siendo los tumores de mayor tamaño que los ovarios en estro se dividió cada uno de ellos en dos para obtener un peso por vial de incubación similar en ambos tejidos y permitir mayor similitud en el grado de difusión a/de los tejidos. Los luteomas y ovarios se incubaron en viales individuales con 4 ml de Medio 199 (Sigma), HEPES 25 mM (Sigma) y BSA 0.1% (Sigma). Los experimentos se realizaron en

un baño a 37°C con atmósfera controlada (5% CO₂/ 95% O₂) y agitación constante. Luego de un período de preincubación de 30 min, se descartó el medio y los tejidos se lavaron con 1 ml de medio fresco, que fue descartado también. Las glándulas fueron incubadas durante 3 horas en medio fresco (4 ml) en ausencia (control) o en presencia de buserelina (1×10⁻⁷ M). Se tomó una alícuota de cada vial a 1.5 y 3 horas de incubación. El volumen retirado en el tiempo 1.5 h se repuso (con o sin buserelina 1×10⁻⁷ M, según correspondiera). De cada rata en estro se empleó un ovario como control y el contralateral, elegidos al azar, se incubó en presencia de buserelina. En el caso de los luteomas una mitad fue usada como control y la otra se incubó en presencia del GnRH-a. Las muestras de medio de incubación se conservaron a -20°C para la determinación posterior de estradiol, progesterona y testosterona por RIA. Los resultados para todas las hormonas fueron expresados como pg/mg de tejido.

III.2.4. Estudios histológicos

Los cortes y la tinción de los luteomas de 4-6 semanas y de ovarios de hembras superovuladas con PMSG y hCG, se realizaron como fuera descrito anteriormente.

III.2.5. Cultivos celulares

La técnica de cultivo empleada para los luteomas es la misma que la desarrollada para la obtención de células lúteas provenientes de ratas prepúberes superovuladas usadas como control del experimento (Guerrero y col. 1994; Saragüeta y col. 1989). El día de la obtención de células se sacrificaron los animales y se extrajeron rápidamente los luteomas y los ovarios de hembras superovuladas, colocándolos en placas de Petri estériles conteniendo 1 ml de medio DMEM-F12 (1:1 v/v), con HEPES 10 mM (*medio 1*).

Se limpiaron los luteomas eliminando restos de bazo. Se liberaron los ovarios del oviducto y de la grasa circundante. Ambos tejidos (luteomas y SPO, respectivamente) se cortaron en secciones menores de 1 mm. La digestión enzimática se realizó en 1 ml/60 mg de tejido del *medio 1* con colagenasa (0.1%), BSA 0.1% y DNAsa (0.008%). Se incubaron los tejidos durante 15 min. a 37°C con atmósfera controlada. La suspensión obtenida fue filtrada a través de una malla de nytex y centrifugada a 250g por 10 min. El precipitado se lavó dos veces con *medio 1* y se resuspendió luego en DMEM-F12 (1:1) con 2.2 g/l HCO₃⁻, 0.1% BSA, pH 7.4 (*medio 2*). Se sembraron aproximadamente 500.000 células por pocillo en 1 ml de *medio 2*, en placas de 24 pocillos pretratadas con colágeno de cola de rata para una mejor adherencia de las células. Inmediatamente luego de la siembra se agregaron los estímulos (LH: 100 ng/ml provista por el NIH, Buserelina: 1, 10 o 100 ng/ml, o la combinación de ambas drogas) y se dejaron las placas en estufa para cultivo (5% CO₂ en aire a 37°C). Luego de 4 horas de incubación se recolectó el medio para la determinación de progesterona y se guardó a -20°C. En cada pocillo se agregó androstenediona como sustrato de la biosíntesis de estradiol en una concentración final de 0.25 µM. Luego de 3 horas de incubación se recolectó el medio para la determinación de estradiol y se guardó a -20°C (Saragüeta y col. 1989). Al finalizar el experimento se midió el contenido de DNA en cada pocillo (Burton 1956). Los cultivos se repitieron tres veces. El número de pocillos de cada grupo experimental varió entre 6 y 12. Los resultados se expresaron como pg/µg de DNA en cada pocillo. Esta corrección por contenido de DNA se efectuó para minimizar las posibles variaciones en el número de células sembradas por pocillo.

III.2.6. Determinación de hormonas esteroideas

Para la determinación de estradiol y progesterona se utilizaron los métodos descritos anteriormente, sólo que en este caso al tratarse de muestras de medios de incubación y no de sueros no fue necesario hacer una extracción de las muestras con solventes orgánicos.

III.2.6.1 RIA de testosterona

Se utilizó el método descrito por Tesone y col. (1976) con mínimas modificaciones. Se utilizó un buffer fosfato 0.04 M, 0.154 M ClNa, pH 7.0 conteniendo 0.1% (P/V) de gelatina. Los estándares se prepararon a partir de una solución madre de testosterona (Sigma) en etanol en un rango de 12.5-800 pg por tubo en 200 µl de buffer fosfato gelatina. El anticuerpo utilizado fue anti-T-3-O-carboxymethyloxime-BSA y se agregaron a la curva y muestras 100 µl, disuelto en buffer fosfato gelatina en una dilución inicial de 1:1000. Hormona radioactiva: la testosterona tritada (NEN) se agregó disuelta en buffer fosfato gelatina (aproximadamente 10.000 cpm/100 µl).

Las muestras (200 µl de medio) y la curva con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 horas a 4°C. La separación de la hormona del complejo hormona-anticuerpo se logró igual que para progesterona. Finalmente, se tomaron 500 µl del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 3 ml de tolueno omnifluor (4 g/1000 ml de tolueno). Se leyeron los viales en un contador de centelleo líquido y se analizaron los resultados.

La sensibilidad del ensayo fue de 12.5 pg/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.8% y 12.3% respectivamente.

III.2.7. Análisis Estadísticos

Los tests *t de Student* y *t de Student para muestras apareadas* se emplearon para el análisis de los niveles hormonales en experimentos de incubación de órganos.

Las diferencias en los niveles hormonales, en los experimentos de cultivos celulares, se estudiaron por análisis de varianza en un sentido seguido del test de Tuckey.

El análisis de Scatchard fue realizado con el programa Ligand para poblaciones homogéneas de sitios receptores. Cambios en el número de receptores en los tejidos hipofisarios u ováricos fueron analizados aplicando ANOVA en un sentido y posteriormente el test de Tuckey.

En todos los casos $p < 0.05$ se consideró significativo.

III.3. Resultados

III.3.1. Receptores de GnRH en tejidos ováricos e hipofisarios de ratas portadoras de luteomas con o sin tratamiento con buserelina y de ratas controles en estro

De acuerdo con el análisis de Scatchard en los tejidos ováricos se observó un sólo tipo de receptor con sitios de unión de alta afinidad (Fig. III.1). Las constantes de disociación (K_d) fueron similares entre los distintos tejidos (ovarios en estro: 2.3×10^{-11} M, tumor: 2.4×10^{-11} M, tumor-bus: 3.7×10^{-11} M). Estas constantes son además muy parecidas a las descritas para la pituitaria anterior (Clayton y col. 1979). Por experimentos de saturación no se encontraron diferencias en el número de receptores entre el tejido tumoral y el tejido control (ovarios en estro). El tratamiento con buserelina durante un mes en animales portadores de tumor no modificó los niveles de estos receptores en los tumores (Tabla III.1).

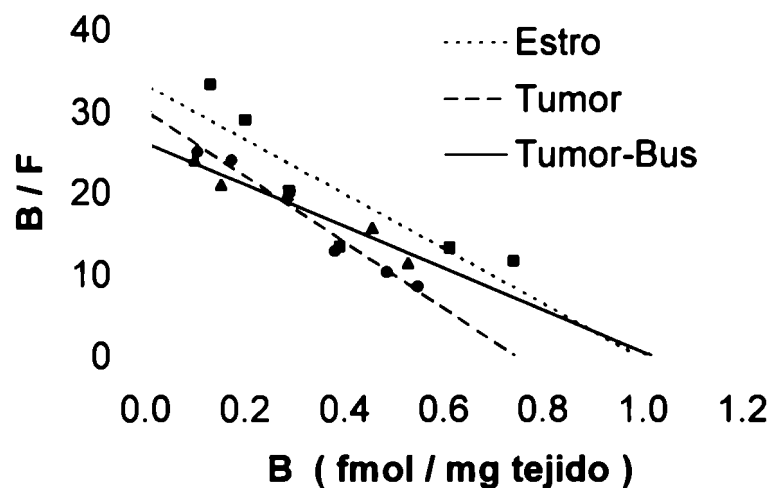


Figura III.1. Análisis de Scatchard de la unión del GnRH al tejido ovárico. Para ésta y las próximas figuras y tablas: Estro: ovarios de ratas en estro; Tumor: luteomas de ratas portadoras del injerto; Tumor-bus: luteomas de ratas portadoras del injerto tratadas en forma crónica con buserelina.

Tabla III.1. Receptores de GnRH en ovario e hipófisis: B_{max} (fmol/mg de tejido)

	Estro	Tumor	Tumor-Bus
Tejidos ováricos	0.599 ± 0.119 (9)	0.347 ± 0.078 (8)	0.470 ± 0.092 (7)
Hipófisis	1.756 ± 0.256 (8)	2.375 ± 0.695 (10)	0.834 ± 0.180 * (10)

Para ésta y las siguientes tablas y figuras: promedio \pm ES (número de ratas).

*: $p < 0.05$ vs estro y tumor.

En las pituitarias de los animales portadores de tumor y de los animales controles los niveles de receptores fueron similares. Sin embargo, cuando los animales portadores de tumores se trataron durante un mes con buserelina se observó un descenso significativo del número de receptores ($p < 0.05$), indicando la desensibilización inducida por el agonista en este tejido. Los niveles de receptores hipofisarios fueron aproximadamente cinco veces mayores que en los tejidos ováricos.

III.3.2. Efecto de la buserelina sobre la secreción de hormonas esteroideas de luteomas y ovarios en estro: incubaciones de órganos

Cuando ovarios o hemi-tumores se incubaron *in vitro* se observaron diferencias significativas en los niveles basales de progesterona y estradiol liberados al medio. Los tumores mostraron mayores niveles de estradiol y menores de progesterona que los ovarios en estro utilizados como control (Fig. III.2, paneles superior y medio) ($p < 0.05$). Esta diferencia se observó luego de 1.5 y 3 horas de incubación. No se observaron diferencias en los niveles de testosterona basal entre ambos tejidos (Fig. III.2, panel inferior).

Cuando se añadió buserelina (1×10^{-7} M) al medio de incubación, los niveles de las distintas hormonas no variaron en ningún tejido, indicando que este compuesto no tiene efecto sobre la secreción basal (Fig. III.2, paneles superior, medio e inferior).

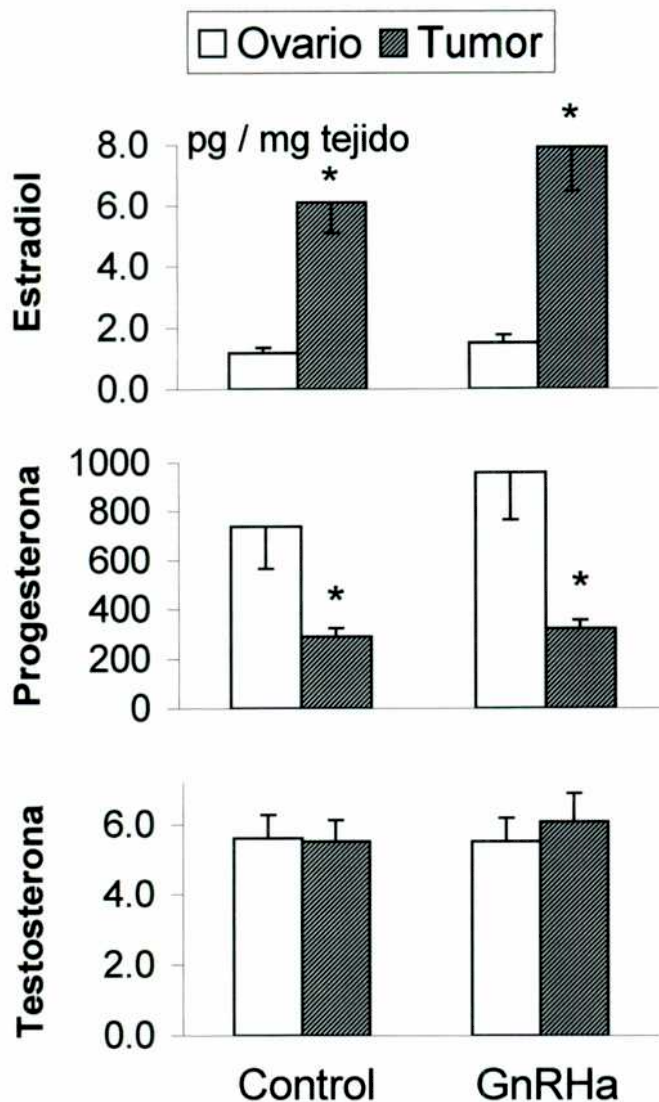


Figura III.2. Niveles de hormonas esteroideas en el medio luego de 1.5 horas de incubación. Efecto del GnRHa (buserelina: $1 \times 10^{-7}M$). *: $p < 0.05$.

III.3.3. Análisis histológico de los luteomas y de los ovarios controles de hembras superovuladas

Dada la heterogeneidad de los tipos celulares que se encuentran en un ovario en cualquier momento del ciclo estral, los ovarios en estro no eran los adecuados para realizar cultivos de células. Para estos estudios era necesario contar con un control con predominancia de células lúteas, semejante al tumor. Para ello se decidió utilizar un modelo clásico de tejido luteinizado, los ovarios de hembras prepúberes tratadas con PMSG-hCG (ver Materiales y Métodos: animales). El análisis histológico de ambos tejidos muestra gran cantidad de tejido luteinizado (CL) (Fig. III.3)(Ver también corte de luteoma en

Fig. 6). En el tejido control se observan algunos folículos (F). En los luteomas se observa tejido del bazo (S) en el cual fue injertado el ovario que dio lugar al tumor. El grado similar de luteinización observado demuestra que el tejido control elegido fue el adecuado para los cultivos de células.

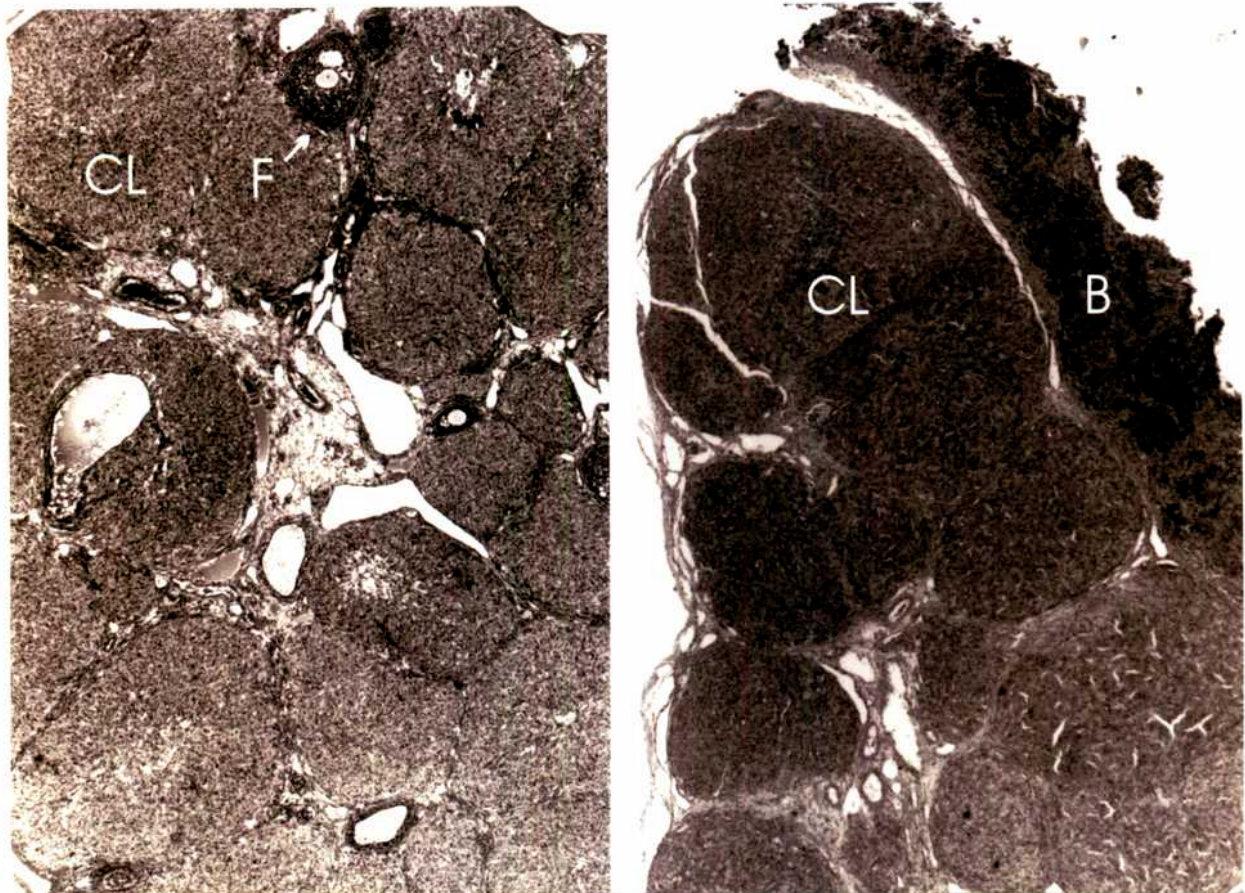


Figura III.3. Microfotografías obtenidas por microscopía óptica de ovario de hembra prepúber superovulada (izquierda) y de luteoma de 4-6 semanas de desarrollo (derecha). CL: cuerpo lúteo, F: folículo, B: bazo. Aumento: 40X

III.3.4. Efecto de la buserelina sobre la secreción de hormonas esteroideas de luteomas y ovarios de hembras prepúberes superovuladas: cultivos de células

En la figura III.4 se puede observar la similitud entre los cultivos primarios de ambos tipos celulares a las 72 horas de incubación.

