

Tesis de Posgrado

Fisiopatología de un tumor ovárico experimental

Sorianello, Eleonora Mariana

2002

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:

Sorianello, Eleonora Mariana. (2002). Fisiopatología de un tumor ovárico experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3536_Sorianello.pdf

Cita tipo Chicago:

Sorianello, Eleonora Mariana. "Fisiopatología de un tumor ovárico experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3536_Sorianello.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Fisiopatología de un tumor ovárico experimental

**Autor: Lic. Eleonora Mariana Sorianello
Director: Dr. Carlos Libertun**

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

2002

**Laboratorio de Neuroendocrinología
Instituto de Biología y Medicina Experimental**

A Martin y Alex

Agradecimientos

Al Dr. Libertun, un gran investigador y persona, por brindarme la posibilidad de ingresar en su grupo de trabajo y permitir iniciarme en la ciencia bajo su tutela, por su confianza, por su entusiasmo, aliento, y sobre todo optimismo a lo largo de estos años que concurrí al laboratorio.

A la Dra. Lux, Vicky, una codirectora ejemplar, por su inconmensurable apoyo tanto en el ámbito laboral como en el personal, por su dedicación a la hora de discutir acerca de las metodologías y los resultados, por sus valiosísimos consejos, por escuchar, por luchar el día a día junto a uno y no aflojar jamás.

A Astrid, Estela, Lucas, Marina, Pablo, Paolo, Silvia y nuevamente Vicky, en estricto orden alfabético, por tantas horas excelentemente compartidas, tanto en los momentos gratos como en los difíciles. Por las amenas charlas, por las mateadas a cualquier hora, por los gratos almuerzos (para variar podríamos comer tartas o ensaladas del Norte....), por consolarme ante las fallidas marcaciones de sondas para los Northernns y los RNAs degradados, por las esperanzas junto a las electroforesis a la espera de la tan deseada banda, por los nervios compartidos en los congresos, por los tan divertidos festejos de fin de año, y por tantas cosas más.

A los becucuevinos, Damasia, Graciela, Arturo, Rita, Cecilia, Claudia, Isabel, Carolina y Jorge, también por tantas horas gratamente compartidas y ser prácticamente como parte de nuestro laboratorio.

A los otros integrantes del IByME, por su apoyo material e intelectual a la hora de las consultas.

Al IByME y al CONICET, por facilitarme una infraestructura que hizo posible el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, por su apoyo económico y por ser la institución que me formó desde mis comienzos como bióloga y luego como docente, de la cual estoy orgullosa pese a todo.

A mis padres, a Vanesa y a Omi por todo su aliento desde siempre y en todo aspecto de mi vida.

A Sonia, por como cuidar tan bien a mi Alex.

A Martin y Alex, por ser mi vida.

Resumen

El objetivo de esta tesis fue el estudio de distintos aspectos de la biología y fisiopatología de un tumor ovárico experimental altamente luteinizado (luteoma). Se analizaron parámetros relacionados a la proliferación celular, apoptosis, capacidad de síntesis esteroideogénica y de secreción del tumor. Se halló que el luteoma se desarrollaría preferentemente por hipertrofia y proliferación de células foliculares y una marcada ausencia de apoptosis. Además se detectó la síntesis de las distintas subunidades de inhibina a lo largo de 7 meses de desarrollo tumoral; se evidenciaron patrones fluctuantes a lo largo del tiempo para las subunidades β , que correlacionan estrechamente con los niveles séricos de FSH, demostrando así que tejido altamente luteinizado es capaz de producir inhibinas. Posteriormente, se estudió el camino de señalización de un análogo superactivo del GnRH, Buserelina, en células provenientes del luteoma, evidenciando que el camino clásico de transducción de señales acoplado al receptor de GnRH se encontraba alterado y hallándose los caminos alternativos activados por el decapeptido. Por otro lado, se puso de manifiesto la expresión del mRNA y del péptido de GnRH en células del luteoma, postulándose para el mismo un papel autocrino/paracrino en dicho tejido. Finalmente, evaluamos el efecto de drogas inmunosupresoras, Ciclosporina A y Dexametasona, sobre el desarrollo del tumor *in vivo* en comparación con animales con operación ficticia (Sham) a lo largo de 7 semanas. Los resultados indicaron que, a pesar de ser efectiva la inmunosupresión inducida por estas drogas sobre variables inmunológicas, las mismas no afectaron el desarrollo tumoral. A diferencia de los animales portadores del tumor, en animales Sham la Ciclosporina A indujo efectos sobre varios parámetros, sugiriendo la presencia de factor/es secretado/s por el tumor que impiden o compensan algunas de las acciones de la droga.

Estos estudios aportaron nuevos conocimientos acerca de características relacionadas al desarrollo y capacidad de síntesis y secreción del luteoma, como así también de caminos de señalización del receptor de GnRH y comportamiento del tumor bajo tratamiento con drogas inmunosupresoras.

Palabras claves:

Luteoma

Tejido lúteo

Proliferación celular/apoptosis

Inhibinas

Expresión de GnRH

Segundos mensajeros activados por GnRH

Inmunosupresión

Summary

The aim of this thesis was to study different aspects regarding the biology and physiopathology of a highly luteinized experimental ovarian tumor (luteoma). Parameters related to cellular proliferation, apoptosis, steroidogenic capacity and tumor secretion were analyzed. These demonstrated that tumors develop mainly due to proliferation of follicular cells, while a marked absence of apoptosis was also observed. In addition, synthesis of inhibin subunits was detected along 7 months of tumor growth, showing fluctuating expression of β subunits along development, tightly correlating with serum FSH levels. It was thus demonstrated that highly luteinized tissue is able to produce inhibins. The signaling pathways of a superactive analog of GnRH, Buserelin, were studied in luteoma cells, showing that the classical transduction system coupled to the GnRH receptor was markedly altered and describing the alternate pathways activated by the decapeptide in luteoma cells. Moreover, the expression of the GnRH mRNA and peptide was evidenced in luteoma cells, suggesting a possible role as an autocrine/paracrine modulator. Furthermore, the effects of immunosuppressive drugs such as Cyclosporine A and Dexamethasone were evaluated on *in vivo* tumor growth in comparison to Sham-operated animals along 7 weeks of treatment. Results showed that even though the drug-induced immunosuppression was evidenced on immunological variables, tumor growth was not altered. Marking a difference with tumor-bearing rats, in Sham animals Cyclosporin A affected various parameters, suggesting tumor secreted factor/s which would inhibit or compensate some of the drug's actions.

These studies have contributed new understanding concerning tumor characteristics related to tumor growth, synthesis and secretion capacity as well as different signaling pathways activated by GnRH and tumor behavior under immunosuppression.

Key words:

Luteoma

Luteal tissue

Cell proliferation/apoptosis

Inhibins

GnRH expression

GnRH-activated second messengers

Immunosuppression

Los resultados presentados en esta tesis de doctorado dieron origen a los siguientes trabajos que fueron publicados en revistas internacionales con arbitraje o enviados para su publicación.

1. *Actions of immunosuppressor drugs on the development of an experimental ovarian tumor.* Sorianello E., Schillaci R., Chamson-Reig A., Lux-Lantos V., Libertun C. **Exp Biol Med**, 227(8), 658-664, 2002.
2. *Development of an experimental ovarian tumor: immunocytochemical analysis.* Sorianello E., Fritz S., Beyer C., Hales D.B., Mayerhofer A., Libertun C., Lux-Lantos V. **Eur J Endocrinol**, 147(3), 387-95, 2002.
3. *GnRH signaling pathway in an experimental ovarian tumor.* Chamson-Reig A., Sorianello E., Catalano P., Fernández M., Pignataro O., Libertun C. y Lux-Lantos V. **Enviado.**
4. *GnRH mRNA and peptide expression in luteoma and control luteal tissue. Autoregulation of GnRH production.* Sorianello E., Chamson-Reig A., Catalano P., Libertun C. and Lux-Lantos, V. **Enviado.**

Abreviaturas

^{32}P : isótopo de fósforo radiactivo

^3H : tritio

3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 , Δ^4 isomerasa

ANOVA: análisis de varianza

BUS: Buserelina

Ca^{++} : ion calcio

CREM: modulador del elemento respondedor a AMPc

CsA: Ciclosporina A

CX43: connexin 43

Da: Dalton

DAG: diacilglicerol

DEPC: dietilpirocarbonato

Dex: Dexametasona

dUTP: deoxiuridinatrifosfato

FSH: hormona folículo estimulante

FSK: forskolina

G3PDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

hCG: gonadotrofina coriónica humana

HDL: lipoproteína de alta densidad

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IGF-I: factor de crecimiento insulino similar de tipo I

LDL: lipoproteína de baja densidad

LH: hormona luteinizante

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MEK: MAPK kinasa

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

P-450_{SCC}: complejo enzimático citocromo P-450

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGF2 α : prostaglandina F2 α

PHA: fitohemaglutinina

PKA: proteína kinasa A

PKC: proteína kinasa C

PLA₂: fosfolipasa A₂

PLC: fosfolipasa C

PLD: fosfolipasa D

PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol

p-MAPK: MAPK fosforilada

PMSG: gonadotrofina de yegua preñada

PRL: prolactina

PTX: toxina de Pertussis

RIA: radioinmunoanálisis

RNA_m: RNA mensajero

RT: transcripción reversa

SNAP-25: proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa

StAR: proteína de la regulación esteroideogénica aguda

t-MAPK: MAPK total

TPA: 13-acetato-12-O-tetradecanoil forbol

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*

INDICE

PARTE I: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
A. EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-OVÁRICO	6
<i>Control gonadotrófico de la esteroidogénesis.....</i>	9
B. DESARROLLO DEL CUERPO LÚTEO	11
C. CAMINO ESTEROIDOGÉNICO EN LA CÉLULA LÚTEA.....	13
a) <i>Sustratos esteroideogénicos</i>	13
b) <i>Transporte de colesterol.....</i>	14
c) <i>Conversión de colesterol a progesterona</i>	15
D. SISTEMA INHIBINA/ACTIVINA/FOLISTATINA OVÁRICO.....	16
E. TUMORES OVÁRICOS EN LA RATA	17
<i>Tumores de los cordones sexuales y del estroma.....</i>	18
MODELO EXPERIMENTAL: LUTEOMA.....	21
DESCRIPCIÓN Y OBTENCIÓN DEL MODELO.....	22
CARACTERÍSTICAS DEL LUTEOMA	24

PARTE II: OBJETIVOS Y TRABAJO EXPERIMENTAL

OBJETIVOS GENERALES	33
CAPÍTULO I ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DEL TUMOR.....	36
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
<i>Animales</i>	39
<i>Inmunocitoquímica</i>	39
<i>Apoptosis</i>	40
<i>Purificación de RNA total</i>	41
<i>Análisis de RT-PCR y secuenciación.....</i>	41
RESULTADOS.....	43
<i>Desarrollo tumoral.....</i>	43
<i>Capacidad secretora del tumor</i>	43
<i>Análisis de RT-PCR.....</i>	47
DISCUSIÓN	49
CAPÍTULO II RELACIÓN ENTRE INHIBINAS Y GONADOTROFINAS EN ANIMALES PORTADORES DE TUMOR	57
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
<i>Animales</i>	61
<i>Determinaciones hormonales: Radioinmunoanálisis (RIA) para hormonas proteicas</i>	61
<i>Hormona Luteinizante (LH)</i>	61
<i>Hormona Folículo Estimulante (FSH)</i>	63
<i>Medición de las subunidades de inhibina por Northern blot.....</i>	64
<i>Análisis estadístico</i>	65
RESULTADOS.....	66
<i>Niveles séricos de gonadotropinas en animales portadores de tumor.....</i>	66
<i>Expresión de RNA mensajero de las distintas subunidades de inhibina.....</i>	66

<i>Cuantificación de la expresión de las distintas subunidades de inhibina</i>	67
<i>Correlación entre los niveles de las subunidades β de inhibinas y las gonadotrofinas circulantes</i>	70
DISCUSIÓN	72
CAPÍTULO III VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE GNRH EN CÉLULAS DEL LUTEOMA	77
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	78
MATERIALES Y MÉTODOS	81
<i>Animales</i>	81
<i>Cultivos celulares</i>	81
<i>Expresión de proteínas G</i>	82
<i>Actividad de la fosfolipasa D</i>	83
<i>Actividad de la fosfolipasa A_2</i>	84
<i>Mediciones de AMPc intracelular</i>	85
<i>Determinación de PMAPK y MAPK por Western blots</i>	85
<i>Determinación de progesterona</i>	87
Radioinmunoanálisis de progesterona.....	87
<i>Análisis estadístico</i>	88
RESULTADOS.....	89
<i>Expresión de proteínas G en células ováricas tumorales y controles</i>	89
<i>Activación de la PLD inducida por Buserelina en células ováricas tumorales y controles</i>	90
<i>Activación de la PLA_2 inducida por Buserelina en células ováricas tumorales y controles</i>	91
<i>Efecto de Buserelina sobre la producción de AMPc en células ováricas tumorales y controles</i>	93
<i>Efecto de la Buserelina sobre la secreción de progesterona basal e inducida por hCG en células del tumor: participación de la proteína G_{10}</i>	96
<i>Participación de la protein kinasa C en el efecto inhibitorio que ejerce la Buserelina sobre la progesterona estimulada por hCG en células del tumor</i>	98
<i>Fosforilación de la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK) p44/42 inducida por Buserelina en células ováricas tumorales y controles</i>	98
<i>Efecto del pretratamiento con PMA o PTX sobre la activación de la MAPK p44/p42 inducida por Buserelina en células tumorales y SPO</i>	100
<i>Activación de la MAPK p44/p42 inducida por Buserelina en presencia de la inhibición de la adenilil ciclasa o de la adenilil ciclasa y la proteína kinasa C en células tumorales y SPO</i>	102
<i>Fosforilación de la MAPK p44/p42 inducida por AMPc en células tumorales</i>	103
DISCUSIÓN	105
CAPÍTULO IV EXPRESIÓN DE GNRH EN TEJIDO TUMORAL Y REGULACIÓN EN CÉLULAS DEL LUTEOMA	115
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	116
MATERIALES Y MÉTODOS	118
<i>Animales</i>	118
<i>Cultivo de células</i>	118
<i>Radioinmunoanálisis para GnRH</i>	119
<i>Purificación de RNA total a partir de diferentes tejidos, células tumorales y de ovarios de ratas SPO en cultivo</i>	122
<i>Cuantificación del RNAm de GnRH por RT-PCR semicuantitativa</i>	122
Transcripción reversa	122
Amplificación por PCR	123
Electroforesis y cuantificación de las bandas	124
Análisis de secuenciación del producto de PCR.....	124
Clonación del fragmento obtenido por PCR utilizando los <i>primers</i> de GnRH	125
<i>Análisis estadístico</i>	128
RESULTADOS.....	129
<i>Validación del método de RT-PCR</i>	129
<i>Expresión de RNAm de GnRH en tejidos ováricos y en el luteoma</i>	130
<i>Curvas de calibración de la RT-PCR</i>	131