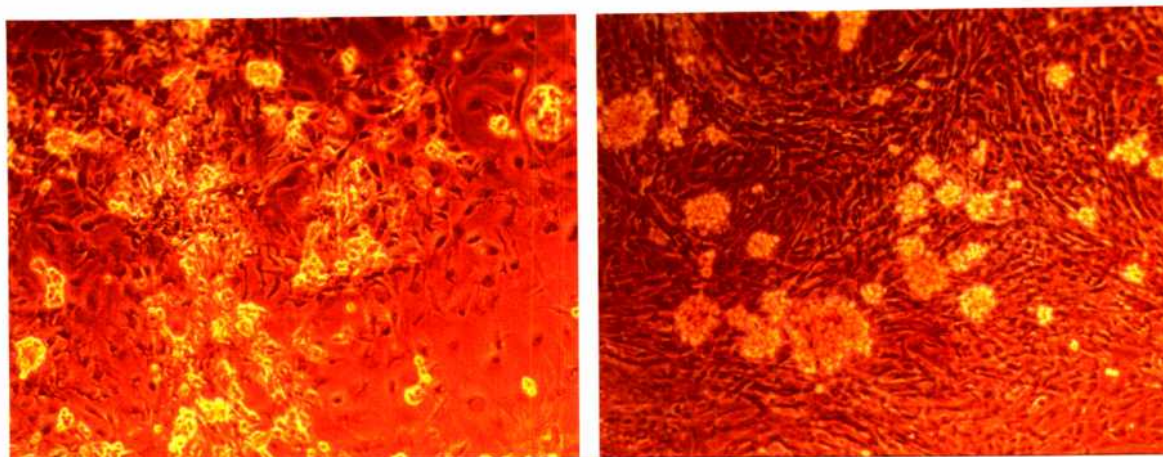


Figura III.4. Microfotografías obtenidas por microscopía óptica de células de luteoma (panel izquierdo) y de ovarios prepúberes superovulados (panel derecho) luego de 72 horas de un cultivo primario (10X).

La secreción basal de progesterona y de estradiol fue significativamente diferente entre los cultivos de células lúteas provenientes de luteomas ó de ovarios de hembras prepúberes superovuladas (Tabla III.2). Las células de luteomas secretaban más estradiol y menos progesterona que las células controles, de acuerdo a lo observado en las incubaciones de órganos descriptas arriba. Estos altos valores de estradiol implican una actividad de

Tabla III.2. Secreción esteroidea basal (pg/ μ g DNA) en medio de cultivo de células lúteas.

	Control	Tumor
Progesterona	67.7 \pm 6.8 (9)	48.9 \pm 4.4 * (11)
Estradiol	2.2 \pm 0.1 (6)	7.7 \pm 1.0 * (12)

*: p < 0.05

aromatasa aumentada, dado que los cultivos se efectúan en presencia de androstenediona, sustrato de esta enzima. En ambos tipos celulares la LH indujo un aumento significativo de la secreción de progesterona. En las células de los luteomas el agregado de buserelina no modificó los niveles basales de progesterona luego de cuatro horas de incubación; sin embargo indujo una inhibición significativa de la secreción de progesterona inducida

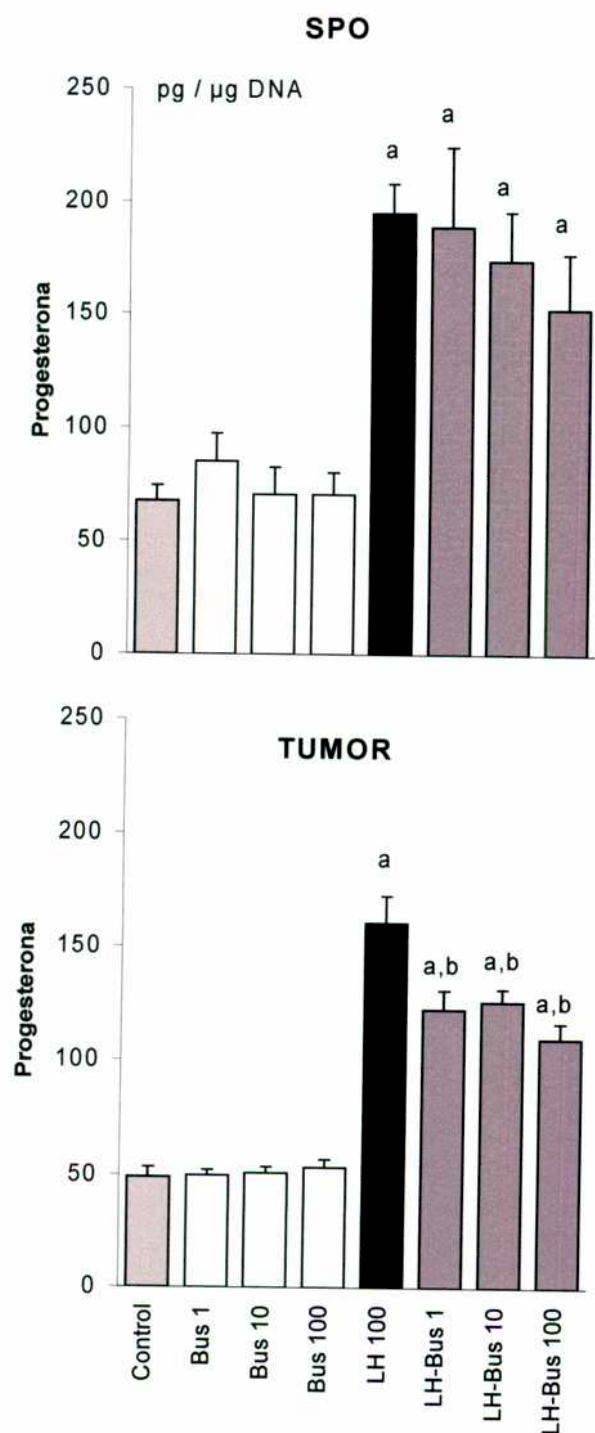


Figura III.5. Progesterona en el medio de cultivo luego de 4 horas de incubaciones de células. Para ésta y la siguiente figura: **SPO:** células provenientes de ovarios prepúberes superovulados. LH y Bus (buserelina) en ng/ml. a: $p < 0.05$ vs control, Bus 1, Bus 10 y Bus 100. b: $p < 0.05$ vs LH.

por LH (Fig. III.5, panel inferior) ($p < 0.01$). En las células controles de ratas superovuladas, la buserelina tampoco inhibió la secreción basal de progesterona. Luego de la estimulación con LH se observó una tendencia de la buserelina a disminuir los niveles de progesterona que no alcanzó significancia estadística, marcando otra diferencia con el tejido tumoral (Fig. III.5, panel superior).

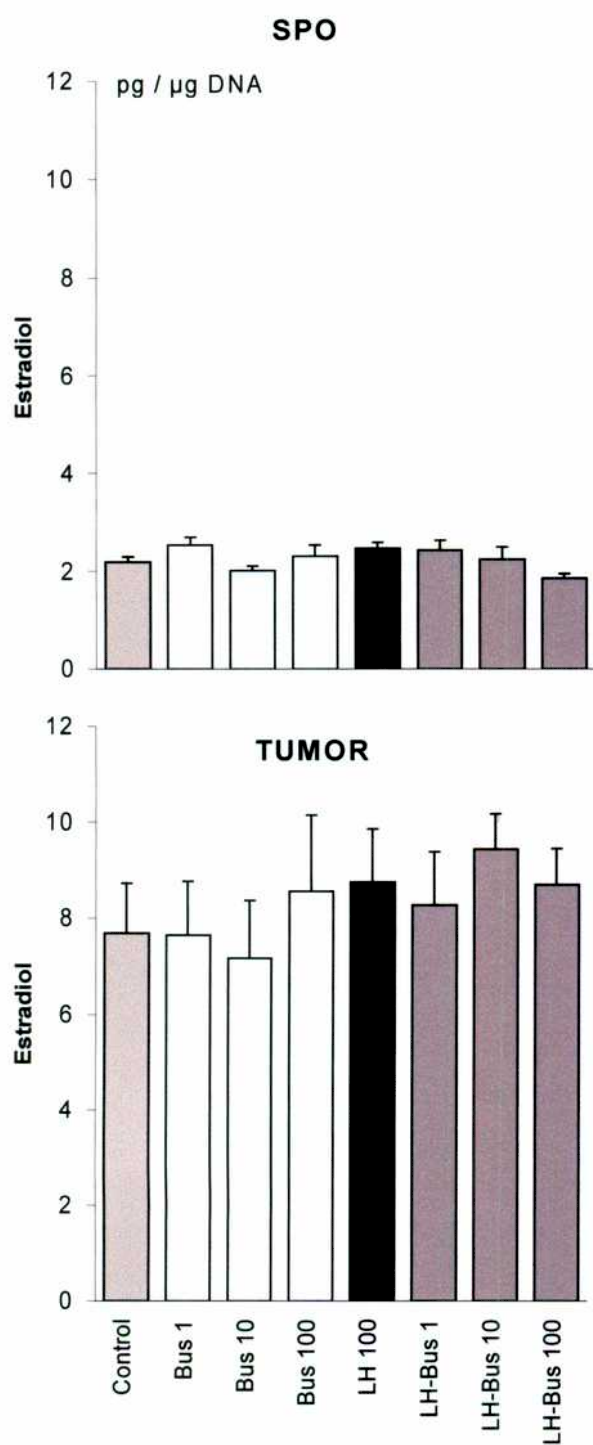


Figura III.6. Estradiol en el medio de cultivo luego de 7 horas de incubaciones de células.

Con respecto al estradiol, ni la LH ni la buserelina alteraron su secreción en ningún tipo celular luego de siete horas de incubación, lo que implicaría que la actividad de aromatasa no es modificada por estos estímulos en el medio de incubación en estas condiciones experimentales (Fig. III.6, paneles superior e inferior).

III.4. Discusión

Se han observado similitudes y diferencias entre el tejido ovárico control y el tejido tumoral. Con respecto a los receptores de GnRH, se encuentran presentes en los luteomas y no se observaron diferencias en la máxima unión ni en el Kd cuando se comparó con los ovarios en estro (Clayton y col. 1979). Se ha descrito que los sitios de unión para GnRH en tejido ovárico no se encuentran modificados por el estadio del ciclo estral, y que su número es menor al encontrado en la hipófisis anterior (Clayton y col. 1979; Reeves y col. 1980), en concordancia a lo observado en el presente trabajo. Sin embargo, se observó una respuesta diferente al tratamiento con buserelina entre el tejido hipofisario y el tejido ovárico. Mientras el análogo de GnRH provoca una disminución en la unión máxima en hipófisis, no se observó tal efecto en los luteomas, indicando que estos receptores no son desensibilizables por la estimulación constante, en contraste con lo que está descrito en hipófisis (Smith y Vale 1981). En trabajos previos realizados en ovarios normales tampoco se observó desensibilización de los receptores de GnRH por administración *in vivo* del decapeptido, incluso se describió un aumento en el número de receptores ante la estimulación con GnRH (Pieper y col. 1981; Harwood y col. 1980a). Estos datos en su conjunto sugieren que los receptores de GnRH no se encuentran marcadamente modificados en este tejido tumoral. Además, como no se encuentran desensibilizados, podrían desempeñar un papel en la inhibición del crecimiento tumoral observado *in vivo* con el tratamiento crónico de buserelina en los animales portadores de tumor, como describiéramos en el capítulo anterior. Se han detectado también receptores de GnRH en carcinomas epiteliales y tumores de estroma de ovarios humanos (Imai y col. 1994), sugiriendo una posible participación de este péptido en su desarrollo o regulación. Por lo tanto estos tumores ováricos experimentales

que presentan receptores para GnRH son un excelente modelo para estudiar las acciones del GnRH en la función tumoral ovárica y evaluar sus efectos antitumorales.

Para profundizar los estudios sobre los efectos del GnRH o sus análogos en este tejido tumoral, se evaluó la respuesta esteroidogénica a la buserelina tanto en condiciones basales como estimuladas por LH. Diferencias significativas en los niveles hormonales se han observado al comparar el tejido tumoral con el control en incubaciones de órgano. Los luteomas secretaron 417% más estradiol y 61% menos progesterona que los ovarios en estro. Estos resultados sugieren que las vías de síntesis de esteroides pueden estar alteradas en los luteomas, especialmente considerando que los ovarios en estro secretan niveles de progesterona muy bajos (Neill 1980; Lux-Lantos y col. 1990). La buserelina *in vitro* no modificó la secreción de progesterona, estradiol o testosterona tanto en tumores como en ovarios en estro. La falta de respuesta de la secreción esteroidea basal a la administración de análogos de GnRH en tejido ovárico normal ha sido descripta previamente (Harwood y col. 1980b; Behrman y col. 1980).

Se empleó un segundo modelo *in vitro*, el cultivo de células en monocapa, para evaluar si los análogos de GnRH modifican la secreción de progesterona y estradiol estimulada por gonadotrofinas. En este caso se utilizaron células provenientes de ovarios de hembras prepúberes superovuladas como control. Nuevamente se detectaron diferencias significativas en la secreción esteroidea basal. Los niveles de progesterona fueron 28% menores y los de estradiol 250% mayores en las células de luteoma con respecto a las células control. Dichas diferencias, aunque menos marcadas que en las incubaciones de órgano, refuerzan la idea de alteraciones en la síntesis de esteroides en las células de luteomas. La buserelina no fue capaz de modificar los niveles

basales de progesterona pero inhibió significativamente la secreción de progesterona inducida por LH sobre las células tumorales. Se ha propuesto que la disminución de la producción de progesterona inducida por GnRH, resulta de la inhibición de su biosíntesis y/o la estimulación de su degradación (Jones y Hsueh 1981; Jones y Hsueh 1980). En células provenientes de ratas prepúberes superovuladas, aunque la LH induce un incremento similar en los niveles de progesterona, la inhibición de la buserelina no alcanzó significancia estadística. Estos resultados en células lúteas control difieren de otros descritos en la literatura (Behrman y col. 1980; Clayton y col. 1979; Massicotte y col. 1981), pudiendo deberse las diferencias a distintas concentraciones de los fármacos utilizados o a diferentes condiciones de cultivo. Sin embargo, es interesante resaltar que las bajas concentraciones del análogo de GnRH empleadas en este trabajo ponen en evidencia una diferencia en la sensibilidad al efecto inhibitorio producido por la buserelina sobre la secreción de progesterona, entre ambos tipos celulares. Con respecto al estradiol, no se observaron variaciones en los niveles de secreción tanto en los cultivos de células de luteoma como en los de SPO, con ninguno de los estímulos agregados, luego de 7 horas de incubación. Trabajos previos describieron un efecto estimulador de LH sobre la secreción de estradiol pero a concentraciones mucho menores (1 ng/ml) y luego de un tiempo de incubación mayor (24 horas) (Saragüeta y col. 1989). La falta de efecto de buserelina sobre la secreción de estradiol en los cultivos de células corrobora nuestros resultados obtenidos en los experimentos de incubación de órganos. Sin embargo, en otros trabajos se ha descrito un efecto inhibitorio sobre los niveles basales en células de granulosa-luteínicas humanas (Guerrero y col. 1994) y en células de granulosa luteinizadas de rata, el GnRH inhibió la secreción de estradiol estimulada por LH (Jones y Hsueh 1981).

En base a estos resultados podemos decir entonces que estos tumores experimentales ováricos poseen receptores para GnRH y que éstos no se encuentran desensibilizados por la administración continua del análogo de GnRH. Describimos también una notoria diferencia en la secreción basal de estradiol y progesterona entre los tejidos tumoral y normal. Además se observó una mayor sensibilidad al análogo de GnRH en su efecto inhibitorio sobre la progesterona en las células tumorales.

En conclusión estos resultados sugieren que la supresión del crecimiento y de la secreción hormonal observados con el tratamiento *in vivo* con busarelina en estos tumores experimentales podría no sólo deberse a la desensibilización hipofisaria del receptor de GnRH y consiguiente descenso de gonadotrofinas, sino que podría ser también consecuencia de una acción directa del análogo sobre el tejido tumoral.

Conclusiones

- 1) Las células del tumor poseen receptores a GnRH, con características similares al ovario control. Su número no disminuye luego de la administración crónica del agonista, por lo tanto pueden mediar el efecto antitumoral del GnRH y participar en la regulación tumoral.
- 2) Los luteomas presentan un metabolismo esteroideogénico basal alterado, secretando más estradiol y menos progesterona que los dos tejidos ováricos usados como control.
- 3) El análogo de GnRH sobre las células de los luteomas tiene un efecto directo: inhibe la secreción de progesterona estimulada por LH. Las células tumorales son más sensibles que las SPO a este efecto.



Capítulo IV.

GnRH: receptores y segundos
mensajeros en tumores
experimentales de ovario

IV.1. Introducción y objetivos

En el capítulo anterior demostramos que los luteomas experimentales poseen receptores para GnRH y que la estimulación de células tumorales con el decapeptido o sus análogos inhibe significativamente la secreción de progesterona inducida por LH, demostrando un efecto directo del GnRH sobre el tumor. Es más, esta inhibición se observa en condiciones en que el tejido control (células de ovarios de ratas prepúberes superovuladas) no responde significativamente a esta droga sugiriendo una mayor sensibilidad del tejido tumoral a la acción del GnRH. La diferencia en el efecto de GnRH entre ambos tejidos se puede deber a una variedad de factores incluyendo el número de receptores presentes, la afinidad por los mismos y la eficiencia en la movilización de segundos mensajeros.

Con respecto al mecanismo de acción del GnRH en el ovario, se ha demostrado que en células ováricas, como en las hipofisarias, la estimulación de los receptores de GnRH está fundamentalmente asociada a la activación de la fosfolipasa C (PLC) a través de una proteína G (Fig. IV.1) (Stojilkovic y col. 1994; Leung y Steele 1992; Leung y Wang 1989). La PLC induce a su vez la hidrólisis de los fosfatidil inositoles formándose los inositoles mono, bi y tri fosfato (InsP, InsP₂ e InsP₃) y el diacilglicerol (DAG). El InsP₃ actuando sobre receptores específicos del retículo endoplásmico induce un rápido aumento de los niveles intracelulares de calcio. Se ha demostrado que la activación de toda esta cascada de mensajeros intracelulares juega un papel crítico en los mecanismos a través de los cuales las hormonas regulan diversos procesos como secreción celular, el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación. Además de sus efectos clásicos al activar la PLC, también se ha demostrado que el GnRH puede ejercer sus acciones estimulando la fosfolipasa A₂ (PLA₂) o

la fosfolipasa D (PLD) (Fig. IV.1), ambos mecanismos han sido descritos en el ovario (Leung y Steele 1992).

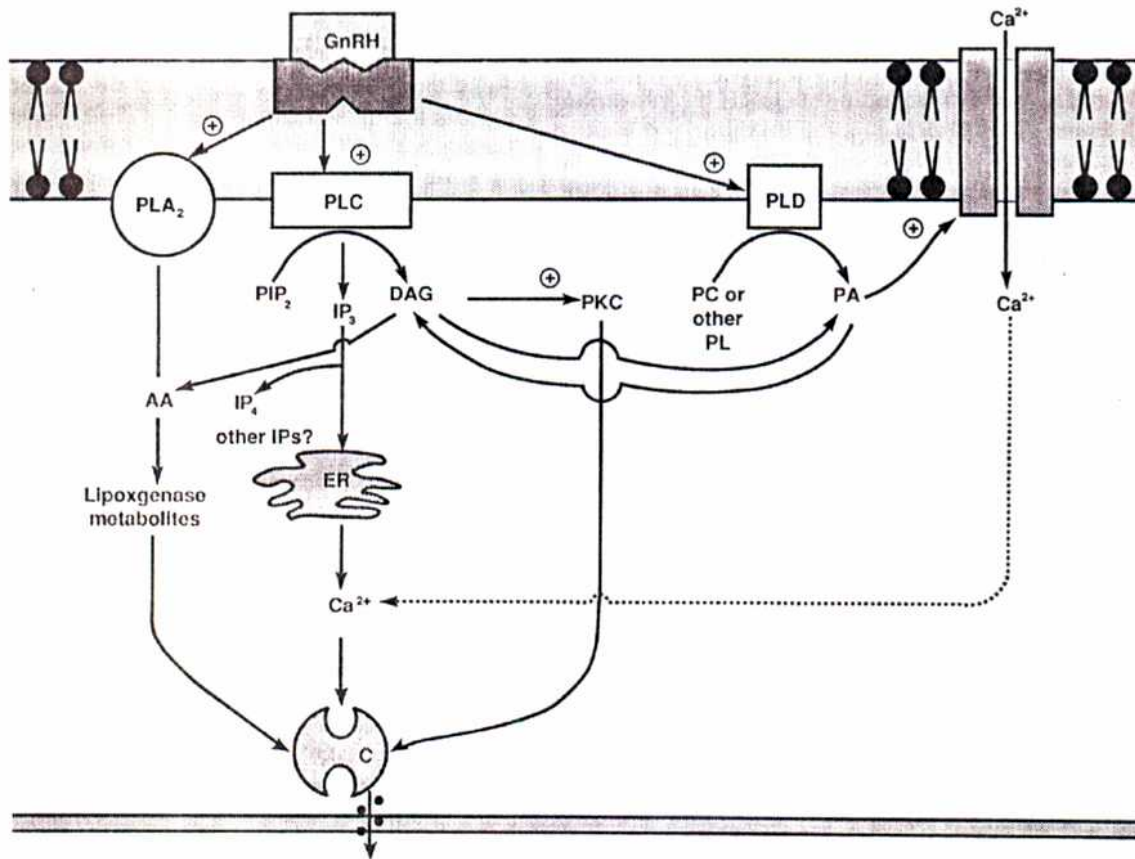


Figura VI.1. Mecanismos de señales del GnRH en ovario. PLC, PLA₂ y PLD son las tres vías de segundos mensajeros involucradas en la respuesta. De: Leung y Steele (1992).

En el presente grupo de experimentos se investigarán las posibles causas de las diferencias encontradas anteriormente, en cuanto a la respuesta endocrina inducida por el GnRH en las células tumorales con respecto a las células control. Para ello se medirán el número y la afinidad de los receptores de GnRH presentes en los luteomas, comparativamente con tejido ovárico muy luteinizado como control. Estudiaremos también la activación de la vía clásica de segundos mensajeros inducida por busserelina en ambos tejidos.

IV.2. Materiales y Métodos

IV.2.1. Animales

Se emplearon ratas portadoras de luteoma de 4-6 semanas de desarrollo (grupo Luteoma). Como control se emplearon ratas prepúberes superovuladas con PMSG y hCG (grupo SPO).

Para los estudios de receptores se utilizó un segundo grupo control: hembras prepúberes de 23-25 días sin tratamiento (grupo PP). Este grupo fue incluido dado que se ha demostrado que los ovarios de estos animales poseen los niveles más altos de receptores de GnRH (Harwood y col. 1980a; Jones y col. 1980).

IV.2.2. Estudio de receptores de GnRH

Se sacrificaron los animales y se obtuvieron los luteomas u ovarios, según el grupo, conservándose los tejidos a -70°C . La metodología utilizada para la medición de receptores fue la descrita en el capítulo IV, con pequeñas modificaciones. Los tejidos fueron homogeneizados en buffer Tris sin BSA, para poder realizar la cuantificación de las proteínas en una alícuota. Posteriormente se diluyeron en buffer Tris con la concentración de BSA adecuada para que la concentración final de BSA fuera 0.1%. En este caso el número de receptores fue expresado como fmol/mg de proteínas. Los experimentos se repitieron tres veces.

IV.2.3. Obtención de células lúteas

Para los experimentos de movilización de calcio y formación de inosítoles fosfatos se obtuvieron las células de los luteomas y los ovarios superovulados como fuera descrito en el capítulo III.

IV.2.4. Movilización de calcio intracelular

Se realizaron los experimentos el mismo día de obtención de las células. Se empleó FURA-2/AM (Sigma) como indicador de Ca^{2+} por ser una sonda adecuada para resolver cambios segundo a segundo en los niveles del ion durante la activación de receptores hormonales, según ha sido demostrado previamente (Anderson y col. 1987). El pellet de células lúteas de cada grupo experimental (Luteoma y SPO), obtenido luego de los lavados con medio 1, fue resuspendido e incubado en solución salina tamponada (BSS: NaCl 127 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 0.5 mM, NaHCO_3 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.5) en presencia del tetraacetoximetilester de FURA-2 (FURA-2/AM 2 μM), glucosa 10 mM, BSA 0.1% y de bajas concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} (CaCl_2 1.8 mM, MgCl_2 2 mM) para prevenir la formación de agregados celulares que pueden interferir con la señal de fluorescencia. La incubación se realizó durante 45 minutos a 37°C en un ambiente de 5% CO_2 , permitiendo la incorporación a la célula de FURA-2/AM, y su posterior conversión en FURA-2, mediada por la actividad hidrolítica de esterasas endógenas. El FURA-2 es el indicador fluorescente, quedando atrapado en el citoplasma. Luego de la incubación, las células se lavaron 2 veces. En cada oportunidad, la suspensión se centrifugó 10min a 1000rpm, se aspiró el sobrenadante y luego se resuspendió el pellet en BSS (sin FURA-2/AM). Luego del último lavado, las células se llevaron a una concentración de 2×10^6 cél/ml. Las condiciones de esterilidad se mantuvieron hasta la transferencia de las células (500 μl) a cubetas cilíndricas de vidrio (capacidad de la cubeta: 1 ml), que se colocaron en el porta cubetas de un espectrofluorímetro (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) provisto de agitador, termostato ajustado a 37°C, y del accesorio CA-261 (para la medición de Ca^{2+} a dos longitudes de onda de excitación). Los niveles de Ca^{2+} intracelular fueron registrados cada segundo a una longitud de onda de

emisión de 505 nm y a dos longitudes de onda de excitación que alternaban entre 340 y 380 nm. La estabilidad de la línea de base fue monitoreada durante los 2 minutos iniciales; posteriormente se administraron los estímulos: busserelina (concentración final en la cubeta, 100 ng/ml), hCG (1×10^{-12} M), Tapsigargina (0.5 μ M), ATP (1 y 100 μ g/ml) y AVP (0.5 μ g/ml), para estudiar sus efectos sobre la movilización del calcio intracelular. Al final de cada corrida la preparación fue calibrada determinando la fluorescencia máxima (R_{max}) inducida por Tritón X-100 0.1% y la fluorescencia mínima (R_{min}) en presencia del quelante de Ca^{2+} EGTA 5mM (el pH se ajustó a >8.3 con Tris-base 1mM). La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \times (S_{380} - S_{b380}),$$

donde: $Kd = 224$ nM (Grynkiewicz y col. 1985)

$$R = F_{340} / F_{380} \text{ (cociente de intensidades de fluorescencia)}$$

R_{max} = fluorescencia máxima

R_{min} = fluorescencia mínima

S_{380} = coeficiente de proporcionalidad del compuesto libre a 380nm.

S_{b380} = coeficiente de proporcionalidad del compuesto unido a 380nm.

No hubo una reducción significativa de la señal del indicador durante el curso del experimento según el análisis de breves registros de la emisión de FURA-2 en respuesta a una excitación con luz de 360nm (longitud de onda a la cual la fluorescencia es independiente de $[Ca^{2+}]_i$) al comienzo y al fin del experimento. La intensidad de fluorescencia de FURA-2 se corrigió respecto a la autofluorescencia de las células ($<10\%$ de la fluorescencia de FURA-2 en células no estimuladas) y a la correspondiente al Tritón X-100 cuando fuere apropiado. Los gráficos resultantes fueron digitalizados y posteriormente vectorizados y cuantificados usando el programa Ungraph 2.0. Los resultados fueron procesados en Excel 97. Los valores obtenidos durante el primer

minuto de cada corrida fueron considerados niveles basales. Se representa el aumento porcentual inducido por los distintos estímulos luego de normalizarlo respecto del promedio de los valores basales. Se repitieron los experimentos de tres a seis veces.

IV.2.5. Determinación de inositoles fosfato

Los niveles de inositoles fosfato se midieron según la descripción de Ascoli y col. (1989), con mínimas modificaciones. Las células lúteas de ambos tejidos fueron sembradas en cámaras multi-pocillos (P24) (750.000 células en 1 ml de DMEM-F12 (1:1) con 2.2 g/l HCO_3^- , con 10% de suero fetal bovino (*medio 3*) en cada pocillo) y colocadas en estufa a 37°C y atmósfera controlada. Un día después del sembrado, se hicieron 2 lavados y se agregó 1 ml de *medio 3* fresco conteniendo 4 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]myo-inositol (NEN, NET114R). Se guardó una alícuota de este medio para medir las cuentas totales agregadas a cada pocillo. Las células fueron incubadas en ese medio por 48 horas. Antes del experimento se tomó una alícuota del medio para determinar las cuentas totales de [^3H] no incorporado a las células y poder comparar la incorporación de myo-inositol en ambos tipos celulares por diferencia con las cuentas totales agregadas inicialmente. Las células se lavaron dos veces con *medio 3* sin suero y se incubaron 15 min en presencia de 20 mM LiCl en *medio 2* (descrito en capítulo anterior). El LiCl se agregó para inhibir la degradación de los inositoles fosfato formados, dado que este compuesto inhibe las fosfatasas involucradas en este proceso (Ascoli y col. 1989). Se agregaron luego los estímulos (10 μl , concentraciones finales en el pocillo: buserelina 1 y 100 ng/ml y NaF 10 mM) y se incubaron otros 30 min. Finalizado el tiempo de incubación las cámaras se colocaron sobre hielo, se aspiró el medio y se reemplazó por 0.2 ml de 0.5 N HClO_4 frío. Las células se rasparon del fondo del pocillo con una escobilla de goma y se transfirieron a tubos de plástico. Se

lavaron los pocillos con 0.3 ml de 0.5N HClO₄ frío, agregándose al extracto previo. Los extractos fueron centrifugados 10 min a 3000 rpm, 0.4 ml del sobrenadante se neutralizaron por el agregado de 0.2 ml de 0.72 M KOH/0.6 M HKCO₃. Luego se volvieron a centrifugar 10 min a 3000 rpm y se tomaron 500 µl del sobrenadante. Se agregaron 500 µl de 100 mM inositol y se ajustó el volumen a 5 ml con agua desionizada. Los precipitados de la primer centrifugación se conservaron para la determinación de DNA. Para separar los distintos inositoles fosfato formados se sembró el volumen total de cada muestra en una columna de cromatografía de intercambio iónico Bio-Rad AG 1-X8 (200-400 mesh, formate form). Las columnas fueron lavadas secuencialmente con 15 ml de 10 mM inositol (para eluir [³H]myo-inositol), 5 ml de 0.1 M ácido fórmico/0.2 M formiato de amonio (para eluir InsP), 5 ml de 0.1 M ácido fórmico/0.4 M formiato de amonio (para eluir InsP₂), y 5 ml de 0.1 M ácido fórmico/1.0 M formiato de amonio (para eluir InsP₃). Una alícuota de 2 ml de cada eluido se mezcló con 6 ml Optiphase "Hisafe" 3 y se cuantificó en un contador de centelleo líquido. Los experimentos se repitieron tres a cinco veces.