<i>Niveles basales de expresión del RNAm y del péptido de GnRH en células tumorales y luteales controles</i>	133
<i>Efectos autorregulatorios del GnRH sobre la expresión de su mensajero y su péptido en células tumorales y luteales controles</i>	134
DISCUSIÓN	137
CAPÍTULO V ACCIÓN DE DROGAS INMUNOSUPRESORAS SOBRE EL DESARROLLO TUMORAL	140
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	141
MATERIALES Y MÉTODOS	144
<i>Materiales</i>	144
<i>Animales</i>	144
<i>Tratamientos</i>	144
<i>Obtención de las muestras</i>	145
<i>Parámetros hematológicos</i>	145
<i>Determinaciones hormonales</i>	146
a) Determinación de hormonas proteicas	146
Radioinmunoanálisis para LH y FSH	146
Radioinmunoanálisis para prolactina (PRL)	146
b) Determinación de hormonas esteroideas	147
Radioinmunoanálisis para estradiol	147
<i>Histología</i>	148
<i>Obtención de RNA total y Northern blotting de inhibinas</i>	148
<i>Ensayo de proliferación de timocitos en cultivo</i>	149
<i>Análisis estadístico</i>	149
RESULTADOS	151
<i>Sobrevida</i>	151
<i>Peso corporal</i>	152
<i>Parámetros inmunológicos</i>	153
<i>Niveles hormonales: gonadotrofinas, prolactina y estradiol</i>	156
<i>Volumen tumoral</i>	157
<i>Histología tumoral</i>	157
<i>Expresión del RNAm de las subunidades de inhibina en el luteoma bajo inmunosupresión</i>	158
<i>Efecto de la inhibina sobre la proliferación de timocitos en cultivo</i>	159
DISCUSIÓN	161
DISCUSIÓN GENERAL	167
CONCLUSIONES GENERALES	174
 PARTE III: BIBLIOGRAFÍA	
LISTADO DE REFERENCIAS	177

Parte I: Introducción y antecedentes

Introducción general

A. Eje hipotalámico-hipofisario-ovárico

El hipotálamo juega un papel fundamental en la regulación hormonal de la función reproductiva femenina (Carr,.1994). Actualmente se cree que el folículo destinado a ovular inicia una secuencia de eventos coordinados durante el ciclo menstrual, el cual depende de la unidad hipotálamo-hipofisaria.

El hipotálamo está conectado con la hipófisis por el sistema de vasos porta, que transporta las neurohormonas desde el cerebro hacia la glándula (Fig. 1).

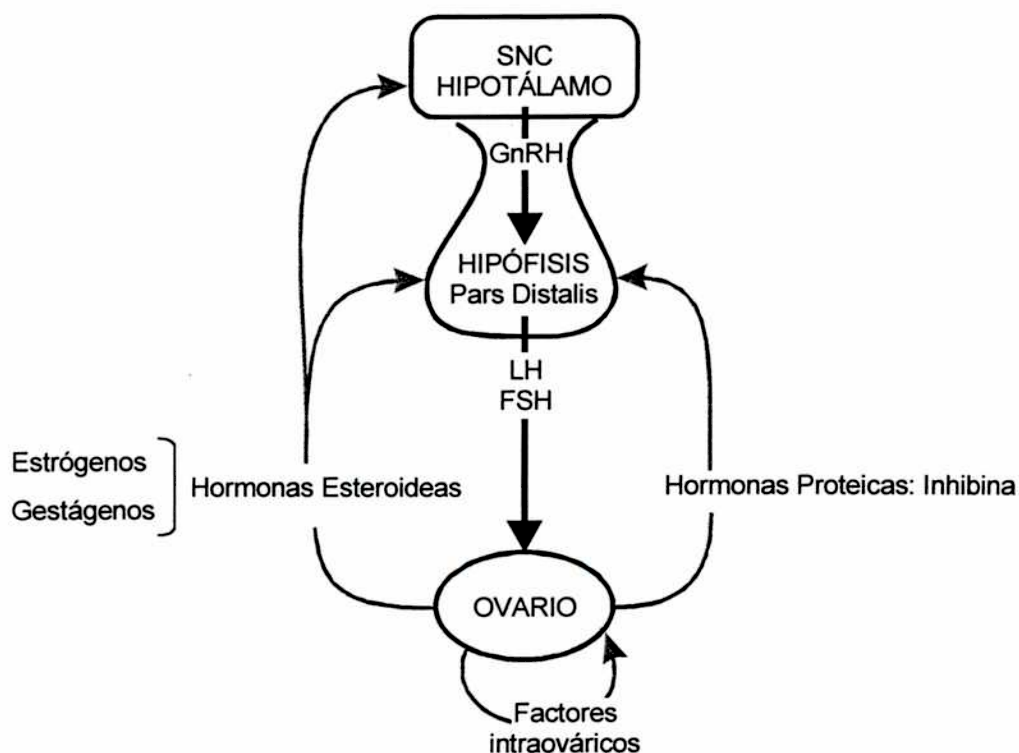


Figura 1: Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Las flechas grises representan regulaciones ováricas positivas o negativas del eje.

La dirección principal del flujo sanguíneo es desde el hipotálamo hacia la hipófisis, aunque también existe un flujo retrógrado, el cual constituye un pequeño circuito de retroalimentación negativa desde la hipófisis hacia el hipotálamo.

El principal factor liberador hipotalámico que regula la función reproductiva es el GnRH, un decapeptido. A pesar de que originalmente se haya sugerido la existencia de hormonas liberadoras diferentes para LH y FSH, la opinión actual predominante es que GnRH es la hormona liberadora de ambas gonadotrofinas. La liberación hipotalámica de GnRH está influenciada por neuronas de otras regiones del cerebro, cuyas terminales finalizan en el hipotálamo. Brevemente, y dependiendo de las circunstancias fisiológicas y fisiopatológicas, la epinefrina y norepinefrina incrementan la liberación de GnRH; GABA y péptidos opioides endógenos son inhibitorios, mientras que dopamina y serotonina pueden ser inhibitorias o estimuladoras dependiendo del estado endocrino. La neurona decapeptidérgica integra los estímulos facilitadores e inhibitorios, y libera en respuesta el neuropéptido. El GnRH es liberado en forma pulsátil, lo cual induce la secreción episódica de LH y FSH.

El GnRH regula: 1) la síntesis y el almacenamiento de gonadotrofinas, 2) la movilización de las gonadotrofinas desde las reservas hacia un *pool* fácilmente liberable y 3) la liberación inmediata de gonadotrofinas. FSH y LH son secretadas en forma coordinada para regular el crecimiento folicular, la ovulación y el mantenimiento del cuerpo lúteo. Como fuera mencionado previamente, la liberación de FSH y LH requiere de una constante liberación pulsátil de GnRH por el hipotálamo. Además, la liberación de LH y FSH está afectada positiva y negativamente por estrógenos y progesterona. Tanto los estrógenos como la progesterona estimulan o inhiben la liberación de gonadotrofinas dependiendo de

la concentración y duración de la exposición de la hipófisis a los esteroides, y de las circunstancias fisiológicas o experimentales.

Además de las hormonas esteroideas, por lo menos tres hormonas proteicas gonadales modulan la liberación de FSH: activina, inhibina y folistatina. La activina estimula la síntesis y secreción de FSH, mientras que la inhibina y la folistatina suprimen FSH por mecanismos diferentes.

Retroalimentación negativa de gonadotrofinas: los estrógenos ejercen un efecto inhibitorio tanto en el hipotálamo como en la hipófisis. La inhibición de la secreción de FSH y LH ocurre a bajos niveles de estrógenos pero es más completa a altos niveles. Progesterona a altas concentraciones inhibe a FSH y LH principalmente a nivel hipotalámico. Como hemos mencionado anteriormente, tanto la inhibina como la folistatina inhiben selectivamente la secreción de FSH.

Retroalimentación positiva de gonadotrofinas: además de una retroalimentación negativa, las hormonas gonadales ejercen un efecto positivo sobre la secreción de gonadotrofinas. La retroalimentación positiva es el evento previo en la inducción del pico de LH requerido para iniciar la ovulación, y está gatillada por un incremento abrupto en los niveles plasmáticos de estrógenos. Dos hechos son esenciales para posibilitar este mecanismo: una concentración de estradiol mayor a 200 pg/ml en la mujer ó 50 pg/ml en rata y persistencia de estos niveles elevados de estradiol por al menos 48 a 50 hs en humanos ó aproximadamente 12 h en la rata. La progesterona o alguno de sus metabolitos participarían en el desencadenamiento del pico de FSH en la mitad del ciclo. Además, la progesterona, a bajas concentraciones, estimula la liberación de LH, pero sólo luego de una prolongada exposición de la hipófisis a los estrógenos. La secreción de activina por las células de granulosa y también la sintetizada localmente en la hipófisis estimulan la secreción de FSH.

Control gonadotrófico de la esteroidogénesis

Ambas FSH y LH son requeridas para la síntesis de estrógenos, y la cantidad de estrógenos producidos depende de la exposición relativa a cada gonadotrofina, luego de haberse alcanzado las dosis efectivas mínimas de cada una de ellas. FSH es requerida para la maduración y crecimiento del folículo (Fig. 2), y los receptores de FSH están presentes

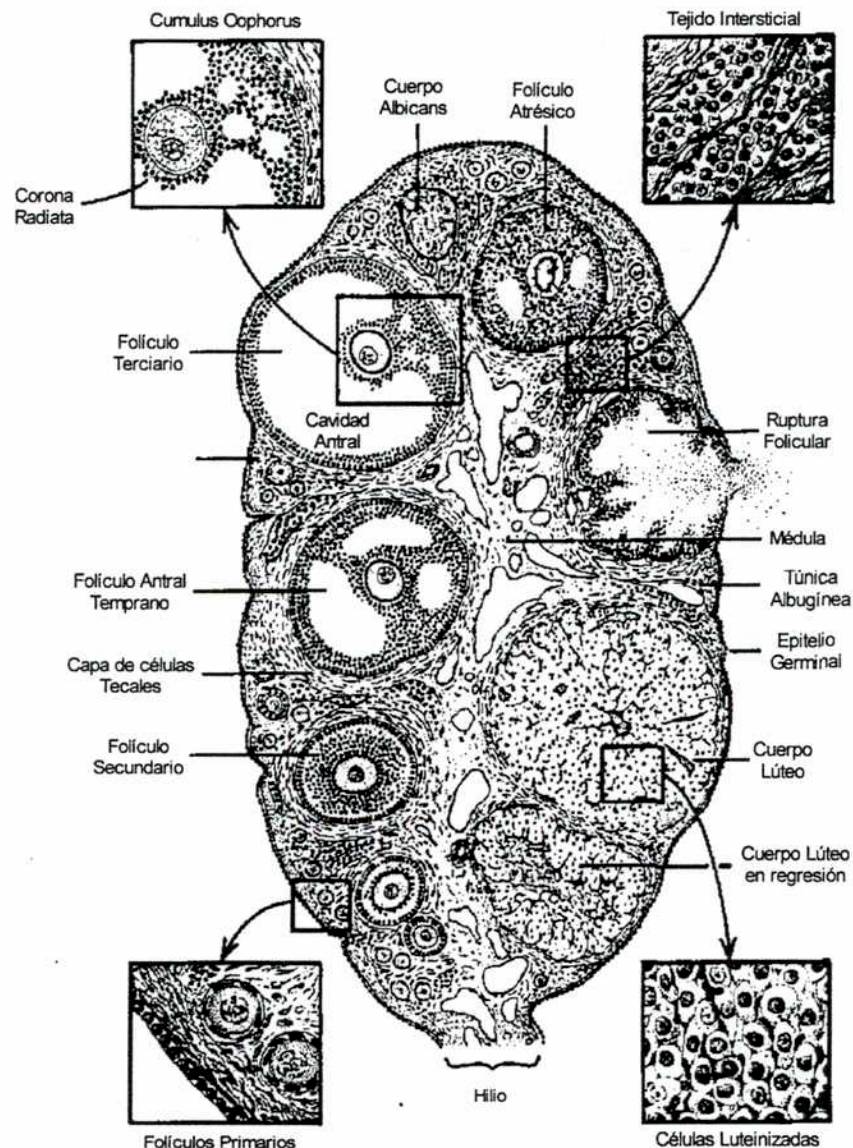


Figura 2: Corte del ovario de rata, en el cual se observan distintos estadios de desarrollo folicular, hasta la ovulación, formación del cuerpo lúteo y regresión del mismo. Modificado de: Freeman ME (1994).

exclusivamente en las células de la granulosa. La secreción incrementada de estradiol promueve una mayor proliferación de las células de granulosa y crecimiento folicular y un incremento en el número de los receptores de estradiol, incluyendo los receptores de estradiol en las células de granulosa. En el folículo maduro, FSH conjuntamente con el estradiol causa un incremento en el número de receptores de LH en las células de granulosa. LH actúa sobre estas células a través de estos receptores para aumentar la secreción de progesterona, la cual entonces incrementa la liberación de FSH y LH en la mitad del ciclo. Estas observaciones enfatizan la importancia de las acciones autocrinas y paracrinas de los esteroides.