IV.2.6. Medición de fosfatidil inositol de membrana

El fosfatidil inositol de las membranas plasmáticas se midió como fuera descrito por Pignataro y Ascoli (1990a). Luego de lisar las células para la medición de inositoles fosfato se obtiene un precipitado conteniendo las membranas, además de otros componentes celulares (ver IV.2.5 Determinación de inositoles fosfato). Este precipitado se extrae con metanol/cloroformo/HCl y la fase clorofórmica se seca bajo corriente de nitrógeno y se guarda a -20°C para posterior análisis por cromatografía en capa delgada (TLC). La TLC se lleva a cabo en placas de silica-gel impregnadas con oxalato-EDTA. Se siembran 20 µl de las muestras disueltas en

CHCl₃/CH₃OH (1:1) y se eluyen con CHCl₃/CH₃OH/9.15 M NH₄OH (40:40:15). La cromatografía se desarrolló en un recipiente saturado y las placas se eluyeron 2 veces durante 65 minutos a temperatura ambiente con un período de secado intermedio de 3 minutos a 110°C. Las señales de las placas fueron amplificadas con Enhance (Dupont-NEN) y se expusieron a una película Kodak X-Omat-AR por 14 días. Luego del revelado se escaneó y digitalizó el film y se cuantificaron las bandas por QuantiScan.

IV.2.7. Análisis Estadísticos

El análisis de Scatchard fue realizado con el programa Ligand para poblaciones homogéneas de sitios receptores. Diferencias en el número de receptores fueron analizados aplicando ANOVA en un sentido y posteriormente el test de Tuckey.

En los estudios de calcio intracelular, las diferencias entre las áreas fueron analizadas por múltiple análisis de la varianza para medidas repetidas, seguido por un test de Tuckey.

Las diferencias en los niveles de inositoles fosfato se analizaron por múltiple análisis de la varianza para medidas repetidas, seguido por un test de Newman-Keuls.

En todos los casos $p < 0.05$ se consideró significativo.

IV.2.8. Drogas

NaF, myo-inositol, LiCl, Fura-2AM y tapsigargina se obtuvieron de SIGMA.

Myo[2-³H(N)]-inositol (20Ci/mmol) se obtuvo de NEN Life Sciences Products.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Receptores de GnRH en tejidos ováricos de ratas portadoras de luteomas, ratas prepúberes y ratas prepúberes superovuladas

De acuerdo con el análisis de Scatchard estos tejidos mostraron un sólo tipo de receptor con sitios de unión de alta afinidad (Fig. IV.2, panel superior). Las constantes de disociación fueron similares entre los distintos tejidos (en nM, PP: 0.054 ± 0.020 , SPO: 0.048 ± 0.039 y LUTEOMA: 0.047 ± 0.032). Se encontraron diferencias significativas en el número de receptores de GnRH entre los distintos tejidos ($p < 0.001$) (Fig. IV.2, panel inferior). El orden, por abundancia de receptores, fue el siguiente: PP > LUTEOMA > SPO.

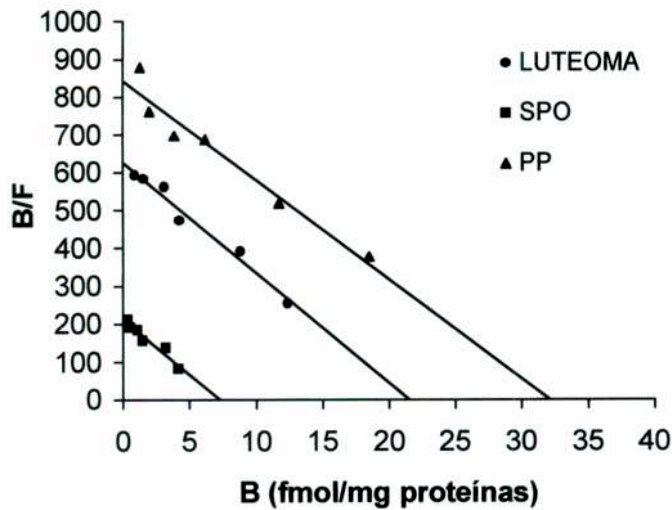
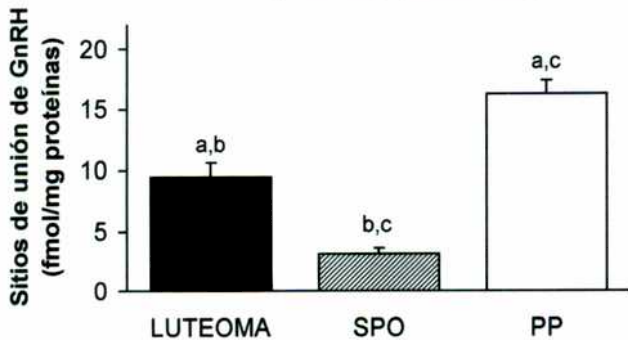


Figura IV.2. Receptores de GnRH en tejidos ováricos. Panel superior: Análisis de Scatchard de la unión del GnRH a membranas de tumores (LUTEOMA), ovarios prepúberes (PP) y ovarios prepúberes superovulados (SPO). Se muestra un experimento representativo. Panel inferior: número de receptores de GnRH en los distintos tejidos determinados por estudios de saturación (n: 8 para cada tejido).



IV.3.2. Movilización del calcio intracelular en células de luteomas y de ovarios de hembras superovuladas

Se cuantificaron los cambios en los niveles de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) ante distintos estímulos. No se observaron diferencias en el calcio basal entre ambos tipos celulares ($[Ca^{2+}]_i$ basal: 171.6 ± 23.5 nM y 194.5 ± 18.1 nM, en células de luteoma y de SPO respectivamente, (n=5)). Como era de esperar, la buserelina indujo una liberación clásica y significativa del calcio intracelular en las células SPO. Contrariamente, no se observó movilización de calcio en las células de luteomas ante este estímulo (Fig. IV.3, Tabla IV.1).

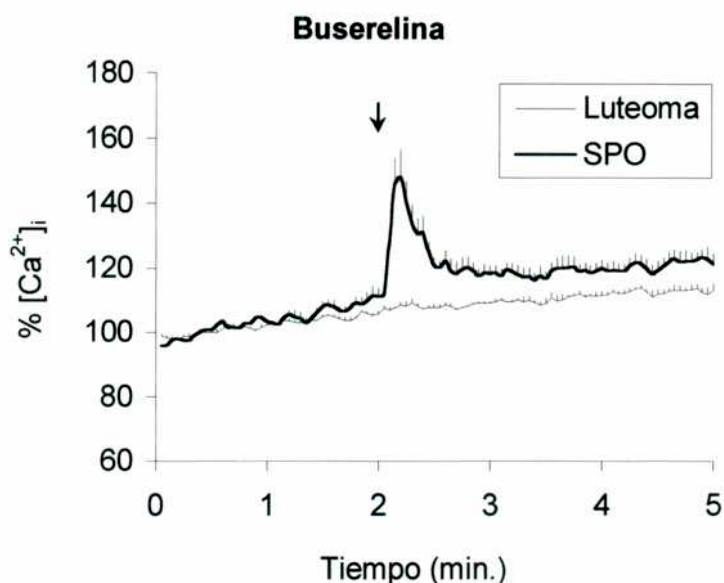


Figura IV.3. Movilización de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) inducida por buserelina (100 ng/ml en la cámara) en células de luteoma y SPO. Las curvas representan el promedio de 5 experimentos (porcentaje de incremento con respecto a los niveles basales), y las líneas verticales representan el ES para cada punto. Los niveles basales están citados en el texto. La buserelina fue administrada al minuto 2, indicado por la flecha.

La hCG, un agente que activaría la PLC en el ovario, también indujo un aumento significativo del calcio intracelular en las células SPO, aunque de menor magnitud que el inducido por buserelina, ambas a concentraciones que

inducen respuestas endocrinas máximas (Tabla IV.1). Las células de los luteomas tampoco respondieron a este estímulo (Fig. IV.4).

Tabla IV.1. Areas (en %) bajo el pico de las curvas de calcio intracelular, inducido por diferentes estímulos en células dispersas de luteoma y SPO, entre los minutos 2.05 y 3.05.

	CONTROL	BUSERELINA (100ng/ml)	hCG ($1 \times 10^{-12}M$)
LUTEOMA	63.6 ± 5.7	52.5 ± 15.5 ^a	51.4 ± 13.3 ^a
SPO	71.3 ± 24.4	319.8 ± 35.1 ^{*, b}	233.3 ± 40 [*]

El análisis de la varianza múltiple para medidas repetidas indicó interacción, $p < 0.05$. Número de experimentos: 4. *: significativamente diferente del control en cada tipo celular. a: niveles significativamente distintos de las células SPO. b: diferencias significativas con respecto a hCG en células SPO. En todos los casos $p < 0.05$ o menor.

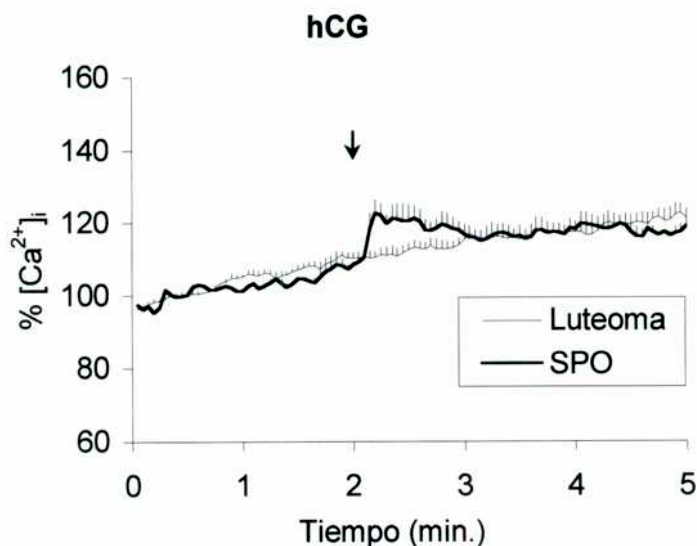


Figura IV.4. Movilización de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) inducida por hCG ($1 \times 10^{-12}M$) en células de luteoma y SPO. Las curvas representan el promedio de 4 experimentos. Al minuto 2 se administró hCG.

La tapsigargina, un inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa asociada al retículo endoplásmico, estimuló la liberación de calcio en ambos tipos celulares (Fig. IV.5). Sin embargo, los niveles alcanzados en las células de luteoma fueron

significativamente mayores que los de las células controles (área bajo la curva de calcio (en %) entre los minutos 2.05 y 4.55: luteoma: 2195 ± 371.3 (7) vs SPO: 1187 ± 195.3 (6), $p < 0.05$).

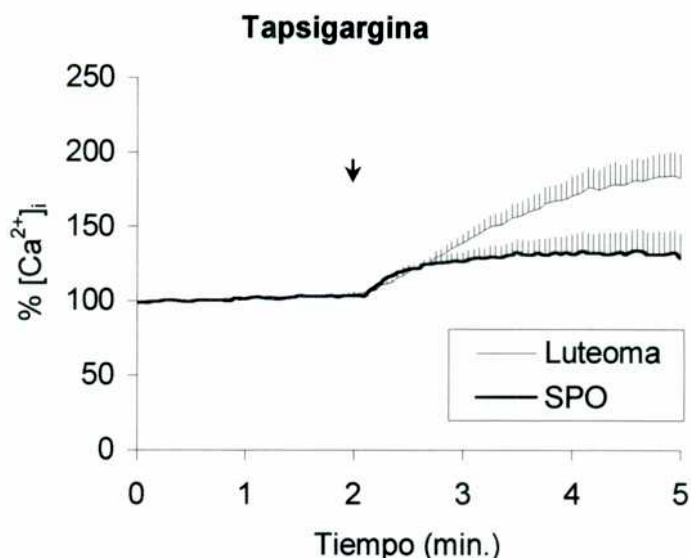


Figura IV.5. Movilización de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) inducida por tapsigargina ($0.5 \mu M$) en células de luteoma y SPO. Las curvas representan el promedio de 6-7 experimentos. Al minuto 2 se administró tapsigargina.

Ante la falta de respuesta en las células de luteomas a los ligandos específicos de membrana empleados, decidimos probar el efecto de otros agentes que movilizan calcio intracelular a través de la estimulación de fosfolipasa C, en ambos tipos celulares. El estímulo con dos dosis de ATP (1 y $100 \mu M$), provocó la movilización de calcio intracelular tanto en células SPO como en las de Luteomas (Fig. IV.6). Lo mismo ocurrió luego de la administración de AVP en la suspensión celular (Fig. IV.7).

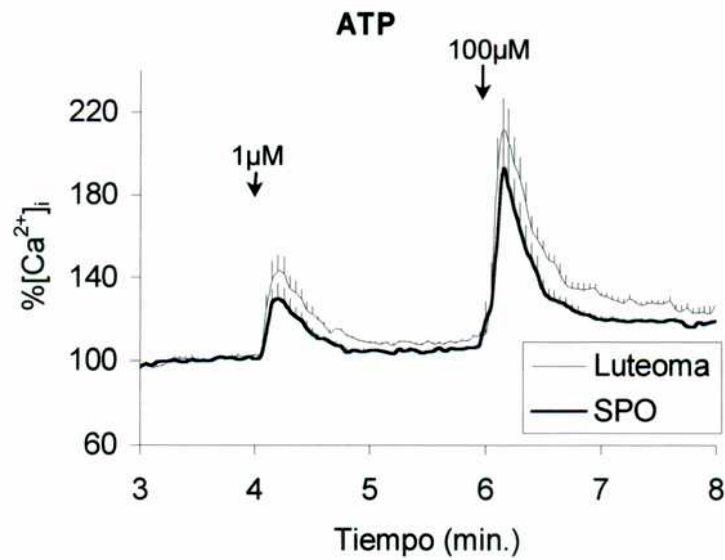


Figura IV.6. Dosis respuesta en la movilización de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) inducida por ATP en células de luteoma y SPO. Las curvas representan el promedio de 4 experimentos. El ATP se administró en los minutos 4 (1 μM) y 6 (100 μM).

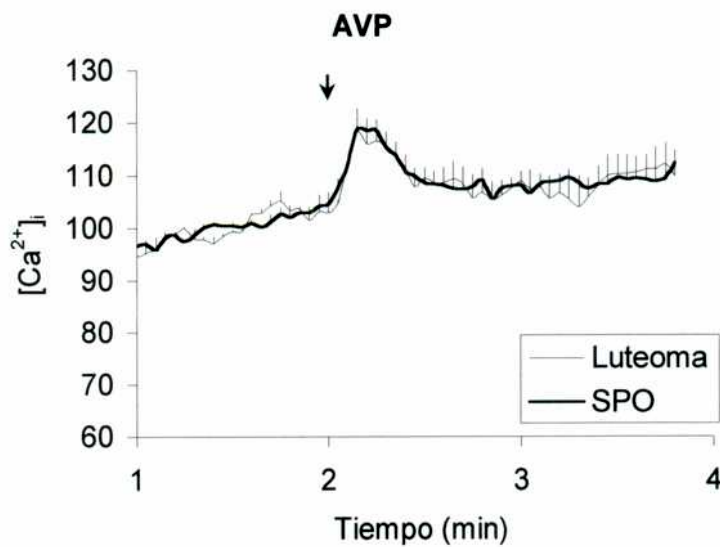


Figura IV.7. Movilización de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) inducida por AVP (0.5 μM) en células de luteoma y SPO. Las curvas representan el promedio de 3 experimentos. Al minuto 2 se administró el estímulo.

IV.3.3. Inositoles Fosfato en cultivos de células provenientes de luteomas o de ovarios de ratas prepúberes superovuladas

Los niveles basales de inositoles fosfato totales, incluyendo InsP, InsP₂ e InsP₃, fueron similares entre las células de luteomas y de SPO. En las células controles la buserelina (Bus: 100 ng/ml) y el NaF (10 mM) indujeron aumentos significativos en los inositoles fosfato totales ($p < 0.01$), siendo el NaF más potente que la buserelina ($p < 0.05$) (Fig. IV.8). La buserelina en concentraciones muy bajas (1 ng/ml) fue aún capaz de aumentar significativamente los niveles de inositoles fosfato en las células SPO, indicando una dependencia de la concentración en este efecto [Bus (1 ng/ml): 4210 ± 380 cpm vs Bus (100 ng/ml): 5970 ± 590 cpm, ($n=3$), test de Student apareado: $p < 0.02$]. En las células de los luteomas sólo el NaF fue capaz de

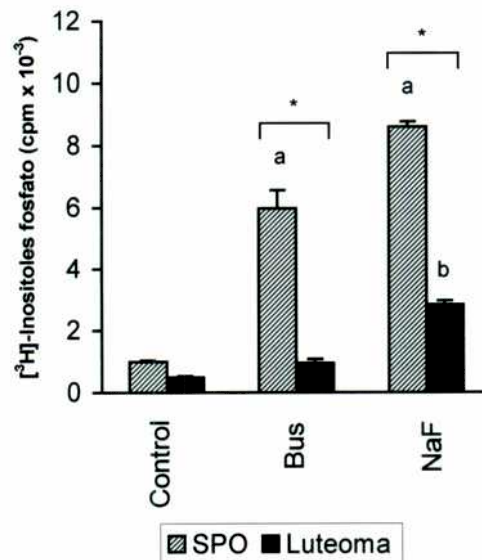


Figura IV.8. Efecto de la estimulación durante 30 minutos con buserelina (Bus: 100 ng/ml), y NaF (10 mM) sobre los inositoles fosfato totales (cpm × 10⁻³) en cultivos primarios de células de luteoma y SPO. Las células fueron marcadas con 4 μCi [³H]inositol y preincubadas con LiCl (20 mM). Los resultados representan el promedio de 5 experimentos. El análisis de varianza múltiple para medidas repetidas indicó interacción, $p < 0.01$. Para ésta y las siguientes figuras: *: diferencias significativas entre tipos celulares para un determinado estímulo. a: diferencias significativas con respecto a valores control en células SPO. b: significativamente distinto de niveles control en células de luteoma. En todos los casos $p < 0.05$ o menor.

inducir un aumento significativo de los inositoles fosfato totales ($p < 0.05$). El porcentaje de incremento inducido por NaF en las células SPO fue significativamente mayor que el observado en las células de luteomas (SPO: 950 ± 132 % vs LUTEOMA: 700 ± 106 %, $p < 0.05$). Cuando se analizó el efecto de la buserelina y del NaF sobre los inositoles fosfato individuales (InsP, InsP₂ o InsP₃), formados al hidrolizarse los fosfatidil inositoles en ambos tipos celulares, se observó que tanto la buserelina como el NaF inducían aumentos significativos de cada uno de ellos en las células control (Fig. IV.9). Nuevamente se observó el efecto dependiente de la concentración (1 ng/ml y 100 ng/ml) tanto en InsP, InsP₂ como en InsP₃ (no se muestra). En las células de los luteomas el NaF incrementó significativamente los tres inositoles fosfato, mientras que la buserelina no afectó a ninguno de ellos. Es interesante observar que el mayor incremento porcentual por sobre los valores basales inducido por buserelina se observó en InsP₂, mientras que el NaF que estimula la proteína G directamente indujo el máximo aumento porcentual en el InsP₃ (Tabla IV.2). Es más, el aumento porcentual inducido por NaF en InsP₃ fue muy similar en ambos tipos celulares (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Porcentaje de incremento en InsP, InsP₂ e InsP₃ con respecto a los niveles control (100%) en cultivos de células de luteoma y SPO luego de 30 min. de incubación con diferentes estímulos.

		InsP %	InsP ₂ %	InsP ₃ %
SPO	Buserelina	$489 \pm 78^{*.a}$	$736 \pm 118^{*.a}$	$537 \pm 56^{*.a}$
	NaF	$862 \pm 81^{*.a}$	$638 \pm 90^*$	$1037 \pm 78^*$
LUTEOMA	Buserelina	165 ± 15	227 ± 25	205 ± 29
	NaF	$528 \pm 39^*$	$625 \pm 159^*$	$925 \pm 89^*$

Se realizó análisis de la varianza múltiple para medidas repetidas para cada inositol fosfato. *: significativamente diferente del control en cada tipo celular. a: niveles significativamente distintos de las células de luteoma. En todos los casos $p < 0.05$ o menor.

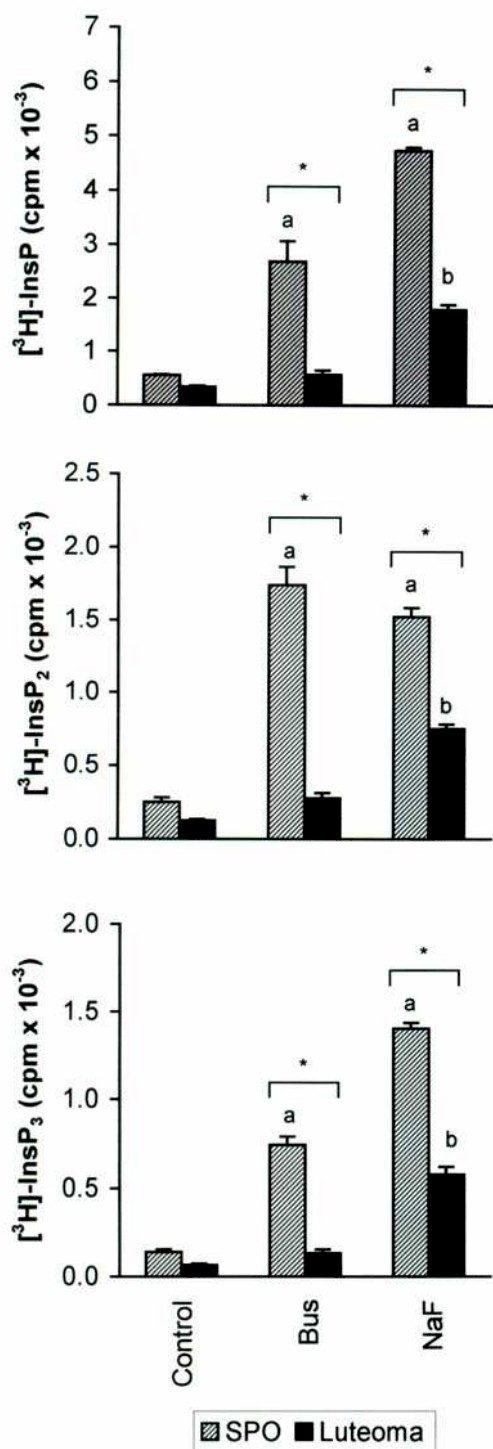


Figura IV.9. Efectos de busserelina (Bus: 100 ng/ml) y NaF (10 mM) sobre InsP (panel superior), InsP₂ (panel medio) e InsP₃ (panel inferior) en cultivo primario de células de luteoma y SPO. Iguales condiciones que en la figura 7. Los resultados representan la media de 3 experimentos. El análisis de varianza múltiple para medidas repetidas indicó interacción, $p < 0.01$ o menor, para cada inositol fosfato.

Aunque no se observaron diferencias en los niveles basales de los inositoles totales o de cada uno de ellos por separado, según el tipo celular, se determinó una diferencia significativa en los niveles de inositol libre, siendo aproximadamente 10 veces mayores en las SPO (Fig. IV.10). Esta diferencia no puede deberse a una distinta incorporación del inositol tritiado, ya que no se

observan diferencias a este nivel [LUTEOMA: 300.346 ± 27.934 cpm vs SPO: 349.742 ± 17.802 cpm, (n=3), ns]; y tampoco a un distinto número de células al finalizar el experimento, puesto que el contenido de DNA, medido en los precipitados luego de la ruptura celular, era como máximo un 25% mayor en el grupo SPO. Luego de 30 minutos de incubación con los estímulos sólo se observó un descenso significativo en los niveles de inositol tritiado libre ante el estímulo de buserelina en las células SPO (Fig. IV.10). Disminuciones en los niveles de inositol libre en respuesta a agentes que activan la PLC han sido descriptos anteriormente (Davis y col. 1986). Es interesante también que el NaF, que indujo la mayor respuesta en inositoles fosfato, no alteró los niveles de inositol libre en ningún tipo celular.

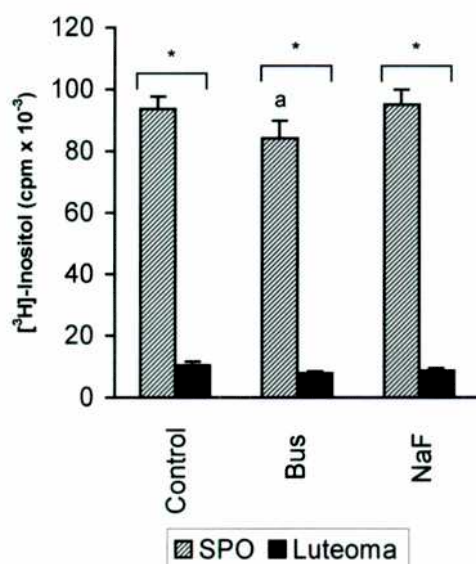


Figura IV.10. Niveles de [³H]inositol libre en células de luteoma y SPO. Los procedimientos experimentales se detallaron en las figuras 6 y 7. Los resultados representan la media de 5 experimentos. El análisis de la varianza múltiple para medidas repetidas indicó interacción, $p < 0.01$.

Para determinar si la diferencia en el inositol libre entre los dos tipos celulares se debía a una incorporación diferencial del inositol tritiado a los distintos fosfatidil inositoles de las membranas plasmáticas, éstos se midieron luego de

extraer el pellet de membranas con metanol/cloroformo por cromatografía en capa delgada, como fuera descrito previamente (Pignataro y Ascoli 1990a). Los resultados muestran que la incorporación de inositol tritiado a fosfatidil inositol (PI) está específicamente aumentada en las células de los luteomas con respecto a las SPO (radiactividad del inositol tritiado incorporado a PI respecto de la radiactividad total incorporada a fosfolípidos (en %): luteoma: 35.1 ± 1.1 vs SPO 21.9 ± 1.0 , $p < 0.05$). Este aumento del inositol incorporado al PI en las células de luteomas justificaría los bajos niveles de inositol libre cuantificado en las mismas.

IV.4. Discusión

En los capítulos anteriores hemos establecido la participación del GnRH en el control de la función endocrina de estos tumores experimentales, indicando un efecto directo sobre el mismo además de su efecto a través de la modulación de gonadotrofinas. Las células de los luteomas fueron más sensibles a la inhibición del GnRH sobre la producción de progesterona inducida por un estímulo de LH, que las células lúteas control, en las condiciones experimentales estudiadas. Las diferencias encontradas entre ambos tejidos, nos impulsaron a estudiar las causas de las mismas, particularmente a nivel de los receptores y de los mecanismos de acción del decapeptido en los tejidos lúteo control y luteoma.

En tejido ovárico ya han sido descritos receptores para GnRH (Harwood y col. 1980a; Peng y col. 1994; Whitelaw y col. 1995) y nosotros hemos determinado su presencia en los luteomas experimentales (Capítulo III). En este último capítulo el interés fue comparar el número y la afinidad de los receptores para GnRH en los tumores con respecto al tejido control (ovarios de animales prepúberes y ovarios de animales prepúberes superovulados por estimulación con gonadotrofinas, tejido lúteo clásico). Se observaron diferencias significativas entre los grupos en el número de sitios del receptor, aunque no en sus Kds. El número de receptores de GnRH ovárico en los animales prepúberes sin estimulación gonadotrófica fue significativamente mayor que en aquellos con tratamiento de gonadotrofinas. Esto está de acuerdo con resultados previos que indican que durante la maduración sexual se encuentran sitios de unión de GnRH en ovario a los diez días de edad y alcanzan niveles máximos al día 20, declinando posteriormente a niveles constantes en la edad adulta (60 días) (Harwood y col. 1980a). Coincide también con las observaciones realizadas en hipófisis, donde la presencia de

receptores es máxima en el período previo al desarrollo puberal (Dalkin y col. 1981; Lacau-Mengido y col. 1998; White y Ojeda 1981). Por otro lado, el número de receptores en el tejido del luteoma fue significativamente mayor que en los ovarios provenientes de las ratas prepúberes tratadas con PMSG-hCG, a pesar de que ambos tejidos se encuentran bajo la influencia de niveles de gonadotrofinas muy elevados. La diferencia encontrada en el número de receptores podría justificar una mayor sensibilidad de las células del luteoma a la acción del GnRH. Teniendo en cuenta las observaciones efectuadas en el capítulo anterior, es importante destacar que en el tumor, el número de receptores de GnRH por mg de tejido no aumenta con respecto al ovario en estro implantado inicialmente, sino que se mantiene constante a pesar de los altos niveles de gonadotrofinas existentes en estos animales. Esto muestra una diferencia con lo que ocurre en el tejido control, donde el número de receptores de GnRH en los ovarios prepúberes cae muy significativamente luego del tratamiento con PMSG-hCG.

Siguiendo con estos estudios, se analizaron los efectos del GnRH sobre el aumento de los segundos mensajeros clásicamente generados por el péptido: inositoles fosfato y calcio (Leung y Steele 1992; Leung y Wang 1989; Lahav y col. 1988). El objetivo fue establecer si el incremento en el número de receptores estaba asociado a un aumento en la formación de segundos mensajeros. La buserelina, en una dosis que fuera máxima para ejercer su acción endocrina, indujo una respuesta típica en movilización de calcio en las células control SPO, coincidiendo con resultados de otros laboratorios (Anderson y col. 1996; Rodway y col. 1991; Currie y col. 1992). Sorprendentemente, en las células tumorales no se observó respuesta alguna. Por otro lado, un estímulo máximo de hCG fue capaz de inducir un incremento transitorio de calcio en las células SPO, aunque de menor intensidad que el

inducido por busserelina. El efecto de LH (ó hCG) sobre la movilización de calcio es controvertido. Si bien el mecanismo clásico de la acción de LH implica la estimulación de adenilato ciclasa y la consecuente producción de AMPc (Leung y Steele 1992), la regulación por LH de la esteroidogénesis puede ser ejercida a través de la estimulación de múltiples vías. La activación de la PLC y los incrementos del calcio intracelular han sido involucrados en la acción de gonadotrofinas en el ovario en distintas especies incluyendo ratón, cerdo, gallina y bovinos (Davis y col. 1987; Asem y col. 1987; Flores y col. 1991; Gudermann y col. 1992). En otras especies como oveja y rata la LH no mostró la inducción de picos transitorios de calcio en el ovario (Wiltbank y col. 1989; Wang y col. 1989; Davis y col. 1986), aunque se observaron incrementos en la formación de InsP_3 luego del tratamiento con LH (Davis y col. 1989; Jacobs y col. 1991). En nuestras condiciones experimentales, hCG indujo incrementos de calcio intracelular significativos en células SPO a distintas concentraciones (1×10^{-12} a 1×10^{-9} M, no representado). Nuevamente no observamos efectos sobre el calcio intracelular en las células tumorales por la estimulación con hCG. Para evaluar la posibilidad de que la falta de movilización de calcio en las células del luteoma se debiera a una deficiencia en la disponibilidad de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares, se ensayaron las células en presencia de tapsigargina. La tapsigargina es un inhibidor específico de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (Putney y Bird 1993) y por lo tanto induce aumento del calcio citosólico debido a la salida de calcio de los compartimentos intracelulares, por un mecanismo independiente de la activación de PLC. En células ováricas de rata se observó inducción de la liberación de calcio por esta droga (Anderson y col. 1996; Pepperell y Behrman 1990). En nuestro caso, ambos tipos celulares respondieron a $0.5 \mu\text{M}$ de tapsigargina mostrando incrementos de calcio intracelular. Los niveles

alcanzados en las células de luteomas fueron significativamente mayores que los observados en células SPO, indicando que las reservas de calcio sensibles a taptisargina en células de luteoma se encuentran aumentadas con respecto a las células control. Por lo tanto, esta resistencia al incremento de los niveles de calcio intracelular podría ser una adaptación de las células de los luteomas para mantener los niveles de calcio bajos. De hecho, incrementos de calcio intracelular, producidos por GnRH o $\text{PGF}_{2\alpha}$, se han propuesto como inductores de muerte celular en tejido ovárico (Niswender y col. 1994; Billig y col. 1994; Sawyer y col. 1990), lo cual impediría el crecimiento tumoral. Sin embargo, mediante el empleo de ATP y AVP, pudimos demostrar que la fosfolipasa C se mantiene activa en las células de los luteomas. Tanto el ATP (Morley y col. 1994; Morley y col. 1996) como el AVP (Ascoli y col. 1989) han sido descritos como agentes inductores de calcio actuando a través de la PLC sobre el calcio del retículo endoplasmático; y fueron capaces de producir un pico transitorio de calcio en nuestro modelo tumoral. De esto se deduce que la falta de respuesta de Ca^{2+} es específica ante determinados estímulos como los citados arriba.