B. Desarrollo del cuerpo lúteo

El pico preovulatorio de gonadotrofinas induce la ovulación y la diferenciación de las células foliculares residuales, las cuales forman el cuerpo lúteo y comienzan a producir progesterona a elevadas tasas (Niswender et al., 2000). Antes de producirse este evento, el esteroide secretado principalmente por el ovario es el estradiol. Las células de la granulosa y de la teca del folículo producen coordinadamente estrógenos. Las células de la teca expresan las enzimas necesarias para convertir colesterol a andrógenos pero carecen de las enzimas necesarias para convertir andrógenos a estradiol (aromatasa). Por otro lado, las células de granulosa producen progesterona pero son incapaces de convertir pregnenolona o progesterona a andrógenos (17 α -hidroxilasa). Sin embargo, las células de granulosa son capaces de convertir andrógenos a estradiol. Entonces los andrógenos producidos por las células tecales son aromatizados a estradiol por las células de granulosa. El estradiol es importante como mitógeno y estimula la división de las células de la granulosa. El pico preovulatorio de LH resulta en la luteinización de las células de la granulosa y de la teca, y altera el camino esteroidogénico, tal que progesterona es la principal hormona esteroidea producida por cada uno de estos tipos celulares luego de la luteinización. Sin embargo, los cuerpos lúteos de numerosas especies, incluyendo humanos, cerdos y ratas, retienen la capacidad de producir estradiol.

La síntesis de progesterona es la vía esteroidogénica más sencilla en el ovario (Fig. 3). La diferenciación a células capaces de producir progesterona a altas tasas está acompañada por una expresión incrementada de las enzimas necesarias para la conversión de colesterol a progesterona, por ejemplo, el complejo enzimático citocromo P-450_{scc} (P-450_{scc}) y 3 β -

hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5, Δ^4 isomerasa (3β -HSD) y disminución de la expresión de las enzimas que convierten progesterona a estrógenos, por ejemplo citocromo P-450 17α -hidroxilasa y citocromo P-450 aromatasa.

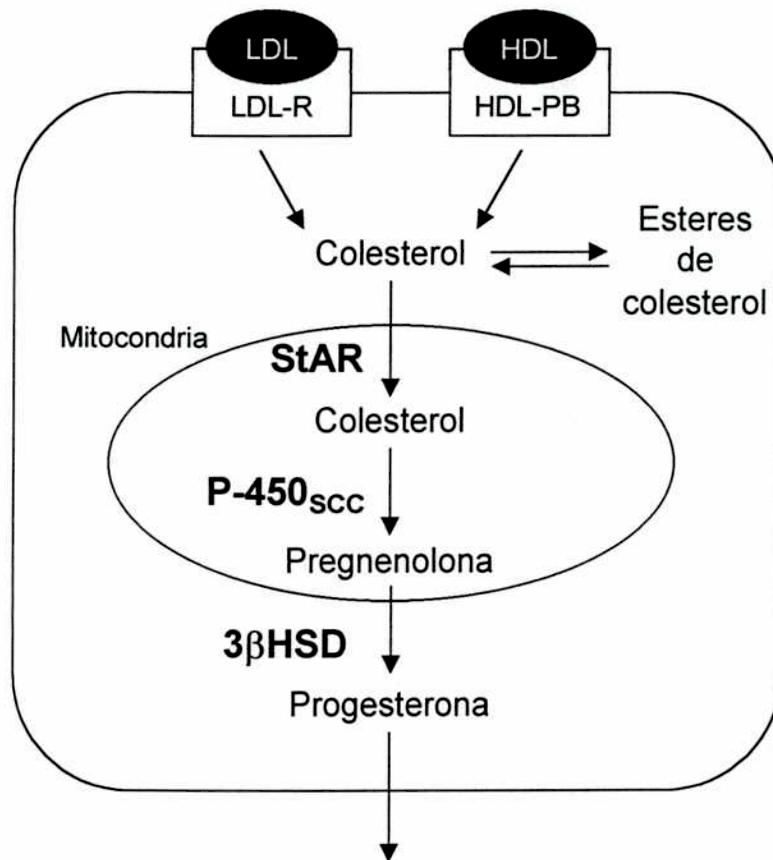


Figura 3: Camino biosintético de la progesterona en una célula lútea. Modificado de Niswender y col. (2000). LDL-R: receptor de LDL. HDL-BP: proteína ligadora de HDL.

Las células lúteas derivadas de la teca y de la granulosa dan origen a dos tipos distintos de células lúteas que difieren morfológica y fisiológicamente. En la mayoría de los primates no humanos, las células derivadas predominantemente a partir de células de granulosa han sido designadas como células luteales grandes, y aquellas derivadas de células tecales, células luteales pequeñas. Además de células esteroideogénicas, el cuerpo lúteo contiene células endoteliales, fibroblastos, pericitos y células de la sangre.

C. Camino esteroidogénico en la célula lútea

a) Sustratos esteroidogénicos

El sustrato para la esteroidogénesis es el colesterol (Fig. 3). Bajo condiciones normales, la mayoría del colesterol utilizado para esteroidogénesis en el cuerpo lúteo es obtenido a partir de la sangre en forma de lipoproteína de baja densidad (LDL) o lipoproteína de alta densidad (HDL), a pesar de que bajo condiciones de privación de lípidos, las células luteales son capaces de sintetizar colesterol a partir de acetato.

La incorporación de LDL por las células luteales ocurre mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. Una vez internalizados, los endosomas se combinan con los lisosomas, permitiendo que el LDL se disocie de su receptor y se hidrolice, generando colesterol libre disponible para la célula. El receptor de LDL se recicla o se degrada. La incorporación de HDL extracelular ocurre luego de su unión a una proteína ligadora de HDL que se encuentra en la membrana plasmática, y el colesterol es transportado hacia el interior de la célula por un mecanismo aún no determinado, que parecería no ser la endocitosis mediada por receptor.

Una vez que el colesterol libre se encuentra presente en el citoplasma de la célula, puede ser utilizado para la esteroidogénesis o la formación de membranas celulares, o puede ser esterificado con ácidos grasos para formar ésteres de colesterol por la éster sintetasa y ser almacenado. La colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol almacenados y provee a la célula de colesterol libre. Éste es uno de los primeros pasos en la esteroidogénesis que está controlado por caminos de segundos mensajeros. La colesterol esterasa se activa cuando se fosforila por la proteína kinasa A (PKA).

b) Transporte de colesterol

La síntesis de todos los esteroides depende del transporte de colesterol hacia la mitocondria y luego desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna, en donde se encuentra el complejo enzimático P-450_{SCC} que escinde la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. El transporte hacia la membrana mitocondrial externa, que constituye la primera etapa en este proceso, requiere un citoesqueleto intacto, ya que inhibidores de la función de los micortúbulos y microfilamentos previenen la acumulación mitocondrial de colesterol. El estado de fosforilación de las proteínas del citoesqueleto influye probablemente en la tasa de transporte del colesterol. Además proteínas ligadoras de esteroides parecerían tener un papel importante en el transporte de colesterol hacia la mitocondria. La estimulación de la esteroidogénesis por hormonas tróficas incrementa el transporte de colesterol a la mitocondria, éste parece ser un proceso complicado, que no puede explicarse como una simple difusión de colesterol a través del citoplasma.

El paso limitante en el camino esteroidogénico lo constituye el transporte del colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna. Este paso sería también el sitio primario de regulación aguda positiva y negativa de la esteroidogénesis por sistemas de segundos mensajeros. Se han identificado dos proteínas de peso molecular semejante (30.000 Da), cuya síntesis está asociada con una producción de esteroides aumentada en varios tejidos luego de estimulación hormonal. La fosforilación de estas proteínas está asociada con mayores incrementos de la secreción de esteroides. Dichas proteínas se localizan en la mitocondria y se generan a partir de modificaciones postraduccionales de una proteína de 37.000 Da que contiene una secuencia de localización mitocondrial. Esta proteína, denominada proteína de la regulación esteroidogénica aguda (StAR), es escindida en sus formas ácida y básica durante su inserción en la membrana mitocondrial. Se ha

hipotetizado que es durante la inserción de estas proteínas en la membrana mitocondrial, que el colesterol es transportado hacia el complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. Sin embargo, evidencias más recientes obtenidas de la delección parcial del gen StAR en el sitio correspondiente a la secuencia de localización a mitocondria, sugiere que el transporte de colesterol también ocurre con la proteína mutada. Es por ello, que el rol de la secuencia de localización a mitocondria en el transporte de colesterol no está aún esclarecida. La función crítica desarrollada por StAR en la esteroidogénesis fue claramente documentada por Lin y col. (Lin et al., 1995), quien demostró que la síntesis severamente reducida de esteroides adrenales y gonadales observada en pacientes con hiperplasia adrenal lipóide congénita, era debida a mutaciones en el gen StAR que ocurren naturalmente.

c) Conversión de colesterol a progesterona

Una vez transportada a la matriz mitocondrial, la acción de P-450_{scc} adrenodoxina, y adrenodoxina reductasa escinden la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. La pregnenolona es luego transportada hacia el retículo endoplasmático liso, el cual está usualmente en estrecha asociación con la mitocondria, en donde la enzima 3 β -HSD convierte pregnenolona en progesterona. Se cree que luego la progesterona difunde desde la célula. No hay evidencia que progesterona pueda ser almacenada en grandes cantidades en el tejido luteal. A pesar de que la progesterona es la principal hormona esteroidea secretada por el cuerpo lúteo, dependiendo de la especie y del estado reproductivo, pueden ser secretados esteroides adicionales en cantidades significativas. Además, se producen y secretan estrógenos en los cuerpos lúteos de los primates y de las ratas durante la fase lútea del ciclo menstrual o estral, respectivamente.

D. Sistema inhibina/activina/folistatina ovárico

Las subunidades de inhibina y activina están presentes en numerosos tejidos tanto de órganos endocrinos como no endocrinos (Risbridger et al., 2001). Las proteínas diméricas formadas a partir de estas subunidades son miembros de la superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación relacionados al TGF β , y fueron aisladas y caracterizadas como reguladoras de la síntesis y secreción de FSH. El sistema inhibina/activina/folistatina ovárico será tratado en detalle en el capítulo II, en el que fue estudiado.

E. Tumores ováricos en la rata

Desde el punto de vista de la histogénesis, los tumores ováricos pueden dividirse a grandes rasgos en tres clases principales: tumores epiteliales, tumores de los cordones sexuales y del estroma y tumores de las células germinales (Maekawa,.1990) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación histológica de los tumores.

1. Tumores epiteliales
Adenoma /Adenocarcinoma quístico Adenoma/carcinoma tubular Mesotelioma
2. Tumores de los cordones sexuales y del estroma
Tumor de células de granulosa (benigno/maligno) Tumor de células tecales (tecoma) Luteoma Fibroma Tumor de células Sertoli-símiles Tumor de células Leydig-símiles (tumor de las células intersticiales)
3. Tumores de las células germinales
Teratoma Coriocarcinoma Tumor del seno endodermal Disgerminoma
4. Otros tumores
Hemangioma/hemangiosarcoma Lipoma Leiomioma/leiomiosarcoma Otros tumores estromales Tumores metastásicos

La mayoría de los tumores ováricos espontáneos o inducidos en ratas derivan de elementos de los cordones sexuales y del estroma, mientras que en humanos, los tumores epiteliales son los más frecuentes. Waterhouse (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. Los tumores ováricos inducidos o espontáneos muestran esencialmente morfologías similares, a pesar de que los inducidos son más complicados anátomo patológicamente.

Tumores de los cordones sexuales y del estroma

Bajo los tumores de los cordones sexuales y del estroma encontramos los tumores de las células de granulosa, tumores de células de granulosa/teca, tumores de células tecales, luteomas y fibromas. Los tipos más comunes de tumores ováricos en casi todas las cepas de ratas los constituyen los tumores de células de granulosa o de células de granulosa/teca. Ellos muestran una variedad de tipos histológicos que van desde tumores de células de granulosa típicas a tumores de células de la teca puras. La mayoría de los tumores de células de granulosa o granulosa/teca son benignos y no evidencian abundantes figuras mitóticas. Algunos tumores de células de la granulosa contienen células poligonales grandes con abundante citoplasma eosinófilo o vacuolado, asemejándose a células luteales. Cuando los tumores están constituidos mayoritariamente por células de este tipo, se los diagnostica como luteomas, sin embargo luteomas típicos son muy poco frecuentes en rata. En mujeres se han descrito diversos tipos de tumores de granulosa que, según su clasificación histológica, incluyen los subtipos difuso, microfolicular, trabecular, juvenil o mixto (Palmquist Evans et al., 1995; Coppes et al., 1993; Querleu, 1994; Nogales et al., 1993). 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 et al., 1995). Ellos 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 descripto algunos casos de luteomas en la mujer que se desarrollan con 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 and Scully, 1987). Su aparición está correlacionada con dos situaciones fisiológicas en la mujer:

- 1) Aunque poco frecuente, en algunos casos durante el embarazo aparecen 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 and Brandes, 1976). Se trata de un tumor benigno, probablemente como consecuencia de los altos niveles de hCG. En general, luego del parto los tumores ováricos involucionan espontáneamente (Joshi and Dunaif, 1995).
- 2) En mujeres post-menopáusicas también se describieron algunos pocos casos de la presencia de estos tumores ováricos, acompañados raramente de hiperandrogenismo y virilización. En uno de ellos la administración de un análogo 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 et al., 1995).

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 et al., 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 (Waterhouse 1976a; Vom Saal and Finch, 1986; Rao and Slotman, 1991; Cramer and Welch, 1983). Últimamente 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 et al., 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).

Teniendo en cuenta entonces, que tanto en la mujer como en animales elevados niveles de gonadotrofinas sobreestiman el ovario induciendo la aparición de tumores ováricos de distintos tipos histológicos, los cuales en muchos casos son hormono-dependientes, resulta interesante el estudio de tumores en modelos animales por su posible similitud, en cuanto a desarrollo y actividad endocrina, con patologías ováricas humanas.