En las células del luteoma, la falta de respuesta a buserelina, en cuanto a movilización de calcio, no es una observación aislada dado que coincide con nuestros resultados sobre la hidrólisis de fosfolípidos. Aún cuando ambos tipos celulares tienen niveles basales similares de inositoles fosfato, el agonista de GnRH y el NaF inducen incrementos significativos en células SPO mientras que sólo el NaF puede lograrlo en las células tumorales. El NaF es un activador de las proteínas G acopladas a fosfolipasa C como sustituto para una guanosina trifosfato endógena (Davis 1992; Davis y col. 1989). Por consiguiente, la activación de la hidrólisis de fosfolípidos inducida por este agente en células de luteoma confirma que la fosfolipasa C se encuentra

activa. Más aún, cuando se expresan los resultados como porcentaje del nivel control, la cantidad de InsP_3 formada fue idéntica en células de los luteomas y de SPO ante la estimulación con NaF. En las células tumorales, la ausencia de formación de InsP_3 en cantidades significativas, en respuesta a busserelina correlaciona con la falta de movilización de calcio observada en dichas células bajo este estímulo. En las células SPO control, la busserelina indujo un incremento dependiente de la concentración en los tres inositoles fosfato, de acuerdo a lo esperado según la liberación de calcio observada con este tratamiento.

Vistos en conjunto, estos resultados sugieren un desacople de los receptores de membrana de GnRH y LH de la PLC en las células de los luteomas, como se evidencia por la falta de respuestas tanto en calcio como en inositoles fosfato. Esto implica que la inhibición ejercida por el GnRH sobre la secreción de progesterona inducida por LH en estas células, observada en el capítulo IV, probablemente no se encuentra mediada por la clásica activación de PLC por GnRH, como fuera sugerido para las células lúteas control (Leung y Steele 1992; Leung y Wang 1989; Niswender y col. 1994; Rodway y col. 1991; Davis y col. 1986; Lahav y col. 1988). Además de la generación de inositol(es) fosfato que movilizan calcio y de DAG que activa la PKC, han sido propuestos mecanismos alternativos para la acción del GnRH. Se observó que el GnRH causa la acumulación de ácido araquidónico en células ováricas (Minegishi y Leung 1985; Minegishi y col. 1987). El ácido araquidónico puede ser generado por dos caminos diferentes: por la acción consecutiva de PLC y lipasa de DAG, o a través de la acción de fosfolipasa A_2 (PLA_2) sobre la posición *sn*-2 de varios fosfolípidos. PLA_2 se encuentra en el ovario (Wu y Carlson 1990; Bonney y Wilson 1993; Kol y col. 1997) y se ha demostrado que el GnRH es capaz de activar tanto la vía de PLC como de PLA_2 (Minegishi y Leung 1985; Minegishi y

col. 1987; Kawai y Clark 1986). Se ha sugerido que los incrementos de ácido araquidónico inducidos por PLA₂ pueden aumentar los niveles de progesterona (Wang y Leung 1988), aunque por otro lado un incremento en la actividad de PLA₂ provoca una disminución en la secreción de progesterona en la preñez tardía (Wu y Carlson 1990).

Otro mecanismo propuesto para la acción del GnRH, es la activación de PLD, con el consecuente incremento de ácido fosfatídico (PA) (Liscovitch y Amsterdam 1989). Entre otros efectos, PA puede ser convertido en DAG, sin un aumento concomitante de InsP₃; y DAG ha sido implicado en la activación de PKC (Goin y col. 1993; Nishizuka 1984) Esta última, a su vez, está postulada como responsable de la inhibición de la secreción de progesterona inducida por LH (Hsueh y Jones 1981).

En la literatura se encuentran diversos ejemplos que muestran que un receptor puede estar desacoplado de un sistema de segundos mensajeros, permaneciendo aún activo otro sistema acoplado al mismo. Davis (1992), mostró que aunque el éster de forbol TPA, un activador de PKC, inhibe las acciones provocadas por la estimulación del receptor de LH sobre el recambio de fosfolípidos, no impide la acumulación de AMPc y progesterona inducida por la activación de dicho receptor en células lúteas bovinas. Otro ejemplo presentado por McCann y Flint (1993), muestra que el tratamiento de tejido lúteo ovino con toxina pertussis inhibe la acción de PGF_{2α} sobre PLC, en tanto que el efecto inhibitorio de la PGF_{2α} sobre la adenilato ciclasa estimulada por LH está conservado. Por consiguiente, es posible que mientras los receptores de GnRH podrían estar desacoplados del sistema de PLC en las células de los luteomas, podrían estar aun acoplados a otros sistemas generadores de segundos mensajeros, como PLA₂ o PLD, para producir los efectos

antigonadotróficos observados. Posteriores estudios serán necesarios para determinar cuál es la/s vía/s que está involucrada.

Mientras la incorporación de [³H]inositol fue similar en ambos tipos celulares, se observó una diferencia altamente significativa en los niveles intracelulares de [³H]inositol libre. Dichos niveles fueron aproximadamente diez veces superiores en las células SPO con respecto a las células del luteoma, marcando una alteración interesante en el metabolismo de inositoles en estas células tumorales. Hemos observado un incremento importante en los fosfatidil inositoles de membrana en células de luteomas, cuando son comparados con células lúteas control, lo cual podría explicar la diferencia encontrada en [³H]inositol libre. Un metabolismo anómalo de los fosfoinosítidos en células tumorales fue informado previamente, como por ejemplo en la línea celular MA10 proveniente de un tumor de células de Leydig (Pignataro y Ascoli 1990a; Pignataro y Ascoli 1990b). El metabolismo particular de los fosfoinosítidos en células de los luteomas será tema de futuras investigaciones.

En conclusión, nuestros datos proveen una clara evidencia de que la transformación del ovario en un luteoma implica la adquisición de nuevas características en los receptores y sistemas de segundos mensajeros acoplados, en comparación con el tejido lúteo control. Las células del luteoma poseen receptores de GnRH que no disminuyen ante la hipergonadotrofinemia, pero que se encuentran desacoplados de su clásico sistema generador de segundos mensajeros: la fosfolipasa C. La incorporación del inositol a los fosfolípidos de membrana se encontraría también notoriamente alterada en dichas células. La mayor intensidad en la inhibición de la secreción de progesterona provocada por un análogo de GnRH en células de luteoma tratadas con LH con respecto a células SPO, descrito anteriormente, podría

deberse a un número incrementado de receptores de GnRH, aunque probablemente acoplados a otros sistemas generadores de segundos mensajeros en los que no participarían ni los inositoles fosfato, ni el calcio intracelular.

Conclusiones

- 1) Los luteomas experimentales poseen un mayor número de receptores de GnRH que los ovarios control (SPO), lo que podría justificar el mayor efecto hormonal en este tejido.
- 2) Los receptores para GnRH en las células de los luteomas se encuentran desensibilizados:
 - A pesar de tener mayor número de receptores, la liberación de calcio por buserelina está inhibida.
 - No se observa aumento de inosítoles fosfato ante el estímulo con el análogo de GnRH.
- 3) En las células de los luteomas, tanto la proteína G como la PLC se encuentran activas, como lo evidencian la estimulación con NaF, AVP o ATP.
- 4) La falta de movilización de calcio por hCG en los luteomas, indica que sus receptores sufren "downregulation" o desensibilización.
- 5) En los luteomas, las alteraciones descritas en la vía de segundos mensajeros del GnRH no explican el mayor efecto endocrino observado.

Discusión General

En los estudios aquí presentados empleamos como modelo de investigación, un tumor experimental ovárico. El mismo se desarrolla a partir del injerto de un ovario en el bazo de una rata hembra adulta castrada bilateralmente. La nueva situación anatómica en la que se encuentra la gonada determina una regulación neuroendocrina particular. El ovario injertado secreta a la sangre portal hepática. Consecuentemente, los esteroides son inactivados en el hígado. La falta de retroalimentación negativa de las hormonas gonadales lleva a la hipergonadotrofinemia, la que provoca el desarrollo y mantenimiento de un tumor lúteo.

Hemos caracterizado el modelo en lo que respecta a su crecimiento, agresividad (o malignidad), patrón hormonal que desarrolla el animal por su presencia y los mecanismos implicados en la regulación del crecimiento y secreción tumoral.

Los resultados indican que los luteomas son benignos (por lo menos en los tiempos estudiados) y no modifican la apariencia de los animales portadores ni su sobrevida.

Se clasificaron estos tumores según diversas características encontrándose que los niveles de gonadotrofinas eran los que mejor definían los dos tipos de tumores encontrados. En la mayoría de los casos se trató de animales con gonadotrofinas altas y tumores *Grandes*; se observó la existencia minoritaria de animales portadores de luteoma en los cuales no se produjo en ningún momento la hipergonadotrofinemia esperable. Coincidiendo con esta observación los tumores desarrollados en esas ratas alcanzaron un volumen significativamente menor (grupo *Pequeño*). El mecanismo que controla el desarrollo de los tumores *Pequeños* no es tan claro, por lo tanto se centralizó el estudio en los tumores *Grandes*.

El patrón de secreción de FSH en los animales con tumor *Grandes* es muy llamativo y según estudios preliminares a tiempos cortos podría correlacionarse inversamente con los niveles de inhibina, factor producido por el ovario y también por el tumor, que inhibe la síntesis y secreción de FSH.

Se encontraron diferencias en la secreción esteroidogénica basal con respecto al ovario normal que estaría indicando una posible alteración en las vías de síntesis de esteroides en los luteomas.

Determinamos efectos antitumorales del GnRH, puesto que el tratamiento crónico con buserelina (análogo de GnRH) redujo marcadamente la aparición de tumores e inhibió su crecimiento.

La eficiencia del tratamiento de los luteomas con buserelina se debe a su acción a dos niveles: 1) hipofisario, por la disminución en el número de sus receptores y la supresión de LH y FSH y 2) tumoral, dada la existencia de receptores para GnRH en el tejido, aun en presencia de altas gonadotrofinas, haciendo del modelo un importante elemento para el estudio de los efectos antitumorales del GnRH. La acción directa del decapeptido se puso en evidencia por la inhibición que produce la buserelina sobre la secreción de progesterona inducida por LH. Dicha inhibición, de mayor magnitud que en el tejido control, mostró una diferencia en la sensibilidad al GnRH entre los luteomas y el tejido lúteo control.

El mecanismo de acción clásico postulado para el decapeptido es a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC), induciendo la formación de inosítoles fosfato y diacilglicerol DAG, con posterior movilización de calcio intracelular. El estudio de los mecanismos de acción del GnRH puso en evidencia alteraciones en los sistemas generadores de segundos mensajeros acoplados a su receptor en el tejido tumoral (ausencia de movilización de calcio y de formación de inosítoles fosfato). Comprobamos la presencia de reservas de

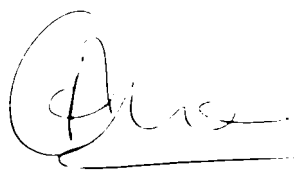
calcio dentro del retículo endoplásmico en las células tumorales y su movilización con agentes inductores de PLC, avalando la hipótesis de un desacople del receptor de GnRH a la activación de la fosfolipasa C. Los efectos encontrados sobre la secreción esteroidea se deberían a la activación de alguna vía alternativa de segundos mensajeros que queda aun por determinar, y que podría ser, por ejemplo, la activación de la vía de fosfolipasa A₂ y/o de fosfolipasa D.

El tumor experimental ovárico empleado en nuestros trabajos es un modelo adecuado para profundizar sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo y la regulación de algunos tumores ováricos, particularmente los que se desarrollan en respuesta a la hipergonadotrofinemia y presentan actividad endocrina. El importante efecto inhibitorio que demostró el análogo de GnRH sobre el desarrollo de este tumor experimental de ovario sugiere un potencial uso de este tipo de tratamiento, no agresivo ni tóxico, en tumores de ovario hormono-dependientes. El modelo provee además gran cantidad de tejido luteinizado que permite estudiar distintos aspectos de su fisiología, bioquímica y morfología en profundidad.

Es importante destacar que los trabajos aquí presentados abarcan estudios que van desde el animal entero, con sus mecanismos neuroendocrinos funcionales, hasta experimentos in vitro que aclaran aspectos subcelulares del problema planteado.

Conclusiones Generales

- 1) Los luteomas son benignos y no modifican la apariencia de los animales portadores ni su sobrevida.
- 2) La mayoría de los tumores cursan con gonadotrofinas elevadas (Tumores *Grandes*). Existe una minoría de animales portadores de luteoma en los cuales las gonadotrofinas no aumentan, desarrollándose tumores de menor tamaño (Tumores *Chicos*).
- 3) Los luteomas secretan inhibina, postulada como marcador tumoral, y esta sería un factor importante en la regulación de la secreción de gonadotrofinas fundamentalmente FSH.
- 4) La esteroidogénesis estaría alterada en este modelo.
- 5) El tratamiento crónico con un análogo de GnRH tiene un claro efecto antitumoral, mediante la inhibición de gonadotrofinas y efectos directos sobre el tumor.
- 6) El tejido tumoral presenta receptores para GnRH que están desacoplados de la vía clásica de segundos mensajeros: fosfolipasa C.





Referencias

1. Amsterdam A, Rotmensch S, Ben Zeév A 1989 Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell model. *Trends Biol.Sci.* 14:377-382.
2. Anderson JM, Yasumoto T, Cronin MJ 1987 Intracellular free calcium in rat anterior pituitary cells monitored by FURA-2. *Life Sci.* 41:519-526.
3. Anderson L, Hillier SG, Eidne KA, Miro F 1996 GnRH-induced calcium mobilisation and inositol phosphate production in immature and mature rat ovarian granulosa cells. *J.Endocrinol.* 149:449-456.
4. Ascoli M, Pignataro OP, Segaloff DL 1989 The Inositol Phosphate/Diacylglycerol pathway in MA-10 Leydig tumor cells. *J.Biol.Chem.* 264(12):6674-6681.
5. Asem EK, Molnár M, Hertelendy F 1987 Luteinizing hormone-induced intracellular calcium mobilization in granulosa cells: comparison with forskolin and 8-Bromo-Adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 120(3):853-859.
6. Aten RF, Polan ML, Bayless R, Behrman HR 1987 A gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-like protein in human ovaries: similarity to the GnRH-like ovarian protein of the rat. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 64:1288-1293.
7. Basset DL 1943 The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am.J.Anat.* 73:251-291.
8. Behrman HR, Preston SL, Hall AK 1980 Cellular mechanism of the antigonadotropic action of luteinizing hormone-releasing hormone in the corpus luteum. *Endocrinology* 107:656-664.
9. Billig H, Furuta I, Hsueh AJW 1993 Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133:2204-2212.
10. Billig H, Furuta I, Hsueh AJW 1994 Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in Situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134(1):245-252.
11. Birnbaumer L, Shahabi N, Rivier Y, Vale W 1985 Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 116:1367-1370.
12. Biskind M, Biskind G 1944 Development of tumors in the rat ovary after transplantation into the spleen. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 55:176-179.
13. Biskind MS, Biskind GS 1949 Experimental ovarian tumors in rats. *American Journal of Clinical Pathology* 19:501-525.
14. Bonney RC, Wilson CA 1993 Hormonal control of ovarian phospholipase A₂ activity in rats. *J.Reprod.Fertil.* 99:201-208.
15. Brown-Grant K, Exley D, Naftolin F 1970 Peripheral plasma estradiol and luteinizing hormone concentrations during the estrous cycle of the rat. *J.Endocrinol.* 48:295-296.
16. Bruckner HW, Motwani B 1989 Treatment of advanced refractory ovarian carcinoma with a gonadotropin-releasing hormone analogue. *Am J Obstet Gynecol* 161:1219-1218.
17. Burton K 1956 A study of conditions and mechanisms of the diphenyl amine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J.* 62:315-317.
18. Casagrande JT, Pike MC, Ross RK, Louie EW, Roy S, Henderson BE 1979 "Incessant ovulation" and ovarian cancer. *The Lancet* 2:170-173.

19. Chamson-Reig A, Lux-Lantos VAR, Tesone M, Libertun C 1997 GnRH receptors and GnRH endocrine effects on luteoma cells. *Endocrine* 6(2):165-171.
20. Chang SCS, Jones JD, Ellefson RD, Ryan KJ 1976 The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol.Reprod.* 15:321-328.
21. Chico A, García JL, Matias-Guiu X, Webb SM, Rodriguez J, Prat J, Calaf J 1995 A gonadotrophin dependent stromal luteoma: a rare cause of post-menopausal virilization. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 43(5):645-649.
22. Clark MR, Thibier C, Marsh JM, LeMaire WJ 1980 Stimulation of prostaglandin accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology* 107(1):17
23. Clark RG, Holder AT 1984 Ovarian-splenic autotransplantation: evidence that oestrogen does not inhibit hepatic somatomedin generation. *J.Endocrinol.* 103:43-47.
24. Clayton RN, Catt KJ 1981 Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr.Rev.* 2 :185-209.
25. Clayton RN, Harwood JP, Catt KJ 1979 Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282:90-92.
26. Coppes MJ, Ye Y, Rackley R, Zhao XI, Liefers GJ, Casey G, Williams BRG 1993 Analysis of WT1 in granulosa cell and other sex cord-stromal tumors. *Cancer Res.* 53:2712-2714.
27. Cramer DW, Welch WR 1983 Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J.Natl.Cancer Inst.* 71(4):717-721.
28. Currie WD, Li W, Baimbridge KG, Yuen BH, Leung PCK 1992 Cytosolic free calcium increased by prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), gonadotropin-releasing hormone, and angiotensin II in rat granulosa cells and PGF_{2α} in human granulosa cells. *Endocrinology* 130:1837-1843.
29. Dalkin AC, Bourne GA, Pieper DR, Regiani S, Marshall JC 1981 Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology* 108:1658-1664.
30. Davis JS 1992 Modulation of luteinizing hormone-stimulated inositol phosphate accumulation by phorbol esters in bovine luteal cells. *Endocrinology* 131:749-757.
31. Davis JS, Tedesco TA, West LA, Maroulis GB, Weakland LL 1989 Effects of human chorionic gonadotropin, prostaglandin F_{2α} and protein kinase C activators on the cyclic AMP and inositol phosphate second messenger systems in cultured human granulosa-luteal cells. *Molec.Cell.Endocrinol.* 65:187-193.
32. Davis JS, Weakland LL, Coffey RG, West LA 1989 Acute effects of phorbol esters on receptor-mediated IP₃, cAMP, and progesterone levels in rat granulosa cells. *Am.J.Physiol.* 256:E368-E374
33. Davis JS, Weakland LL, Farese RV, West LA 1987 Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in isolated bovine luteal cells. *J.Biol.Chem.* 262(18):8515-8521.
34. Davis JS, West LA, Farese RV 1986 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphates and diacylglycerol in rat granulosa cells: further evidence for the involvement of Ca²⁺ and protein kinase C in the action of GnRH. *Endocrinology* 118:2561-2571.

35. de Wolff-Exalto EA 1982 Influence of gonadotrophins on early follicle cell development and early oocyte growth in the immature rat. *J.Reprod.Fertil.* 66:537-542.
36. Deis RP, Alonso N 1985 The role of estrogen in prolactin release induced by progesterone in pseudopregnant rats. 307-314. In: Prolactin. Basic and clinical correlates. RM McLeod, MO Thorner, U Scapagnini (eds.), Liviana Press, Padova.
37. DeSombre ER, Arbogast LY 1974 Effect of the antiestrogen CI628 on the growth of rat mammary tumors. *Cancer Res.* 34:1971-1974.
38. Dharmarajan AM, Bruce NW, Meyer GT 1985 Quantitative ultrastructural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. *Am.J.Anat.* 172:87-99.
39. Driancourt MA, Gougeon A, Royère D, Thibault C 1993 Ovarian Function 281-305. In: Reproduction in Mammals and Man. C Thibault, MC Lévassieur (eds.), R.H.F. Hunter, Ellipses, Paris.
40. Dupon C, Kim MH 1973 Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione and oestradiol during the rat estrous cycle. *J.Endocrinol.* 59:653-654.
41. Edwards RG 1974 Follicular fluid. *J.Reprod.Fertil.* 37:189-219.
42. Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Brooks B, Algur N, Zylber-Haran E, Diamant YZ 1998 The origin of serum progesterone during the follicular phase of menotropin-stimulated cycles. *Human Reproduction* 13(1):9-14.
43. Emons G, Pahwa GS, Ortmann O, Knuppen R, Oberheuser F, Schulz KD 1990 LHRH-receptors and LHRH-agonist treatment in ovarian cancer: an overview. *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* 37:1003-1006.
44. Enders AC 1973 Cytology of the corpus luteum. *Biol.Reprod.* 8:158-182.
45. Farnworth PG, Robertson DM, de Kretser DM, Burger HG 1988 Effects of 31 kilodalton bovine inhibin on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in rat pituitary cells *in vitro*: actions under basal conditions. *Endocrinology* 119:233-241.
46. Fels E, Foglia VG 1960 El factor hipofisario en la tumorogenesis experimental del ovario. *Acta Physiol.Latinoamer.* 10:28-30.
47. Flores JA, Veldhuis JD, Leong DA 1991 Angiotensin II induces calcium release in a subpopulation of single ovarian (granulosa) cells. *Molec.Cell.Endocrinol.* 81 :1-10.
48. Fox SR, Smith MS 1985 Changes in the pulsatile pattern of luteinizing hormone secretion during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 116:1485-1492.
49. Frankel L 1903 Die function des Corpus Luteum. *Arch.Gynaekol.* 68:438
50. Freeman ME 1994 The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. 613-658. In: The physiology of reproduction. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press,Ltd., New York.
51. Freeman ME, Smith MS, Nazian SJ, Neill JD 1974 Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 94:875-882.
52. Fry RC, Clarke IJ, Cahill LP 1987 Changes in gonadotrophin concentrations are not necessarily involved in ovarian compensation after unilateral ovariectomy in sheep. *J.Reprod.Fertil.* 79:45-48.

53. Gaede SD, Sholley MM, Quattropani SL 1985 Endothelial mitosis during the initial stages of corpus luteum neovascularization in the cyclic adult rat. *Am.J.Anat.* 172:173-180.
54. García-Bunuel R, Brandes D 1976 Luteoma of pregnancy: ultrastructural features. *Hum.Pathol.* 7(2):205-214.
55. Gay VL, Midgley ARJr, Niswender GD 1970 Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. *Fed.Proc.* 29:1880-1887.
56. Gay VL, Tomacari RL 1974 Follicle stimulating hormone in the female rat: Cyclic release is dependent on circulating androgen. *Science.* 184:75-77.
57. Goin M, Pignataro OP, Jimenez de Asua L 1993 Early cell cycle diacylglycerol (DAG) content and protein kinase C (PKC) activity enhancement potentiates prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) induced mitogenesis in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 316(1):68-72.
58. Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT 1972 Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90:1492-1498.
59. Gore-Langton RE, Armstrong DT 1994 Follicular Steroidogenesis and its Control 571-627. In: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press, Ltd., New York.
60. Goubau S, Bond CT, Adelman JP, Misra V, Hynes MF, Schultz GA, Murphy BD 1992 Partial characterization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcript in the rat ovary. *Endocrinology* 130:3098-3100.
61. Greenwald GS, Roy SK 1994 Follicular Development and its Control. 629-724. In: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press, Ltd., New York.
62. Groome M, Illingworth P, O'Brien M, Pai R, Rodger F, Mather J, McNeilly AS 1996 Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 81:1401-1405.
63. Groome NP, O'Brien M 1993 Immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach. *J.Immunol.Methods* 165:167-176.
64. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY 1985 A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* 260(6):3440-3450.
65. Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L 1992 Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. *J.Biol.Chem.* 267:4479-4488.
66. Guerrero HE, Stein P, Asch RH, Polak de Fried E, Tesone M 1994 Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells. *Fertility and Sterility* 59:803-809.
67. Harrison RJ, Matthews LH 1951 Sub-surface crypts in the cortex of the mammalian ovary. *Proc.Zool.Soc.Lond.* 120:699-712.
68. Harwood JP, Clayton RN, Catt KJ 1980b Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. I. Properties and inhibition of luteal cell function. *Endocrinology* 107:407-413.
69. Harwood JP, Clayton RN, Chen TT, Knox G, Catt KJ 1980a Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. II. Regulation and effects on ovarian development. *Endocrinology* 107:414-421.

70. Hayes MC, Scully RE 1987 Stromal luteoma of the ovary: a clinicopathological analysis of 25 cases. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 6(4):313-321.
71. Hazum E, Nimrod A 1982 Photoaffinity labeling and fluorescence distribution studies of gonadotropin-releasing hormone receptors in ovarian granulosa cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:1747-1750.
72. Heape W 1900 The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. *Q.J.Micr.Sci.* 44:1-70.
73. Hillensjö T, LeMaire WJ 1980 Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes *in vitro*. *Nature* 287:145-149.
74. Hillier SG, Reichert LEJr, Van Hall EV 1981 Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 52:847-856.
75. Hotchkiss J, Knobil E 1994 The menstrual cycle and its neuroendocrine control. 711-749. In: The physiology of reproduction. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press,Ltd., New York.
76. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH 1984 Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr.Rev.* 5:76-126.
77. Hsueh AJW, Billig H, Tsafiriri A 1994 Ovarian follicle atresia: a hormonally controled apoptotic process. *Endocr.Rev.* 15:707-724.
78. Hsueh AJW, Erickson GF 1979 Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone: direct inhibition of ovarian steroidogenesis. *Science.* 204:854-855.
79. Hsueh AJW, Jones PBC 1981 Extrapituitary actions of Gonadotropin-Releasing Hormone. *Endocr.Rev.* 2(4):437-461.
80. Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T 1994 Gonadotropin-releasing hormone receptor in gynecologic tumors. *Cancer* 74(9):2555-2561.
81. Jacobs AL, Homanics GE, Silver WJ 1991 Activity of phospholipase C in ovine luteal tissue in response to PGF2 alpha, PGE2 and luteinizing hormone. *Prostaglandins* 41(5):495-500.
82. Jakubowiak A, Janecki A, Steinberger A 1990 Action kinetics of inhibin in superfused pituitary cells depend on gonadotropin-releasing hormone treatment. *Endocrinology* 127:211-217.
83. Jäger W, Dittrich R, Recabarren S, Wildt L, Lang N 1995 Induction of ovarian Tumors by Endogenous Gonadotropins in Rats bearing Intrasplenic Ovarian Grafts. *Tumor Biology* 16:268-280.
84. Jones PBC, Conn PM, Marian J, Hsueh AJW 1980 Binding of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: characterization, distribution, and induction by GnRH. *Life Sci.* 27:2125-2132.
85. Jones PBC, Hsueh AJW 1980 Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon luteal luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 107:1930-1936.
86. Jones PBC, Hsueh AJW 1981 Direct effect of gonadotropin releasing hormone and its antagonist upon ovarian function stimulated by FSH, prolactin, and LH. *Biol.Reprod.* 24:747-759.
87. Jones PBC, Hsueh AJW 1981 Direct stimulation of ovarian progesterone metabolizing enzyme by gonadotropin-releasing hormone in cultured granulosa cells. *J.Biol.Chem.* 256:1248-1254.
88. Joshi R, Dunaif A 1995 Ovarian disorders of pregnancy. *Endocrinol.Metab.Clin.North Am.* 24(1):153-169.

89. Kawai Y, Clark MR 1986 Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone on rat granulosa cells. *Endocr.Res.* 12:195-209.
90. Koch Y, Baram T, Hazum E, Fridkin M 1977 Resistance to enzymic degradation of LHRH analogues possessing increased biological activity. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 74:488-491.
91. Kol S, Ruutiainen-Altman K, Ben-Shlomos I, Payne DW, Ando M, Adashi EY 1997 The rat ovarian phospholipase A₂ system: gene expression, cellular localization, activity characterization, and interleukin-1 dependence. *Endocrinology* 138:322-331.
92. Kotsuji F, Winters SJ, Keeping HS, Attardi B, Oshima H, Troen P 1988 Effect of inhibin from primate Sertoli cells on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release by perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* 122:2796-2802.
93. Kullander S, Rausing A, Schally AV 1987 LHRH agonist treatment in ovarian cancer 353-356. In: Hormonal manipulation of cancer:peptides, growth factors and new (anti) steroidal agents . JGM Klijn (ed.), Raven Press, New York.
94. Lacau-Mengido IM, Becu-Villalobos D, Thyssen SM, Rey EB, Lux-Lantos VAR, Libertun C 1993 Antidopaminergic-induced hypothalamic LHRH release and pituitary gonadotropin secretion in 12 day-old female and male rats. *J.Neuroendocrinol.* 5:705-709.
95. Lacau-Mengido IM, Gonzalez Iglesias A, Lux-Lantos VAR, Libertun C, Becu-Villalobos D 1998 Ontogenic and sexual differences in pituitary GnRH receptors and intracellular Ca²⁺ mobilization induced by GnRH. *Endocrine* 8:177-183.
96. Lahav M, West LA, Davis JS 1988 Effects of prostaglandin F_{2α} and a gonadotropin-releasing hormone agonist on inositol phospholipid metabolism in isolated rat corpora lutea of various ages. *Endocrinology* 123:1044-1052.
97. Lappohn RE, Burger HG, Bouma J, Bangah M, Krans M 1992 Inhibin as a marker for granulosa cell tumor. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 71:61-65.
98. Leavitt WW, Carlson IH, Meyer RK 1971 Progesterin secretion and excretion in the ovariectomized rat bearing a luteinized ovarian graft in the hepatic portal circulation. *Endocrinology* 88:16-25.
99. LeMaire WJ, Leidner R, Marsh JM 1975 Pre and post ovulatory changes in the concentrations of prostaglandins in rat Graafian follicles. *Prostaglandins* 9:221-229.
100. Leung PCK, Steele GL 1992 Intracellular signaling in the gonads. *Endocr.Rev.* 13(3):476-498.
101. Leung PCK, Wang J 1989 The role of inositol lipid metabolism in the ovary. *Biol.Reprod.* 40:703-708.
102. Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Wolfe AMyc 1991 Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone releasing hormone pulse generation in the rat. *Rec.Prog.Horm.Res.* 47:97-153.
103. Levine JE, Ramirez VD 1982 Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 111:1439-1448.
104. Leymarie P, Martal J 1993 The Corpus Luteum from cycle to gestation. 413-433. In: Reproduction in Mammals and Man. C Thibault, MC Lévassieur (eds.), R.H.F. Hunter, Ellipses, Paris.
105. Libertun C 1980 Radioinmunoanálisis. Libertun C (ed.), Lopez Libreros, Buenos Aires.