Modelo experimental: LUTEOMA

Descripción y obtención del modelo

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 hipergonadotropinemia (Biskind and Biskind, 1944). Para nuestros estudios empleamos este modelo animal, interesante por su posible similitud con patologías humanas, el cual fue caracterizado previamente en el laboratorio (Lux et al., 1984; Lux-Lantos et al., 1995; Chamson-Reig et al., 1997; Chamson-Reig et al., 1999a; Chamson-Reig et al., 1999b).

El luteoma se desarrolla al autoimplantar un ovario en el bazo de una rata hembra adulta, bilateralmente ovariectomizada, en la mañana del estro. Los esteroides secretados por el injerto ovárico son volcados a la vena esplénica, pasan por la circulación portal hepática, siendo degradados por el hígado. De esta manera la retroalimentación negativa, que normalmente ejercen los esteroides sobre el eje hipotálamo-hipofisario, es abolida (Fig. 4). Se establece una situación endocrina similar a la del animal castrado, es decir un marcado aumento en la secreción de LH y FSH. El ovario autotransplantado se convierte en un tumor, como resultado de la constante hiperestimulación de las gonadotropinas, que inducen el crecimiento y la actividad secretora del tumor.

Para la obtención de los luteomas, se emplearon ratas hembras vírgenes adultas de la cepa Sprague Dawley, 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 12 hs (las luces se encienden a las 7.00 hs y se apagan a las 19.00 hs),

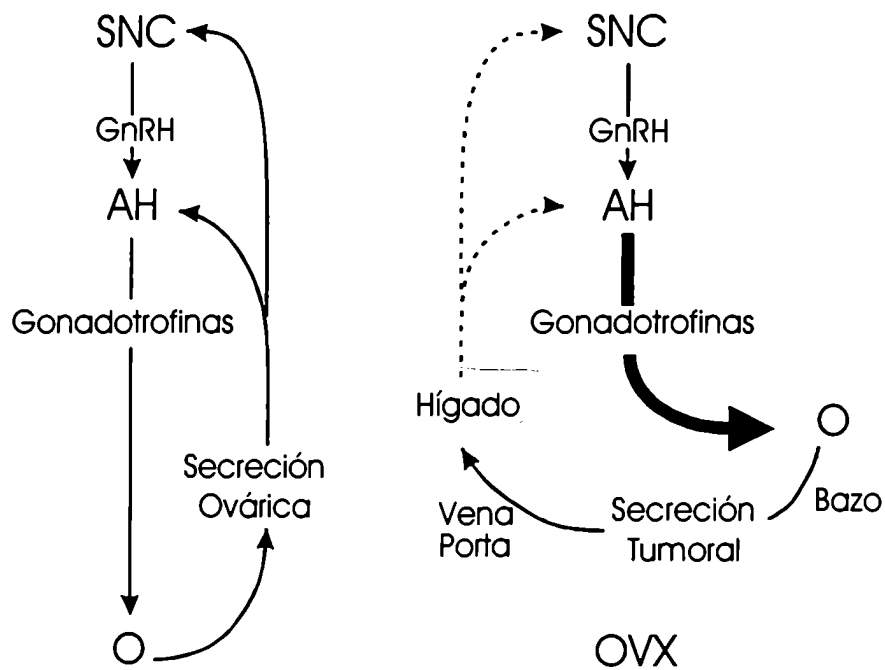


Figura 4: *Panel izquierdo:* eje hipotálamo-hipófiso-ovárico en una rata hembra entera. Retroalimentación negativa de la secreción ovárica sobre las gonadotrofinas. *Panel derecho:* rata a la que se extirparon los dos ovarios (OVX) y a la que se autoinjertó uno de ellos en el bazo (O). La secreción esteroidea del ovario intraesplénico es inactivada en el hígado, llevando a la hipergonadotrofinemia por falta de retroalimentación negativa. SNC: Sistema Nervioso Central. AH: Adenohipófisis. O: Ovario.

recibiendo alimento balanceado y agua *ad libitum*. Los animales fueron operados en la mañana del estro, se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg de peso corporal, ip), se extirparon ambos ovarios y uno de ellos se limpió de adherencias y del oviducto y se injertó en el bazo. Luego de determinado tiempo de desarrollo, según el experimento en cuestión, los animales fueron sacrificados durante la mañana, para evitar fluctuaciones circadianas, de acuerdo con los protocolos de uso de animales del Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (IBYME-CONICET) que sigue los lineamientos del National Institute of Health de los Estados Unidos.

Características del luteoma

A continuación se describirán algunas de las características histológicas, funcionales y endocrinas del tumor así como también de los animales portadores del luteoma (Chamson-Reig,.1999), las cuales sirvieron como antecedente para los estudios que conforman esta tesis.

En los animales portadores del injerto ovárico intraesplénico, luego de un mes se observa el desarrollo de un tumor en el 98% de los casos (Fig. 5). El mismo tiene aspecto de un tumor sólido, que puede presentar estructuras quísticas. La superficie del mismo es irregular, semejante a un racimo de uvas, generalmente de color amarillento y muy vascularizado.

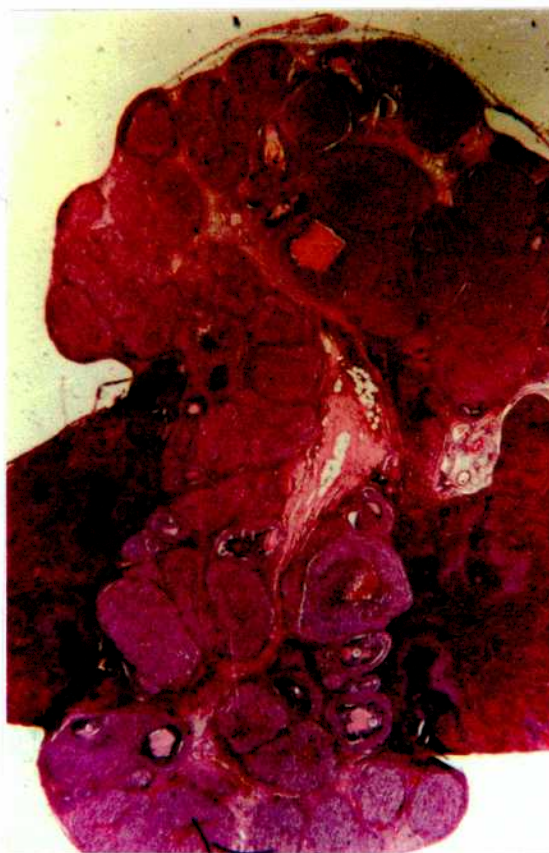


Figura 5: Sección longitudinal de un luteoma de un mes de desarrollo (aumento 10X). Nótese la abundancia de cuerpos lúteos, pocos folículos y escaso tejido glandular intersticial. Se puede observar el bazo en el que se injertó el ovario original.

En el examen histológico los trasplantes ováricos se encuentran hipertrofiados y compuestos mayoritariamente por tejido lúteo que se dispone en varios cuerpos lúteos. Se observan pocos folículos, en general luteinizados, pudiendo presentar cavidad antral. Se distinguen principalmente células lúteas y también células de la granulosa. 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 los tumores derivados de los cordones sexuales y del estroma.

Con respecto a la sobrevivencia de los animales portadores del tumor, los mismos presentaron una tasa de mortalidad semejante a los animales con operación ficticia (Sham) luego de un año de evolución del tumor. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas en los pesos corporales de los animales de ambos grupos (Tabla 2) (Chamson-Reig et al., 1999a).

Tabla 2. Tasa de mortalidad y peso corporal luego de 12 meses, en ratas portadoras de luteoma y animales sham.

Animales	Tasa de mortalidad	Peso corporal (g)
Luteoma	20% (4/20)	373.8±13.8
Sham	14.3% (2/14)	414.2±12.2

Al evaluarse la presencia de alteraciones inducidas por el tumor o de propagación metastásica, no pudieron observarse masas tumorales con características del luteoma fuera del tumor original.

A partir de un ovario en estro, cuyo volumen oscila en los 100 mm³, estos luteomas alcanzan un volumen de unos 200 mm³ aproximadamente luego de dos meses de injertados

(Lux-Lantos et al., 1995), llegando a medir unos 1100 mm³ luego de un año de desarrollo (Chamson-Reig et al., 1999a).

Características histológicas

Según la predominancia de un tipo celular u otro, los tumores se clasificaron en: tumores de células de granulosa y tumores de células lúteas, observándose una mayor incidencia de tumores con predominancia de células lúteas (81%, $p < 0.05$). Estos últimos 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. Aunque se observó desarrollo folicular, la mayoría de éstos eran anovulatorios y su teca se encontraba luteinizada. En algunos casos (31%) se observaron estructuras quísticas. Las células lúteas poseían citoplasmas basófilos y núcleos esféricos con nucléolos prominentes (Figura 6).

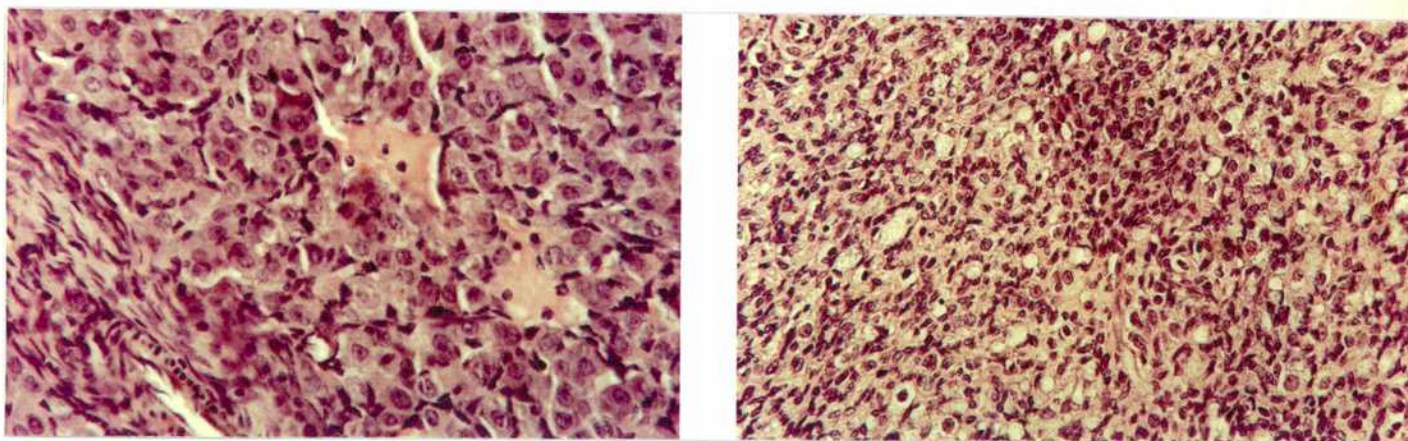


Figura 6: Microfotografías obtenidas por microscopía óptica de cortes de tumores de 12 meses de evolución. A: Tumor de células lúteas. Abundancia de células con citoplasma basófilo, núcleos esféricos y nucleolos prominentes (400X). B: Tumor de células de granulosa. Las células tienen escaso citoplasma acidófilo de apariencia indiferenciada (400X).

Los tumores con predominancia de células de la granulosa constituyeron el 18.75% de los casos. Se observaron células con citoplasma escaso y acidófilo. Las células tenían apariencia indiferenciada y las mitosis eran más frecuentes (Chamson-Reig et al., 1999a).

Control del crecimiento del luteoma - Efecto de la Buserelina

La mayoría de los luteomas experimentales cursan con gonadotrofinas elevadas por un período prolongado, lo que demuestra la inactivación hepática de los esteroides secretados por el tumor y por consiguiente, la pérdida de retroalimentación negativa. Anteriormente se había observado que la hipofisectomía favorece la involución de tumores ováricos intraesplénicos (Fels and Foglia, 1960), sugiriendo una dependencia de las gonadotrofinas para su crecimiento y desarrollo. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se deseó inhibir el desarrollo tumoral y precisar la dependencia de los tumores de las gonadotrofinas, tanto para su crecimiento y desarrollo inicial como para su mantenimiento posterior. Los resultados demostraron que la Buserelina, un análogo del GnRH, redujo la incidencia de tumores positivos e indujo la inhibición del desarrollo del tumor cuando fue administrada en forma simultánea al injerto ovárico, o la regresión tumoral cuando fue administrada luego de 30 días de desarrollo del luteoma (Lux-Lantos et al., 1995). La Buserelina actuaría induciendo la caída de los receptores para GnRH hipofisarios, provocando la caída en los niveles de gonadotrofinas, sin descartar un posible efecto directo sobre el tejido tumoral. Por otro lado, además de ser dependiente de las gonadotrofinas, estos tumores luteinizados pueden responder a altos niveles de PRL induciendo aumento del número de receptores para LH y promoviendo la secreción de progesterona (Lux et al., 1984), demostrando que conservan la respuesta luteotrófica frente a la PRL, como se ha demostrado para el cuerpo lúteo de rata (Richards and Williams, 1976; Chamson-Reig 1999a).

Receptores de GnRH

Mediante el análisis de Scatchard se determinó la presencia de receptores para GnRH en estos tumores intraesplénicos. Las constantes de disociación (K_d) fueron similares entre los tejidos evaluados: luteoma: 2.4×10^{-11} M y ovarios de ratas en estro: 2.3×10^{-11} M. Además no se encontraron diferencias en el número de receptores (B_{max}) entre el tejido tumoral y el tejido control (0.347 ± 0.078 y 0.599 ± 0.119 fmol/mg de tejido, respectivamente). El tratamiento durante un mes con Buserelina 0.33 mg/rata en forma de un pellet de liberación lenta en animales portadores de tumor no modificó los niveles de estos receptores en los tumores, mientras que el número de receptores hipofisarios evidenció un descenso significativo, de acuerdo a lo esperado (Chamson-Reig et al., 1997). Estos resultados estarían indicando que el número de receptores del luteoma no disminuye por la estimulación constante con el agonista, en contraste con lo que está descrito en hipófisis (Smith and Vale, 1981) y, por lo tanto, podrían participar en la regulación tumoral y mediar el posible efecto antitumoral del GnRH.

Secreción de hormonas esteroideas en luteomas y tejidos control

Al incubarse ovarios o hemi-tumores *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 ($p < 0.05$). Esta diferencia se observó luego de 1.5 y 3 horas de incubación (Chamson-Reig et al., 1997).

Además, estudiando estos parámetros en otro modelo se observó que la secreción basal de progesterona y de estradiol fue significativamente diferente entre los cultivos de células

lúteas provenientes de luteomas o de ovarios de hembras prepúberes superovuladas. 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 (Chamson-Reig et al., 1997) (Tabla 3). Estos altos valores de estradiol implican una actividad de aromatasas aumentada, dado que los cultivos se efectúan en presencia de androstenediona, sustrato de esta enzima.

Tabla 3. Secreción esteroidea basal (pg/μg DNA) en medio de cultivo de células lúteas.

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

*: p < 0.05

Esta diferencia en los niveles de secreción de estradiol y progesterona llama la atención ya que, al tratarse los tumores de tejido altamente luteinizado, uno hubiera esperado una secreción aumentada de progesterona. Estos resultados indican una posible alteración en las vías esteroidogénicas en los luteomas.

Por otro lado, 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 por LH (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 no se observó una disminución significativa en los niveles de progesterona inducida por Buserelina, marcando otra diferencia con el tejido tumoral (Chamson-Reig et al., 1997).

Señalización intracelular de GnRH en células tumorales y controles

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 (Stojilkovic et al., 1994). En los luteomas se determinó un mayor número de receptores de GnRH que en el tejido lúteo control, sin observarse cambios en la afinidad (Chamson-Reig et al., 1999b). Sin embargo, se evidenció un desacople de los receptores de membrana de GnRH de la PLC en las células de los luteomas, puesto en evidencia por la falta de respuestas tanto en calcio intracelular como en inosítoles fosfato (Chamson-Reig et al., 1999b). Esto implica que la inhibición ejercida por el GnRH sobre la secreción de progesterona inducida por LH en estas células, probablemente no se encuentra mediada por la clásica activación de PLC por GnRH, como fuera sugerido para las células lúteas control (Lahav et al., 1988; Niswender et al., 1994; Davis et al., 1986; Rodway et al., 1991; Leung and Wang, 1989; Leung and Steele, 1992).

En conclusión se observaron diferencias y similitudes entre el tejido ovárico control y el tejido tumoral. Estos resultados sugieren que la supresión del crecimiento y de la secreción

hormonal observados con el tratamiento *in vivo* con Buserelina en estos tumores experimentales podría no sólo deberse a la disminución en el número de receptores de GnRH hipofisarios y consiguiente descenso de gonadotrofinas, sino que podría ser también consecuencia de una acción directa del análogo sobre el tejido tumoral. Además, estos antecedentes son 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.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos abocamos a continuar el estudio del luteoma en cuanto a los mecanismos que controlan su desarrollo como así también distintos aspectos de su biología.

Parte II: Objetivos y trabajo experimental

Objetivos generales

Dado nuestro interés en ampliar y profundizar el conocimiento de la biología de los tumores ováricos y más específicamente de la función lútea, nos proponemos caracterizar aspectos histológicos, 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) Estudiar si parámetros de desarrollo y secreción, presentes en el ovario normal, se conservan durante el desarrollo hiperplásico en este modelo. Para ello se determinarán en los luteomas diferentes parámetros relacionados con el desarrollo tumoral y la capacidad secretora del tumor, en luteomas de 1, 3 y 7 meses de desarrollo.
- b) Teniendo en cuenta el patrón característico de la secreción gonadotrófica a lo largo de un año en animales portadores de tumor (Chamson-Reig et al., 1999a) y la importancia de las inhibinas en la caracterización de tumores ováricos, estudiar la expresión diferencial de las subunidades de inhibina a nivel de RNA mensajero en los tumores ováricos intraesplénicos en momentos críticos de disociación de la secreción de gonadotrofinas durante el desarrollo de los mismos.
- c) Evaluación de la participación del GnRH como regulador de la secreción esteroidea, a nivel gonadal y tumoral. Estudio de las vías de segundos mensajeros involucrados en la respuesta al GnRH en el tejido tumoral, en comparación con tejido lúteo normal.

- d) Expresión del RNAm de GnRH en luteomas y tejido ovárico control. Estudios *in vitro* sobre la autorregulación de la expresión de GnRH a nivel de síntesis del RNA mensajero y proteína en células tumorales y en células provenientes de tejido lúteo control.
- e) Teniendo en cuenta la relación entre el sistema inmune y el desarrollo tumoral, estudiar la evolución del tumor bajo un estado de inmunosupresión del animal, más precisamente, analizar el efecto de las drogas inmunosupresoras ciclosporina A y dexametasona sobre la evolución de los luteomas. Para ello se evaluarán distintos parámetros endocrinos, inmunológicos e histológicos, sobrevida y peso del animal a lo largo del tratamiento, además del tamaño del tumor al finalizar el experimento.

Capítulo I

Análisis inmunocitoquímico del tumor

Introducción y objetivos

En trabajos previos estudiamos la evolución de este tumor ovárico en función del tiempo y demostramos su dependencia de las gonadotrofinas para su desarrollo. Caracterizamos su capacidad productora de esteroides como así también su histología, demostrando que se trata de tumores benignos que no malignizan por lo menos dentro de un año de evolución.

A partir de todos estos estudios pudimos determinar que el tumor crece y adquiere aproximadamente 3 veces el volumen inicial del ovario en estro luego de 2 meses de haber sido injertado en el bazo (Lux-Lantos et al., 1995) y 20 veces luego de un año de desarrollo (Chamson-Reig et al., 1999a).

A pesar del alto grado de luteinización que se observa en general en estos tumores (Chamson-Reig et al., 1997), de allí su nombre luteoma, se puede observar un 23% de tumores en los cuales predominan las células de granulosa luego de un año de desarrollo, planteando una diversidad histológica a pesar de encontrarse bajo el mismo estímulo hormonal (Chamson-Reig et al., 1999a). El análisis histológico clasifica a estos tumores como tejido principalmente luteinizado, sin embargo, desde el punto de vista endocrino no se comportan de la misma manera. Estos tumores secretan *in vitro* mayores niveles de estradiol y menores de progesterona que un ovario en estro o células luteinizadas controles provenientes de hembras prepúberes tratadas con gonadotrofina de yegua preñada (PMSG) y gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Chamson-Reig et al., 1997). Más aún, luego de dos meses de desarrollo, la concentración de progesterona secretada por dichos tumores en la vena hepática portal no está incrementada con respecto a los niveles observados en una rata en estro (Lux-Lantos et al., 1995).

Teniendo en cuenta estas diferencias entre los tumores y el tejido lúteo control, era de interés estudiar si parámetros de desarrollo y secreción, presentes en el ovario normal (Mayerhofer and Garfield, 1995), se conservaban durante el desarrollo hiperplásico en este modelo. Para ello se determinaron en los luteomas diferentes parámetros inmunocitoquímicos, los cuales podrían estar relacionados con el desarrollo tumoral:

- la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA);
- la presencia de células apoptóticas determinadas mediante el método de TUNEL (Billig et al., 1994);

Además se determinaron parámetros relacionados a la capacidad de secreción del tumor:

- la expresión de la proteína de la regulación esteroideogénica aguda (StAR) (Fritz et al., 2001a), proteína clave en la biosíntesis esteroidea;
- la aromatasa, la enzima que cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos;
- la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa (SNAP-25) (Grosse et al., 2000), la cual está involucrada en procesos de exocitosis de péptidos y proteínas;
- connexin 43 (CX43), que forma parte de las uniones estrechas entre células del ovario (Mayerhofer and Garfield 1995; Sommersberg et al., 2000).

También se estudió la expresión de los RNAs de CX43, StAR y SNAP-25 por la técnica de RT-PCR en tumores de 1, 3 y 7 meses de desarrollo.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratas portadoras de luteomas, los cuales se generaron al autoimplantar un ovario en el bazo de un animal adulto castrado, como descripto previamente. Estos luteomas se dejaron desarrollar durante 1, 2, 3 o 7 meses, período después del cual se decapitó a los animales, se les extrajo los tumores y se los embebió en parafina para un posterior análisis inmunocitoquímico. Otro grupo de tumores fue limpiado completamente del tejido circundante y homogeneizado en TRIZOL (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland, Estados Unidos) para la extracción de RNA total. En algunos casos se utilizaron como controles ovario y bazo de rata adulta de 3 meses de edad.

Inmunocitoquímica

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 y se procedió a determinar por inmunohistoquímica la distribución celular de PCNA, CX43 y SNAP-25 en los tumores, utilizando antisueros comerciales mono o policlonales. Los orígenes de los anticuerpos fueron los siguientes: Anti PCNA (1:100): Calbiochem, Bad Soden, Alemania; anti SNAP-25 (1:500): Sternberger monoclonals Inc., Baltimore, MD; anti rat-Cx43 (1:500): SIGMA, Deisenhofen, Alemania (Sommersberg et al., 2000). Además se utilizó un anticuerpo anti StAR (1:1000) ampliamente caracterizado por Fritz y col. (Fritz et al.,

2001a) y un antisuero anti aromatasa (1:500-1:2000) (Beyer et al., 1994). Como método de detección y amplificación de la señal, se empleó el sistema de avidina-biotina (ABC). La inmunoreactividad fue visualizada con diaminobencidina (DAB). Los controles se realizaron omitiendo el primer anticuerpo e incubándose directamente con suero normal de conejo/ratón. Las secciones resultantes fueron examinadas con un microscopio Zeiss Axiovert.

Apoptosis

Para la detección de células apoptóticas en los cortes de tejidos se empleó el método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) utilizando el kit In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer, Mannheim; Germany) y se procedió como lo indican las instrucciones del fabricante. Brevemente, durante el proceso de apoptosis se producen cortes en el DNA genómico, generándose fragmentos de DNA de bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas) así como también cortes en una única cadena en fragmentos de DNA de mayor tamaño. Estos cortes en el DNA se identificaron mediante la marcación de los extremos 3'-OH libres con dUTP modificado con fluoresceína en una reacción enzimática. Para ello se utilizó la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, la cual cataliza la polimerización de nucleótidos a partir de extremos 3'-OH libres en forma molde dependiente. La fluoresceína incorporada es detectada por fragmentos Fab de anticuerpos anti fluoresceína generados en oveja, conjugados con peroxidasa del rábano picante. Luego de la reacción con un sustrato adecuado, se analizaron las células teñidas mediante microscopio óptico. Además, se realizaron los controles negativos pertinentes, en los cuales se omitió el agregado de la enzima.

Los experimentos de inmunocitoquímica se realizaron en cinco tumores diferentes tanto de

uno como de dos meses de desarrollo.

Purificación de RNA total

Se purificó RNA total a partir de tumores de 1, 3 y 7 meses homogeneizados en el reactivo de TRIZOL (GIBCO BRL) mediante el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Para ello se procedió según las instrucciones del fabricante. Los RNA totales aislados fueron resuspendidos en agua DEPC (dietilpirocarbonato, SIGMA), cuantificados espectrofotométricamente a 260 nm, verificados en cuanto a su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, desnaturalizantes, con bromuro de etidio y guardados a -70°C.

Análisis de RT-PCR y secuenciación:

100-500 ng de RNA total fueron utilizados para la transcripción reversa utilizando un *primer* de polideoxitimidina de 18 nucleótidos y la transcriptasa reversa del virus Moloney de leucemia murina (Moloney's murine leukemia virus) (Promega, Mannheim, Germany). Como controles se utilizaron ovario y bazo normales de rata de tres meses de edad. La amplificación de CX43, StAR y SNAP-25 fue realizada como fuera descrita previamente (Sommersberg et al., 2000). Con el objeto de descartar la posibilidad de degradación de RNA, se realizaron además amplificaciones por PCR con *primers* para α -tubulina. La amplificación por PCR consistió en 30-35 ciclos de desnaturalización (94°C, 15 segundos), hibridización (55°C, 1 minuto) y extensión (72°C, 2 minutos). Los productos de la reacción de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. La identidad de los mismos fue verificada por secuenciación como descrito previamente

(Sommersberg et al., 2000; Grosse et al., 2000; Clark et al., 1994; Fritz et al., 2001b; Fritz et al., 2001a).

Los *primers* utilizados para la amplificación de Cx43 de rata, α -tubulina, StAR de rata y SNAP-25 de rata fueron sintetizados según las secuencias publicadas en el GeneBank, a saber: Cx43 GenBank accession number X06656; sense: 5'-GCGGCGGCTTCACTTTCATTA-3' correspondiente a nt 158-179; antisense 5'-CAGACGTTTTTCGCAGCCAGGTTG-3' complementario a nt 371-395; tubulina accession number K 00558: sense: 5'-CACCCGTCTTCAGGGCTTCTTGGTTT-3' correspondiente a nt 398-415; antisense 5'-CATTTACCATCTGGTTGGCTGGCTC-3' complementario a nt 779-796; StAR accession number RNU76419: sense: 5'-TGGAGAGGCTCTATGAAGAGC-3' correspondiente a nt 987-1004; antisense: 5'-GCCACGTAAGTTTGGTCTTAG-3' complementario a nt 1214-1233; el diseño de estos primers fue realizado en base a Ronen-Fuhrmann et al. (Ronen-Fuhrmann et al., 1998). SNAP-25 (acession number AB003991): sense: 5'-ATGGCCGAGGACGCAGACATGCGTAAT-3' correspondiente a nt 1-27; antisense: 5'-AGCATCACTGGATTTAAG-3' complementario a nt 283-300.

Resultados

Desarrollo tumoral

La proliferación celular, detectada por un anticuerpo que reconoce el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), se encontró principalmente en folículos en desarrollo y estuvo ausente en folículos luteinizados (Fig. 1).