106. Libertun C 1995 Cellular and Molecular Neurobiology. Special Issue: The Gonadotrophin Releasing Hormone Neuron. 1-176. Saavedra JM, Libertun C (eds.), Plenum Press, New York-London.
107. Liscovitch M, Amsterdam A 1989 Gonadotropin-releasing hormone activates phospholipase D in ovarian granulosa cells. *J.Biol.Chem.* 264:11762-11767.
108. Lison L 1976 Datos enumerativos. Comparación de proporciones. 307-327. In: Estadística aplicada a la biología experimental. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires.
109. Lux-Lantos VAR, Tesone M, Libertun C 1990 Ovarian follicle-stimulating hormone binding changes associated with the reinstatement of ovulatory cycles after lactation interruption in the rat. *Endocrinology* 126(2):680-686.
110. Lux-Lantos VAR, Thyssen SM, Chamson A, Libertun C 1995 Effect of a gonadotropin releasing hormone analog on an experimental ovarian tumor: direct and indirect actions. *Life Sci.* 57(3):291-300.
111. Lux VAR, Ramirex MI, Libertun C 1988 Natural and artificially-induced ovulatory models related to lactation in the rat: role of prolactin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 188:301-307.
112. Lux VAR, Tesone M, Larrea GA, Libertun C 1984 High correlation between prolactinemia, 125-I hLH binding and progesterone secretion by an experimental luteoma. *Life Sci.* 35:2345-2352.
113. Maekawa A 1990 Tumors of the Ovary 473-497. In: Pathology of Tumours in Laboratory Animals. V Turusov, U Mohr (eds.), IARC Scientific Publications, Lyon.
114. Magnus V 1901 Ovariets betning for svangerskabet med sacrligt hensyn til corpus luteum. *Nor.Mag.Laegevidensk* 62:1138
115. Marchetti B, Labrie F 1982 Prolactin inhibits pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in the rat. *Endocrinology* 111:1209-1216.
116. Massicotte J, Borgus JP, Lachance R, Labrie F 1981 Inhibition of hCG-induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in rat luteal cells by an LHRH agonist. *J.Steroid.Biochem.* 14:239-242.
117. Mayo KE 1994 Inhibin and activin. Molecular aspects of regulation and function. *Trends Endocrinol.Metab.* 5:407-415.
118. McCann TJ, Flint APF 1993 Use of Pertussis toxin to investigate the mechanism of action of prostaglandin F_{2α} on the corpus luteum in sheep. *Journal of Molecular Endocrinology* 10:79-85.
119. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC 1999 Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiol.Rev.* 79:263-323.
120. McNatty KP 1978 Follicular Fluid. 215-259. In: The vertebrate ovary. RE Jones (ed.), Plenum Press, New York.
121. McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ 1979 The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 49:687-699.
122. McNatty KP, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ 1980 Effects of luteinizing hormone on steroidogenesis by thecal tissue from human ovarian follicles in vitro. *Steroids* 36:53-63.
123. McNeilly AS 1994 Suckling and the control of gonadotropin secretion. 1179-1212. In: The physiology of reproduction. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press, Ltd., New York.

124. Minegishi T, Leung PCK 1985 Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates arachidonic acid release in rat granulosa cells. *Endocrinology* 117:2001-2007.
125. Minegishi T, Wang J, Leung PCK 1987 Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-induced arachidonic acid release in rat granulosa cells. Role of calcium and protein kinase C. *FEBS Lett.* 214:139-142.
126. Moon YS, Dorrington JH, Armstrong DT 1975 Stimulatory action of follicle-stimulating hormone on estradiol-17 β secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology* 97:244-247.
127. Moon YS, Tsang BK, Simpson C, Armstrong DT 1978 17 β -Estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle-stimulating hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 47:263-267.
128. Morley P, Chakravarthy BR, Mealing GAR, Tsang BK, Whitfield JF 1996 Role of protein kinase C in the regulation of ATP-triggered intracellular Ca²⁺ oscillations in chicken granulosa cells. *European Journal of Endocrinology* 134:743-750.
129. Morley P, Vanderhyden BC, Tremblay R, Mealing GAR, Durkin JP, Whitfield JF 1994 Purinergic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ oscillations in chicken granulosa cells. *Endocrinology* 134(3):1269-1276.
130. Mortel R, Satyaswaroop PG, Schally AW, Hamilton T, Ozols R 1986 Inhibitory effect of GnRH superagonist on the growth of human ovarian carcinoma NIH: OVCAR 3 in the nude mouse. *Gyn.Oncol.* 23:254-255.
131. Neill JD 1980 Neuroendocrine regulation of Prolactin secretion. 129-155. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*. L Martini, W Gannong (eds.), Raven Press, New York.
132. Nequin LG, Alvarez J, Schwartz NB 1979 Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biol.Reprod.* 20:659-670.
133. Nimrod A, Erickson GF, Ryan KJ 1976 A specific FSH receptor in rat granulosa cells: properties of binding in vitro. *Endocrinology* 98:56-64.
134. Nishizuka Y 1984 The role of protein kinase C in cell-surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308:693-698.
135. Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC 1994 Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol.Reprod.* 50:239-247.
136. Niswender GD, Midgley AR, Monroe SE, Reichert LE 1968 Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with anti-ovine LH serum and ovine LH-131-I. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 128:807-811.
137. Niswender GD, Nett TM 1994 Corpus Luteum and its Control in Infraprimate Species. 781-816. In: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press, Ltd., New York.
138. Nogales FF, Concha A, Plata C, Ruiz-Avila I 1993 Granulosa cell tumor of the ovary with diffuse hepatic differentiation stimulating stromal luteinization. *The American Journal of Surgical Pathology* 17(1):85-90.
139. Ohno T, Imai A, Furui T, Takashashi K, Tamaya T 1993 Presence of gonadotropin-releasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 169:605-610.
140. Olofsson JI, Conti CC, Leung PCK 1995 Homologous and heterologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in preovulatory rat granulosa cells. *Endocrinology* 136(3):974-980.

141. Oxberry BA, Greenwald GS 1982 An autoradiographic study of the binding of ¹²⁵I-labelled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotrophin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol.Reprod.* 27:505-516.
142. Palmquist Evans M, Webb MJ, Gaffey TA, Katzmann JA, Suman VJ, Hu TC 1995 DNA ploidy of ovarian granulosa cell tumors. *Cancer* 75(9):2295-2298.
143. Parmar H, Phillips RH, Rustin G, Lightman SL, Schally AV 1988b Therapy of advanced ovarian cancer with D-Trp-6-LH-RH (decapeptyl) microcapsules. *Biomed.Pharmacother.* 42:531-538.
144. Parmar H, Rustin G, Lightman SL 1988a Response to D-Trp-6-luteinizing hormone releasing hormone (Decapeptyl) microcapsules in advanced ovarian cancer. *Br Med J* 296:1229-1229.
145. Peng C, Fan NC, Ligier M, Väänänen J, Leung PCK 1994 Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 135(5):1740-1746.
146. Pepperell JR, Behrman HR 1990 The calcium-mobilizing agent, thapsigargin, inhibits progesterone production in rat luteal cells by a calcium-independent mechanism. *Endocrinology* 127:1818-1824.
147. Peters H, Byskov AG, Faber M 1973 Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse. 20-23. In: The development and maturation of the ovary and its functions. H Peters (ed.), Excerpta Medica, Amsterdam.
148. Peterson CM, Zimniski SJ 1990 A Long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist inhibits the growth of a human ovarian epithelial carcinoma (BG-1) heterotransplanted in the nude mouse. *Obstet.Gynecol* 76:264-267.
149. Pieper DR, Richards JS, Marshall JC 1981 Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology* 108:1148-1155.
150. Pignataro OP, Ascoli M 1990a Epidermal growth factor increases the labeling of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate in MA-10 leydig tumor cells. *J.Biol.Chem.* 265(3):1718-1723.
151. Pignataro OP, Ascoli M 1990b Studies with insulin and insulin-like growth factor-I show that the increased labeling of phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate is not sufficient to elicit the diverse actions of epidermal growth factor on MA-10 Leydig tumor cells. *Molecular Endocrinology* 4(5):758-765.
152. Pour PM, Redding TW, Paz-Bouza JI, Schally AV 1988 Treatment of experimental ovarian carcinoma with monthly injections of the agonist D-TRP-LH-RH: a preliminary report. *Cancer Letts* 41:105-110.
153. Putney JW Jr, Bird GStJ 1993 The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr.Rev.* 14(5):610-631.
154. Querleu D 1994 Laparoscopic surgical therapy and staging in a case of early malignant granulosa cell tumor of the ovary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 54:215-217.
155. Rao RB, Slotman B 1991 Endocrine Factors in Common Epithelial Ovarian Cancer. *Endocr.Rev.* 12:14-26.
156. Redmer DA, Christenson RK, Ford JJ, Day BN, Goodman AL 1986 Inhibin-like activity in ovarian venous serum after unilateral ovariectomy in prepubertal gilts. *Biol.Reprod.* 34:357-362.

157. Reeves JJ, Séguin C, Lefebvre FA, Kelly PA, Labrie F 1980 Similar luteinizing hormone-releasing hormone binding sites in rat anterior pituitary and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:5567
158. Richards JS 1979 Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog.Horm.Res.* 35:343-373.
159. Richards JS, Midgley ARJr 1976 Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol.Reprod.* 14:82-94.
160. Richards JS, Williams JL 1976 Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH). Regulation by LH and PRL. *Endocrinology* 99:1571-1581.
161. Rippel RH, Johnson ES 1976 Inhibition of hCG-induced ovarian and uterine weight augmentation in the immature rat by analogs of GnRH. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 152:432-436.
162. Rivier C, Vale W 1989 Immunoreactive inhibin secretion by the hypophysectomized female rat: demonstration of the modulating effect of gonadotropin-releasing hormone and estrogen through a direct ovarian site of action. *Endocrinology* 124(1):195-198.
163. Robbins SL, Cotuan RS 1987 Aparato genital femenino. 1123. In: *Patología estructural y funcional*. SL Robbins, RS Cotuan (eds.),
164. Roberts V, Barth S, Elroey A, Yen SCC 1993 Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus-luteum during the human menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 77:1402-1410.
165. Robinson JA, Goy RW 1986 Steroid Hormones and the Ovarian Cycle. 63-91. In: *Comparative Primate Biology*. Alan R. (ed.), Liss, Inc.,
166. Rodway MR, Baimbridge KG, Yuen BH, Leung PCK 1991 Effect of prostaglandin F_{2α} on cytosolic free calcium ion concentrations in rat luteal cells. *Endocrinology* 129:889-895.
167. Rossmannith WG, Liu CH, Laughlin GH, Mortola JF, Suh BY, Yen SCC 1990 Relative changes in LH pulsatility during the menstrual cycle: using data from hypogonadal women as a reference point. *Clin.Endocrinol.* 32:647-660.
168. Rothchild I 1981 The regulation of the mammalian Corpus Luteum. *Recent Prog.Horm.Res.* 37:183-298.
169. Rotten D 1993 Regulation of FSH synthesis and secretion 97-120. In: *Reproduction in Mammals and Man*. C Thibault, MC Levasseur, RHF Hunter (eds.), Ellipses, Paris.
170. Saragüeta P, Krimer ARD, Charreau EH, Tesone M 1989 Insulin regulation of steroidogenic activity in rat culture luteal cells. *J.Steroid Biochem.* 32:393-397.
171. Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD, Niswender GD 1990 Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF_{2α}. *Domest.Anim.Endocrinol.* 7:229-238.
172. Schwartz NB, Cobbs SB, Ely CA 1972 What is the function(s) of the proestrous FSH surge in the rat? 897-902. In: *Endocrinology. Proceedings of the fourth International Congress of Endocrinology*. Excerpta Medicus, Amsterdam.
173. Sharpe RM 1984 Bibliography on intragonadal hormones. *Bibliogr.Reprod.* 44:C1-C16
174. Smith MA, Vale WW 1981 Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on cytodex beads. *Endocrinology* 108:752-759.

175. Smith MS, Freeman ME, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.
176. Sokal RR, Rohlf F J 1995 Biometry. Freeman WH (ed.), Freeman, W.H. and Co, New York.
177. Stillman RJ, Williams RF, Lynch A, Hodgen GD 1983 Selective inhibition of follicle-stimulating hormone by porcine follicular fluid extracts in the monkey: effects on midcycle surges and pulsatile secretion. *Fertility and Sterility* 40(6):823-828.
178. Stojilkovic SS, Krsmanovic LZ, Spergel DJ, Catt KJ 1994 Gonadotropin- Releasing Hormone Neurons. Intrinsic pulsatility and receptor mediated regulation. *Trends Endocrinol.Metab.* 5:201-208.
179. Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ 1994 Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr.Rev.* 15(4):462-499.
180. Stouffer RL, Hodgen GD 1980 Induction of luteal phase defects in rhesus monkeys by follicular fluid administration at the onset of the menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51:669-671.
181. Tanaka Y, Ssaki Y, Nishihira H, Izawa T , Nishi T 1992 Ovarian juvenile granulosa cell tumor associated with Mafucci's syndrome. *American Journal of Clinical Pathology* 97(4):523-527.
182. Tesone M, Biella de Souza Valle L, Foglia VG, Charreau EH 1976 Endocrine function of the testis in streptozotocin diabetic rats. *Acta Physiol.Latinoamer.* 28:387-393.
183. Tily JL 1996 Apoptosis and ovarian function. *Rev.Reprod.* 1:162-172.
184. Tsafiriri A, Adashi EY 1994 Local Nonsteroidal Regulators of Ovarian Function 817-860. In: The Physiology of Reproduction. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press, Ltd., New York.
185. Tsafiriri A, Lindner HR, Zor U, Lamprecht SA 1972 In vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E₂. *J.Reprod.Fertil.* 31:39-50.
186. Tsang BK, Armstrong DT, Whitfield JF 1980 Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51:1407-1411.
187. Uilenbroek JThJ, Tiller R, De Jong FH, Vels F 1978 Specific suppression of follicle-stimulating hormone secretion in gonadectomized male and female rats with intrasplenic ovarian transplants. *J.Endocrinol.* 78:399-406.
188. Vale W, Bilezikjian LM, Rivier C 1994 Reproductive and other roles of inhibins and activins 1861-1878. In: The Physiology of Reproduction. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press, Ltd., New York.
189. Van der Schoot P, Lankhorst RR, de Roo JA, de Greef WJ 1978 Suckling stimulus, lactation and suppression of ovulation in the rat. *Endocrinology* 103:949-961.
190. Vom Saal FS, Finch CE 1986 Reproductive senescence: Phenomena and mechanisms in mammals and selected vertebrates. 2351-2413. In: The physiology of reproduction. E Knobil, JD Neill (eds.), Raven Press, Ltd., New York.
191. Wang C, Hsueh AJW, Erickson GF 1979 Induction of functional prolactin receptors by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *J.Biol.Chem.* 254:11330-11336.
192. Wang J, Baimbridge KG, Leung PCK 1989 Changes in cytosolic free calcium ion concentrations in individual rat granulosa cells: effect of

- luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 124(4):1912-1917.
193. Wang J, Leung PCK 1988 Role of arachidonic acid in luteinizing hormone-releasing hormone action: stimulation of progesterone production in rat granulosa cells. *Endocrinology* 122:906-911.
 194. Waterhouse J 1976 Cancer incidence in five continents. 15. IARC Scientific Publications, Lyons.
 195. Weiss TJ, Seamark RF, McIntosh JEA, Moor RM 1976 Cyclic AMP in sheep ovarian follicles: site of production and response to gonadotrophins. *J.Reprod.Fertil.* 46:347-353.
 196. White SS, Ojeda SR 1981 Changes in ovarian LHRH receptor content during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 108:347-349.
 197. Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smith CD, Hillier SG 1995 Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology* 136(1):172-179.
 198. Wilcox RB, Wiest RG 1960 Comparative effectiveness of progesterone and 4-pregnene-20- α -ol-3-one in the development of deciduomata. *Endocrinology* 67:281-282.
 199. Willemsen W, Kruitwagen R, Bastiaans B, Hanselaar T, Rolland R 1993 Ovarian stimulation and granulosa-cell tumour. *The Lancet* 341:986-988.
 200. Williams AT, Behrman HR 1983 Paracrine regulation of the ovary by GnRH and other peptides. *Sem.Reprod.Biol.* 1:269-277.
 201. Williams AT, Lipner H 1982 The contribution of gonadostatin (inhibin-F) to the control of gonadotropin secretion in a simulated estrous cycle in steroid-treated ovariectomized rats. *Endocrinology* 111:231-237.
 202. Wiltbank MC, Guthrie PB, Mattson MP, Kater SB, Niswender GD 1989 Hormonal regulation of free intracellular calcium concentrations in small and large ovine luteal cells. *Biol.Reprod.* 41:771-778.
 203. Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J 1996 Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinology* 137:5463-5467.
 204. Wu XM, Carlson JC 1990 Alterations in phospholipase A₂ activity during luteal regression in pseudopregnant and pregnant rats. *Endocrinology* 127:2464-2468.
 205. Wuttke W, Theiling K, Hinney B, Pitzel L 1998 Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum. *Steroids* 63 :299-305.
 206. Yano T, Pinsky J, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K, Schally AV 1994 Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:7090-7094.
 207. Yen SSC 1980 The polycystic ovary syndrome. *Clin.Endocrinol.* 12:177-208.
 208. Zeleznik AJ, Midgley AR, Reichert LEJr 1974 Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95:818-825.