Sorprendentemente, y a diferencia de los ovarios normales, se observó la casi completa ausencia de células apoptóticas en las células tumorales luego de uno a dos meses de desarrollo del tumor, determinada por el método de TUNEL (Fig.2).

También se ha demostrado la presencia de uniones estrechas entre las células del ovario constituidas por Cx43 en las muestras tumorales, indicando la existencia de interacción local entre las células del ovario (Fig. 3). Llamativamente, Cx43 fue hallada principalmente en folículos en desarrollo (células de granulosa), pero no en folículos luteinizados, lo cual difiere de lo observado en ovarios normales, donde se la encuentra en los cuerpos lúteos activos (Mayerhofer and Garfield1995).

Capacidad secretora del tumor

Por otro lado se realizó un análisis inmunocitoquímico de la capacidad de producción hormonal de tumores de un mes de desarrollo, mediante la determinación de la presencia de enzimas y factores claves involucrados en la síntesis o secreción hormonal. La esteroidogénesis activa quedó demostrada por la intensa expresión de la proteína StAR (proteína de la regulación esteroidogénica aguda). StAR se visualizó solamente en folículos luteinizados y en células de la teca, y estuvo ausente en células de la granulosa de folículos, indicando que las mismas no participan en la síntesis *de novo* de esteroides (Fig. 4).

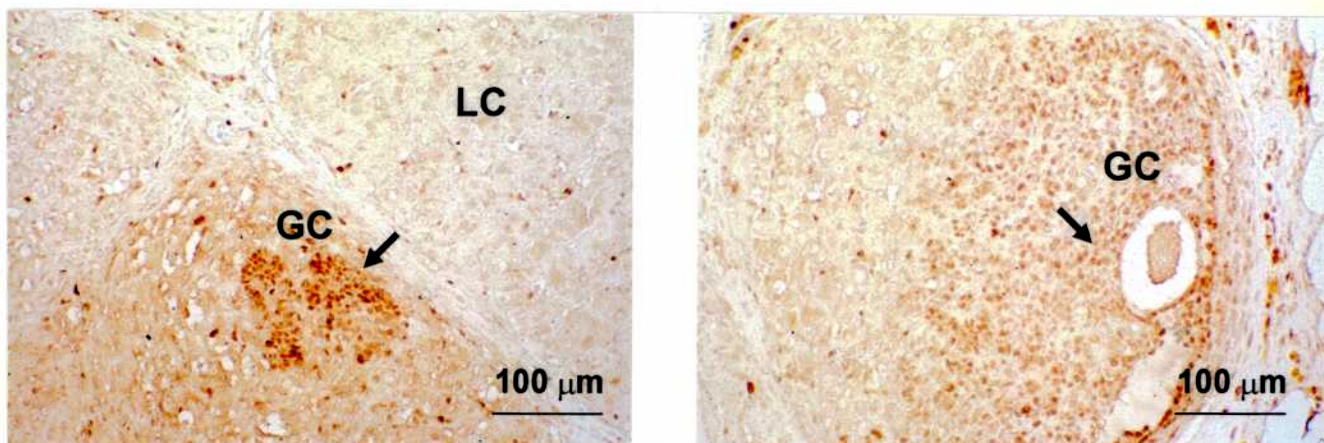


Figura 1: Inmunorreactividad correspondiente al PCNA en un luteoma de 1 mes de desarrollo. Anti-PCNA: 1:100. Abreviaturas para esta figura y las siguientes: GC: células de granulosa, LC: células lúteas y TC: células tecaes. Se observó inmunotinción principalmente en células de granulosa. Las flechas indican tinción anti-PCNA positiva.

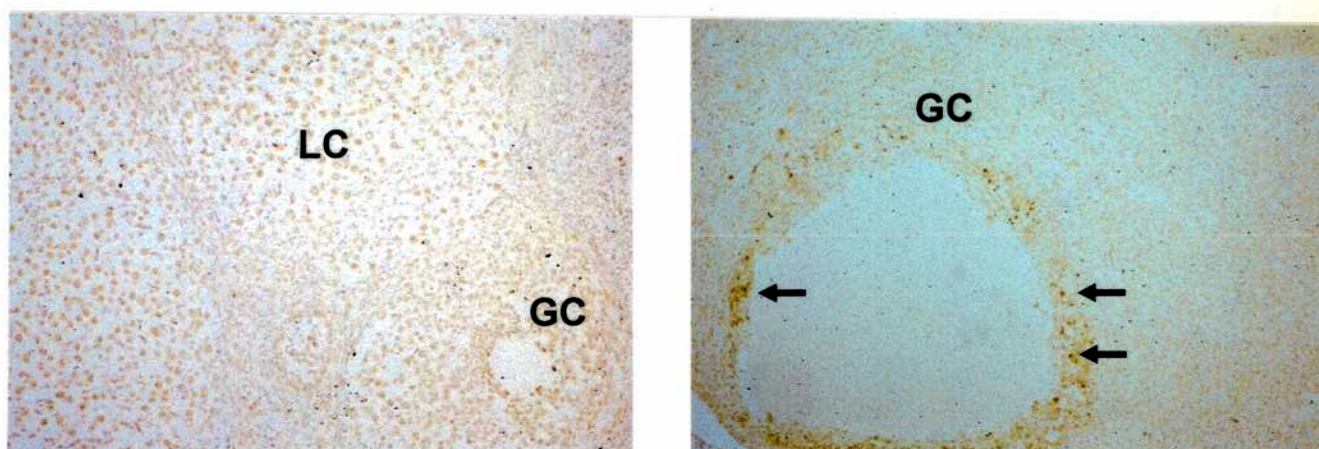


Figura 2: Tinción de células apoptóticas por el método de TUNEL en un luteoma de 1 mes de desarrollo (panel izquierdo). Notar la ausencia de tinción en las células del luteoma en comparación con un ovario control (panel derecho, las flechas muestran células positivas en un folículo antral grande).

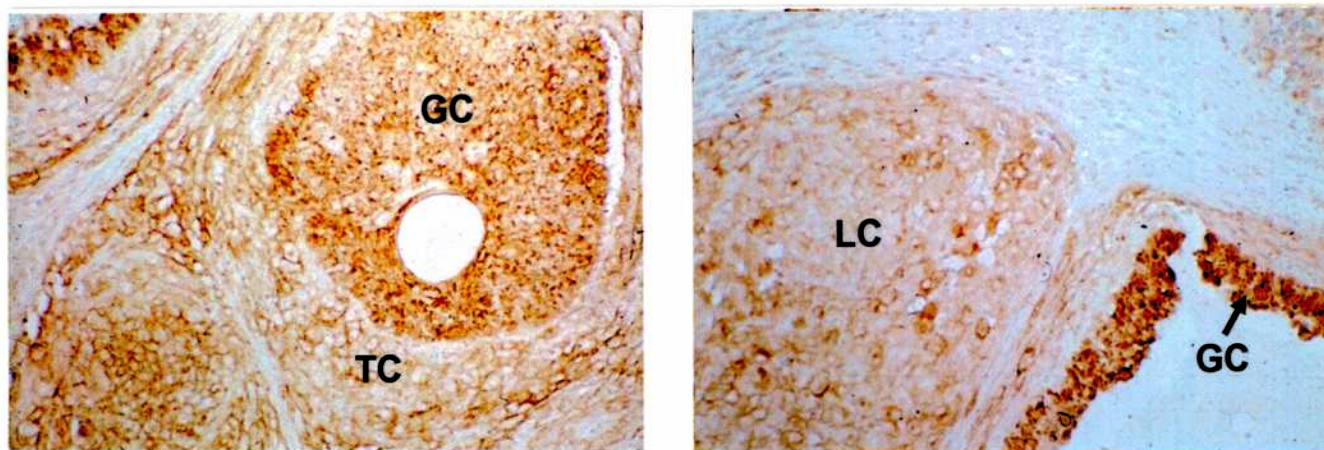


Figura 3: Inmunorreactividad para Cx43 en un luteoma de 1 mes de desarrollo. Anti-Cx43: 1:500. Se observa tinción positiva principalmente en células de granulosa.

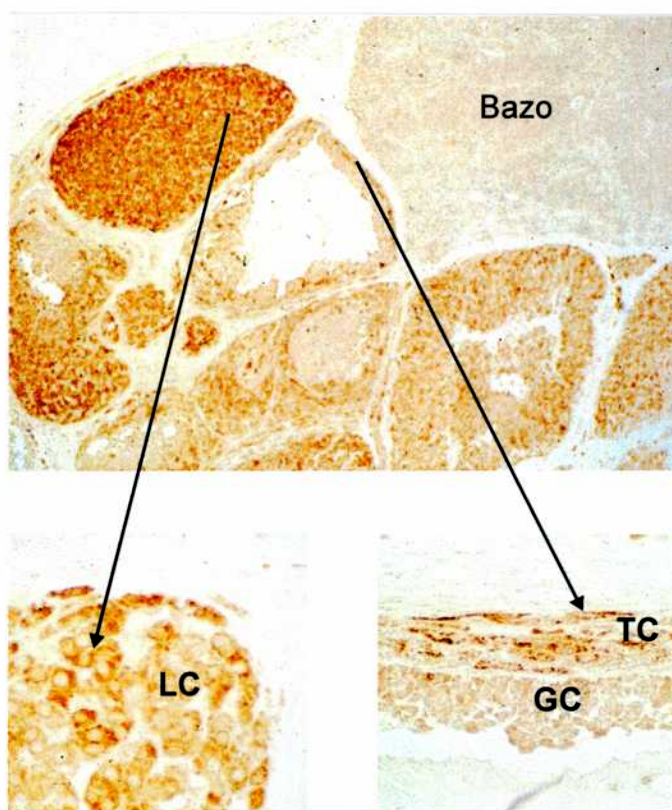


Figura 4: Inmunotinción para la proteína StAR en un luteoma de 1 mes de desarrollo. Anti-StAR: 1:1000. Se observó tinción positiva solamente en folículos luteinizados y en células tecales; las células de granulosa no evidenciaron marcación.

Con respecto a la aromatasa, la enzima que convierte andrógenos en estrógenos, su expresión fue muy intensa en células de la granulosa y estuvo también presente en células lúteas (Fig. 5), en concordancia con la elevada secreción de estradiol por las células tumorales (Chamson-Reig et al., 1997).

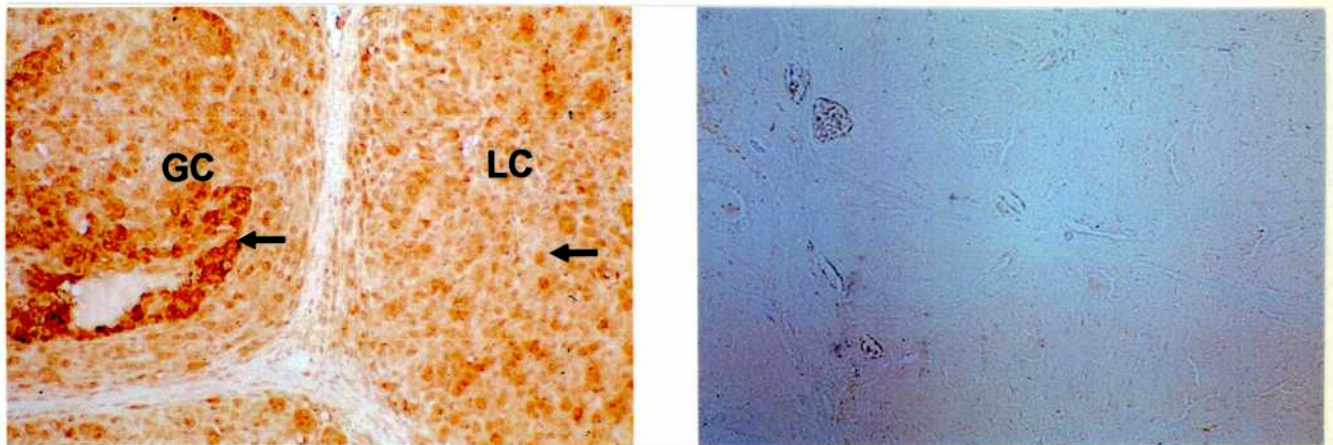


Figura 5: La inmunoreactividad para aromatasa (anticuerpo 1:500) en un luteoma de 1 mes de desarrollo fue muy intensa en células de granulosa y estuvo también presente en células lúteas (panel izquierdo). Notar la ausencia total de tinción al incubar el tejido sin el primer anticuerpo (panel derecho).

SNAP-25 (la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa), la cual es un marcador de procesos exocitóticos que fuera descrita en sistema nervioso, fue hallada tanto en grupos de células endocrinas en folículos en desarrollo, como en folículos luteinizados (Fig. 6, izquierda). De acuerdo con observaciones previas (Grosse et al., 2000) se observó tinción asociada a membrana y también citoplasmática. No se visualizaron fibras inmunorreactivas para SNAP-25 ni para TH (tirosina hidroxilasa) en los injertos, pero estuvieron presentes en el bazo (no se muestra tinción para TH) (Fig. 6, derecha).

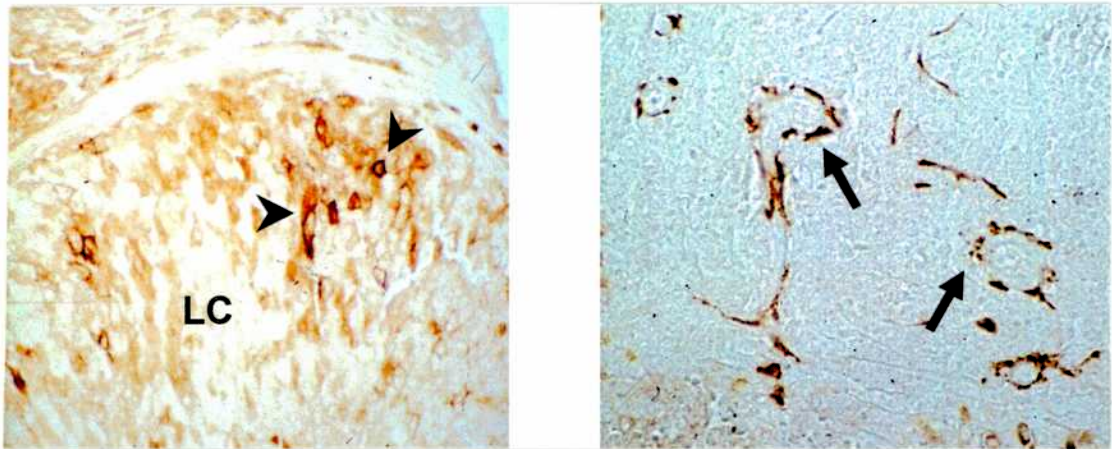


Figura 6: Inmunorreactividad para SNAP-25 (anticuerpo 1:500) en un luteoma de 1 mes de desarrollo (panel izquierdo) y en bazo (panel derecho). Se observó tinción citoplasmática y asociada a membrana en grupos de células endócrinas en folículos luteinizados (punta de flecha). Se evidenciaron fibras nerviosas inmunorreactivas para SNAP-25 en el bazo (flechas), pero no en los tumores.

Análisis de RT-PCR

Los análisis de RT-PCR confirmaron la presencia de los RNAs de rCX43, rStAR y rSNAP-25 en luteomas de uno y tres meses, indicando que los mismos están presentes en los tumores en diferentes estadios de desarrollo y luego de producirse un alto grado de luteinización (Fig. 7). Además, la expresión de rCX43, rStAR y rSNAP-25 estuvo también presente en tumores de siete meses de desarrollo (no se muestra).

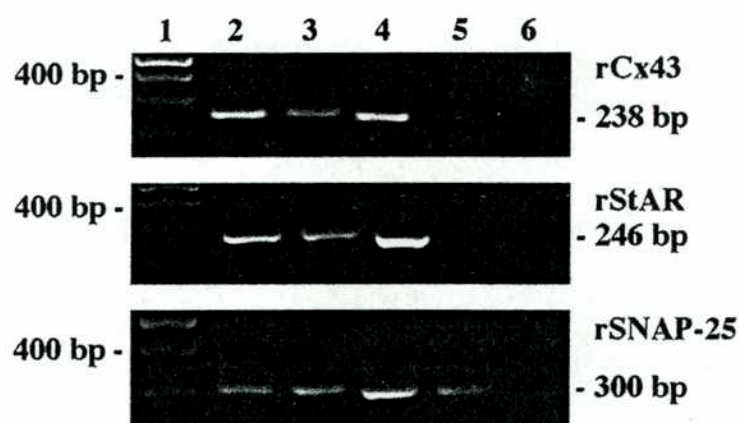


Figura 7: Expresión de rCx43, rStAR y rSNAP-25 en células de luteomas por RT-PCR utilizando primers específicos sintetizados de acuerdo a las secuencias publicadas en el Genbank. 1: Estándares de peso molecular de DNA (100pb DNA *ladder*). 2: luteoma de 1 mes de desarrollo. 3: luteoma de 3 meses de desarrollo. 4: ovario normal de rata de 3 meses de edad. 5: bazo normal de rata. 6: reacción control de PCR, omisión del molde. Notar la ausencia de la expresión de rCx43 y rStAR en el bazo y la presencia de SNAP-25, de acuerdo con los resultados inmunocitoquímicos.

Como resumen de la expresión de los marcadores ováricos en los distintos tipos celulares de los tumores ováricos experimentales se muestra la Tabla I.

Tabla I Expresión de los marcadores ováricos en los tumores ováricos experimentales determinados por inmunocitoquímica.

Marcadores ováricos	Células de granulosa	Células lúteas	Células tecales
PCNA	++	-	-
Cx43	++	-	-
StAR	-	++	+
Aromatasa	+++	+	-
SNAP-25	+	+	-

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular, Cx43: connexin 43, StAR: proteína de la regulación esteroideogénica aguda, SNAP-25: proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa.

Discusión

El objetivo del presente estudio fue continuar caracterizando este tumor ovárico intraesplénico experimental mediante la determinación de varios parámetros inmunocitoquímicos descriptos en el ovario normal, los cuales podrían estar relacionados al desarrollo tumoral y a la función endocrina.

El crecimiento efectivo de determinado tejido es el resultado del balance entre la proliferación y la muerte celular. Ambos parámetros han sido examinados en estos tumores. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) fue seleccionado para examinar inmunocitoquímicamente la activación de la mitosis en el ciclo celular en secciones de luteomas. Se halló proliferación celular principalmente en células de granulosa de folículos en desarrollo y estuvo ausente en folículos luteinizados, de acuerdo con datos bibliográficos (Somers et al., 1995), lo que sugeriría que los luteomas desarrollarían preferentemente a partir de folículos que no han ovulado por hipertrofia y proliferación de células foliculares. Esta proliferación está probablemente inducida por los altos niveles de gonadotrofinas presentes en los animales portadores del luteoma, en concordancia con datos de la literatura con respecto a folículos en crecimiento (Fricke et al., 1997; Piontkewitz et al., 1997). Además, factores de crecimiento, incluyendo IGF-1 (Makarevich et al., 2000) y estradiol (Lund et al., 1999) también han mostrado estar involucrados en la activación de la mitosis en el ciclo celular de células de granulosa y nosotros hemos demostrado que ambos IGF-I y estradiol son secretados activamente por este luteoma (Hockl et al., 2000; Chamson-Reig et al., 1997), sugiriendo un papel paracrino o autocrino de dichos factores en el crecimiento

tumoral. El bajo índice de células en proliferación en el tejido del luteoma está de acuerdo con las características benignas de este tumor (Chamson-Reig et al., 1999a), ya que elevados niveles de PCNA en tumores ováricos han sido relacionados a malignidad y mal pronóstico de la enfermedad (Schonborn et al., 1996).

Por otra parte, la apoptosis es un proceso celular normal, el cual está involucrado en varios eventos del recambio celular en el ovario, incluyendo la muerte de células germinales, de células de la granulosa y de la teca durante la atresia folicular, del epitelio de la superficie del ovario durante la ovulación y en la regresión del cuerpo lúteo (Dharmarajan et al., 1999). La iniciación de la luteinización marca la terminación de la replicación de la mayoría de las células de granulosa y su subsecuente diferenciación en células que se caracterizan por una marcada hipertrofia y un incremento en las enzimas necesarias para la producción esteroidea. La apoptosis ha sido detectada solamente en cuerpos lúteos en degeneración, y no en los activos, en varias especies incluyendo el humano (Yuan and Giudice, 1997), rata (Orlicky et al., 1992) y conejo (Dharmarajan et al., 1994). En el luteoma, la mayor diferencia con respecto a los ovarios normales fue la ausencia casi completa de células apoptóticas luego de uno a dos meses de desarrollo tumoral, determinada por el método de TUNEL. Esta observación sugiere el impedimento de la regresión de los cuerpos lúteos o de atresia folicular en este luteoma experimental, en el cual se observaron ambos: cuerpos lúteos y folículos en diferentes estadios de desarrollo y de luteinización. Se ha descrito que ambas gonadotrofinas rescatan a las células ováricas de la apoptosis (Chun et al., 1994), mediante el incremento de la expresión de superóxido dismutasas, la reducción de la expresión de bax y/o el incremento de la expresión génica de bcl-2 o bcl-x (Dharmarajan et al., 1999). Consecuentemente, los elevados niveles de gonadotrofinas circulantes presentes en los animales portadores del luteoma serían los

responsables del bajo índice apoptótico observado. Además, IGF-I e insulina también han demostrado ser factores de supervivencia en células ováricas (Chun et al., 1994). Como hemos mencionado anteriormente, IGF-I es producido por este tumor ovárico experimental (Hockl et al., 2000a) y podría estar jugando un papel importante en impedir la regresión de los cuerpos lúteos. Estos datos referentes a proliferación y apoptosis sugieren que el luteoma representa un modelo tumoral no metastásico altamente diferenciado, el cual desarrollaría preferentemente a partir de folículos que no han ovulado por hipertrofia y proliferación de células foliculares y persistencia de cuerpos lúteos.

Otro marcador característico de células ováricas es la expresión de la proteína Cx43 presente en las uniones estrechas. Las uniones estrechas muestran un patrón de distribución particular a lo largo del desarrollo folicular y durante la subsecuente formación e involución del cuerpo lúteo (Mayerhofer and Garfield1995), indicando que estas proteínas pueden ser importantes en la regulación de la folículogénesis y atresia folicular como así también en el crecimiento, diferenciación, y regresión del cuerpo lúteo (Grazul-Bilska et al., 1998); es por ello que resultó ser un factor interesante a analizar en las secciones del luteoma. La inmunorreactividad para Cx43 ha sido localizada en células de granulosa y de la teca de folículos, en el ovocito y en los cuerpos lúteos jóvenes (Mayerhofer and Garfield1995). Se ha demostrado que FSH es capaz de inducir incrementos en los niveles del RNAm de Cx43 y su fosforilación, cambios asociados con proliferación reducida y diferenciación aumentada (Sommersberg et al., 2000). Por otro lado, LH indujo, como respuesta inmediata, la fosforilación de Cx43 y, como respuesta tardía, la reducción de la concentración de la proteína Cx43, debido a la atenuación de su expresión génica (Granot and Dekel, 1994). Es interesante añadir que la pérdida o disfunción de las uniones estrechas parecería ser importante para permitir a las células cancerosas escapar de la regulación de

su crecimiento, como se observó en células de carcinoma ovárico humano, en las cuales se evidenció una disminución de Cx43 (Umhauer et al., 2000). En el luteoma, la proteína Cx43 fue hallada principalmente en folículos (células de granulosa) y se expresó pobremente o estuvo ausente en folículos luteinizados, lo cual difiere de los cuerpos lúteos activos en el ovario normal. La presencia de Cx43 fue confirmada por RT-PCR en luteomas de 1, 3 y 7 meses de desarrollo, indicando que este gen se expresa aún después de un desarrollo tumoral prolongado. La pérdida de la expresión de Cx43 en folículos luteinizados podría ser consecuencia de los elevados niveles de gonadotrofinas en estos animales, especialmente LH, ya que se ha observado que dicha hormona regula negativamente la expresión de Cx43 (Granot and Dekel1994). La expresión de Cx43 muestra claramente que en los luteomas, que presentan cuerpos lúteos persistentes, se encuentran alterados algunos de los rasgos característicos del tejido lúteo activo. Esto estaría de acuerdo con datos previos, los cuales evidencian que estos tumores secretan menos progesterona y más estradiol si se los compara con otro tejido altamente luteinizado, como ser los ovarios de ratas prepúberes superovuladas (Chamson-Reig et al., 1997).

Para analizar los parámetros relacionados a la capacidad secretora del tumor, se investigaron la expresión de la proteína StAR y de la aromatasa, ambas relacionadas con la secreción esteroideogénica, como así también la expresión de SNAP-25, la cual está involucrada en los procesos de exocitosis que ocurren durante la secreción de péptidos, factores de crecimiento y hormonas peptídicas.

La proteína StAR, la cual es estimulada hormonalmente, es responsable de transferir el colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la membrana mitocondrial interna

y es por ello, el paso limitante en la esteroidogénesis; su activación es crítica para la producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Stocco, 2001). Las hormonas tróficas LH, FSH y ACTH estimulan la producción esteroidea en sus respectivas células blanco mediante la activación de StAR por la vía de la proteína kinasa A dependiente de AMPc, la cual estimula también la expresión del RNAm que codifica para dicha proteína (Clark et al., 1994). Además, otros factores como IGF-I o TGF- β poseen también efectos estimulatorios sobre la expresión de StAR ovárica (Sekar et al., 2000). Por otro lado, estímulos que activan la proteína kinasa C han demostrado inhibir la expresión de esta proteína (Stocco and Clark, 1997). En ratas portadoras de autotransplantes ováricos intraesplénicos, los esteroides periféricos no se encuentran elevados debido a que los productos de secreción del tumor son colectados por la vena esplénica que desemboca en la vena porta hepática, que los conduce al hígado, donde son metabolizados (Lux-Lantos et al., 1995). Sin embargo, se demuestra una activa esteroidogénesis por la elevada expresión de la proteína StAR en el tejido tumoral, en concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio que demostraron la secreción de progesterona y estradiol hacia la vena porta (Lux-Lantos et al., 1995). La presencia del RNAm de StAR fue confirmada por RT-PCR en luteomas de 1, 3 y 7 meses, sugiriendo esteroidogénesis activa aún en etapas tardías del desarrollo tumoral. Se halló expresión de StAR solamente en folículos luteinizados y en células tecales, pero estuvo ausente en células de granulosa de folículos, indicando que estas últimas no participan en la producción *de novo* de esteroides. Estos hallazgos coinciden con datos previos de la literatura que describen la ausencia o la muy baja expresión de StAR en células de granulosa, mientras que su presencia en cuerpos lúteos ha sido ampliamente caracterizada en numerosas especies (Ronen-Fuhrmann et al., 1998; Bao et al., 1998;

Mizutani et al., 1997; Kiriakidou et al., 1996). En estos tumores la expresión de StAR está probablemente estimulada por los elevados niveles de gonadotrofinas presentes en estos animales; además, IGF-I podría estar involucrado en el incremento de la expresión de StAR estimulada por gonadotrofinas, tal como fuera demostrado por otros autores (Kiriakidou et al., 1996).

La enzima clave que cataliza el último paso de la biosíntesis del estradiol en el ovario es la P₄₅₀ aromatasas. La expresión y regulación de la P₄₅₀ aromatasas en células de granulosa de rata ha sido asociada al desarrollo folicular y luteinización (Richards et al., 1987). En el cuerpo lúteo se la encuentra tanto en las células luteales pequeñas como en las grandes, siendo las células luteales grandes las que expresan mayores cantidades y también producen más estradiol (Nelson et al., 1992). La expresión de la aromatasas es estimulada por FSH en las células de granulosa (Gonzalez-Robaina et al., 1999) y su expresión se incrementa a medida que progresa la diferenciación folicular (Tetsuka and Hillier, 2001). Algunos autores han propuesto que luego de la luteinización la expresión de la aromatasas, a pesar de estar elevada, sería independiente de la estimulación por cAMP (Hickey et al., 1990). En estos tumores ováricos experimentales la expresión de la aromatasas fue muy intensa en células de granulosa y estuvo también presente en células luteales, en concordancia con la elevada secreción de estradiol por las células tumorales (Chamson-Reig et al., 1997). Tal como fuera descripto más arriba con otros factores, los niveles elevados de gonadotrofinas estarían probablemente regulando la expresión de la aromatasas en células luteales, en concordancia con lo que ha sido descripto en el ovario normal (Gonzalez-Robaina et al., 1999). Además, otros factores podrían contribuir también a la regulación de la expresión de la aromatasas. Factores de crecimiento insulino similares han mostrado incrementar la

actividad de la aromatasa en tejido ovárico (Yoshimura, 1998). Con respecto al sistema inhibina-activina, mientras que la inhibina promueve la síntesis de andrógenos (Hillier et al., 2001), el sustrato clave para la aromatasa, la activina ha demostrado estimular la actividad de la aromatasa en células de granulosa de rata (Tannetta et al., 1998), y como veremos más adelante (capítulo II) estos luteomas presentan expresión tanto para la subunidad α como las β de estos péptidos. Por lo tanto podrían ser varios factores, tanto endocrinos como paracrinós o autocrinos, los involucrados en manera conjunta en la regulación de la expresión de esta enzima.

La proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa ha sido inicialmente descrita en el sistema nervioso (Oyler et al., 1989) y se ha demostrado que está involucrada en los procesos de exocitosis regulada (Calakos and Scheller, 1996). Recientemente Grosse y col. (Grosse et al., 2000) demostraron su expresión en compartimentos no neuronales y no neuroendócrinos del ovario, específicamente en células productoras de esteroides como las células foliculares y las células del cuerpo lúteo, y también en oocitos. Las células ováricas, además de esteroides, también sintetizan y secretan muchos otros productos, incluyendo péptidos, factores de crecimiento y hormonas, mediante exocitosis regulada, y este proceso podría involucrar SNAP-25. En las secciones del luteoma, hemos determinado inmunotinción para SNAP-25 asociada a membrana y citoplasmática, en grupos de células endocrinas pertenecientes a folículos en desarrollo y en folículos luteinizados, de acuerdo con observaciones previas (Grosse et al., 2000). Es interesante notar que no se hallaron fibras inmunorreactivas ni para SNAP-25, ni para TH (tirosina hidroxilasa) en los injertos (pero estuvieron presentes en el bazo), indicando que luego del trasplante en el bazo, los

ovarios no sufren una reinnervación manifiesta. Además, la presencia del RNAm de SNAP-25 fue confirmada por RT-PCR a lo largo del desarrollo tumoral. En los animales portadores del luteoma, los elevados niveles de FSH podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de SNAP-25 en las células del luteoma, como ha sido demostrado en la línea celular de granulosa GFSHR-17 por Grosse y col. (Grosse et al., 2000). La presencia de SNAP-25 ha sido relacionada a la exocitosis de productos peptídicos. Nosotros confirmamos la expresión de subunidades de inhibina en tumores en etapas tempranas y tardías de desarrollo (ver capítulo II), coincidiendo con la expresión de SNAP-25, lo que sugeriría que podría tratarse de eventos relacionados, a pesar de que la coexpresión de ambas proteínas en la misma célula queda aún por demostrarse.

Analizando en su conjunto los parámetros inmunocitoquímicos estudiados en los luteomas, podemos concluir que la mayoría de ellos no demuestran alteraciones manifiestas respecto del ovario normal. Las gonadotrofinas y otros factores producidos por el tumor parecerían cumplir un papel fundamental en el mantenimiento de la expresión de estas proteínas, mientras que estarían evitando la apoptosis en este tejido. Los resultados obtenidos indican que los luteomas se desarrollarían preferentemente a partir de folículos anovulatorios, por hipertrofia y proliferación de células foliculares. Estos tumores representan un modelo tumoral no metastásico altamente diferenciado, en el cual se conservan muchos de los rasgos normalmente observados en el ovario y presentan un interesante modelo para el estudio de la participación de las gonadotrofinas en el desarrollo de tumores.

Capítulo II

Relación entre inhibinas y gonadotrofinas en animales portadores de tumor

Introducción y objetivos

Como describiéramos anteriormente los tumores ováricos experimentales desarrollan en respuesta a la hipergonadotrofinemia. En trabajos previos, observamos una clara disociación en la secreción de LH y FSH en los animales portadores de dichos tumores analizados durante un año de desarrollo de los mismos (Chamson-Reig et al., 1999a). Mientras que LH aumentaba rápidamente y permanecía elevada por tiempo prolongado, FSH recién aumentaba en el tercer mes post-injerto y caía bruscamente a partir del sexto mes. Estas diferencias en la secreción de LH y FSH no podían atribuirse al estradiol dado que sus niveles en sangre periférica fueron constantes durante el período ensayado. Evidencias previas, nuestras y de otros laboratorios (Lux et al., 1984; Lux-Lantos et al., 1995; Chamson-Reig et al., 1999a; Uilenbroek et al., 1978) indican que estos tumores podrían secretar inhibina, el péptido de origen ovárico que inhibe selectivamente la secreción de FSH (Mayo, 1994; Stillman et al., 1983; Williams and Lipner, 1982; Farnworth et al., 1988; Jakubowiak et al., 1990).

La 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. La unión de la subunidad α con las subunidades βA ó βB , dan origen a las inhibinas A ó B, respectivamente. También se han descubierto subunidades βC (Hotten et al., 1995; Loveland et al., 1996), βD (Oda et al., 1995) y βE (Fang et al., 1996), aunque su participación en la reproducción aún no está claramente establecida.

Se ha demostrado que esta hormona está íntimamente involucrada en el control negativo de la secreción de FSH, observándose una relación inversa entre los niveles de ambas hormonas (Stillman et al., 1983; Woodruff et al., 1996).

Existen también evidencias de una función paracrina/autocrina de la inhibina en el folículo ovárico (Findlay, 1993). La inhibina, sintetizada mayoritariamente en el ovario, está expresada principalmente en folículos, mientras que su presencia en cuerpo lúteo parece ser especie específica. Mientras que en la mujer ha quedado demostrado que la inhibina B es principalmente de origen folicular y es la que predomina en la primera fase del ciclo menstrual, la inhibina A es sintetizada principalmente por el/los cuerpos lúteos y predomina en la segunda fase del ciclo. En la rata este estudio se torna más complicado al no existir fases netas durante el ciclo estral y al observarse tanto folículos en distintos estadios de desarrollo como en cuerpos lúteos durante todo el ciclo. En la mujer se observa durante el ciclo un primer pequeño aumento de inhibina coincidente con los altos niveles preovulatorios de estradiol, que sería de origen folicular y luego un gran aumento alrededor del día 22 del ciclo de origen lúteo al que se le atribuye la inhibición de FSH durante la fase lútea o progestacional del ciclo (Fraser and Lunn, 1993).

En la rata, el RNAm de la subunidad α se encontró en todos los estadios del desarrollo folicular, mientras que el RNAm de las subunidades β se detectó en folículos terciarios a lo largo del ciclo y en folículos secundarios de animales en estro (Vale et al., 1994); algunos autores no encontraron evidencias de la presencia de inhibina en cuerpos lúteos de ciclo (Woodruff et al., 1988; Woodruff et al., 1996). Sin embargo, otros proponen la presencia de alguna de sus subunidades en cuerpos lúteos recién formados (Meunier et al., 1988), cuerpos lúteos de hembras pseudopreñadas (Foreman and Wilder, 1995) ó de hembras

adultas (Ogawa et al., 1991). En la 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 et al., 1996).

Además, la unión por puentes disulfuro de dos subunidades β de inhibina pueden dar origen a una nueva hormona: la activina, generando activina A, B o AB, según el tipo de subunidades que la conforman. Esta proteína también pertenece a la superfamilia del TGF- β . La activina promueve la secreción hipofisaria de FSH, en contraposición a la acción de inhibina. Además se ha propuesto que tendría acciones mitogénicas (Matzuk et al., 1992) y a nivel reproductivo cumple funciones paracrin/autocrinas en las gónadas, como por ejemplo promover el aumento de la síntesis de estradiol, etc. (Findlay 1993).

Las inhibinas-activinas se han propuesto también como marcadores de tumores ováricos en humanos, principalmente de los tumores de granulosa y del epitelio ovárico (Lappohn et al., 1992; Cooke et al., 1995), en donde la secreción diferencial de estos péptidos podría ser de importancia diagnóstica.

Teniendo en cuenta las características de la secreción gonadotrófica a lo largo de un año en animales portadores de tumor y la importancia de las inhibinas en la caracterización de los tumores ováricos, el objetivo de este capítulo consistió en estudiar la expresión diferencial de las subunidades de inhibina a nivel de RNA mensajero en los tumores ováricos intraesplénicos en momentos críticos de disociación de la secreción de gonadotrofinas durante el desarrollo de los mismos.

Materiales y métodos

Animales

Se emplearon animales portadores de tumores, los cuales se sacrificaron por decapitación luego de 1, 3 y 7 meses de desarrollo. Se extrajeron los tumores para la obtención de RNA y guardaron los sueros para las determinaciones hormonales. Se utilizaron sueros y ovarios de animales en estro como control. Se evaluaron entre 4 y 7 animales por grupo.

Determinaciones hormonales: Radioinmunoanálisis (RIA) para hormonas proteicas

Para la medición de las hormonas peptídicas LH y FSH 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 LH, siendo éste esencialmente el mismo para las otras hormonas proteicas medidas en éste y otros capítulos.

Hormona Luteinizante (LH)

Se cuantificó la hormona LH usando el kit de reactivos provistos por el NIDDK. Se utilizó el método heterólogo desarrollado por (Niswender et al., 1968).

Marcación: Se utilizó 5 µg de LH (NIDDK-rLH-I-10) purificada, aislada de glándulas hipofisarias ovinas por Reichert y col. (LER 1056). 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 Sephadex G-50, en buffer fosfato 0.05 M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 1 ml 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 µl de eluido por tubo, y se leyeron 10 µl de cada uno en un contador gamma. Con las columnas empleadas se obtuvo una buena separación de los picos de hormona marcada y de ¹²⁵I 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 LH de rata fue NIDDK-Anti-Rat-LH-RIA-11 obtenido al inmunizar conejos con LH de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rLH-I-10. 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. La dilución inicial fue de 1:196.000. El estándar de referencia fue LH purificada de

hipófisis de rata (NIDDK-Rat-LH-RP3), con un mínimo de contaminante de FSH y TSH. Los patrones (0.015 a 8 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. 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

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.

Hormona Folículo Estimulante (FSH)

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-RIA-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.

Medición de las subunidades de inhibina por Northern blot

Se procedió a la extracción de RNA total a partir de tejido ovárico control (ovarios en estro) y tumoral (tumores de 1, 3 y 7 meses de desarrollo) para la medición de las subunidades α -Inhibina, βA y βB , mediante el método de Chomczynski y Sacchi, como fuera descrito en el primer capítulo. Se realizaron electroforesis preparativas en geles de agarosa al 1%, desnaturalizantes, con bromuro de etidio, en las cuales se sembraron 20 μg de RNA total en cada calle. Una vez finalizadas las corridas se inició la transferencia del RNA a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) por capilaridad y los ácidos nucleicos fueron fijados mediante exposición a luz U.V. de alta intensidad. Las membranas de nylon se prehibridizaron a 65°C durante 1 hora en presencia de la solución de prehibridización de Church (Church and Gilbert, 1984). Las sondas de las subunidades de inhibina α , βA y βB (Esch et al., 1987; Lapolt et al., 1990; Dykema and Mayo, 1994) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH, como control interno), gentilmente donadas por el Dr A. Hsueh (Stanford University, CA, Estados Unidos), marcadas con [³²P]dCTP mediante un sistema de *primers* al azar (Random Primed DNA Labeling Kit, Boehringer Mannheim, Alemania) se desnaturalizaron con calor, se agregaron a la solución de prehibridización y se dejó incubando a 65°C toda la noche. Con el objeto de despegar la sonda unida inespecíficamente a la membrana y disminuir de este modo el fondo, se realizaron varios lavados con soluciones conteniendo SSC (cloruro de sodio y citrato de sodio) y SDS 0.1% en condiciones de astringencia crecientes. Finalmente se dejó exponiendo la membrana con una placa radiográfica (Biomax MS, Eastman Kodak Co, Rochester, New York, Estados Unidos) a -70°C aproximadamente 12 horas para la subunidad α de inhibina y G3PDH, y

aproximadamente una semana para las subunidades βA y βB . El revelado de las placas se llevó a cabo con soluciones reveladoras y fijadoras clásicas. Una vez obtenidas las autorradiografías, las mismas fueron levantadas con un *scanner* y posteriormente se integraron las áreas correspondientes a cada banda mediante el programa ImageQuant (Molecular Dynamics). Se expresaron los resultados normalizados como el cociente entre la subunidad en cuestión y G3PDH. Los pesos moleculares de las diferentes subunidades fueron estimadas con estándares de peso molecular de RNA (Promega), cuyo rango es de 0.28 a 6.58 kb.

Análisis estadístico:

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ error estándar. Las diferencias entre las medias de cada grupo se analizaron con el programa Statistica v 5.0 mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Duncan (Sokal and Rohlf, 1995).

Resultados

Niveles séricos de gonadotrofinas en animales portadores de tumor

En los animales portadores de tumor se observó un aumento en los niveles de LH desde el primer mes, los cuales permanecieron significativamente elevados en el mes 3 y luego cayeron en el mes 7 a valores intermedios (Fig. 1A). FSH, en cambio, permaneció en niveles semejantes al estro en el primer mes, luego aumentó significativamente en el mes 3 para caer a los valores basales en el mes 7 (Fig. 1B).

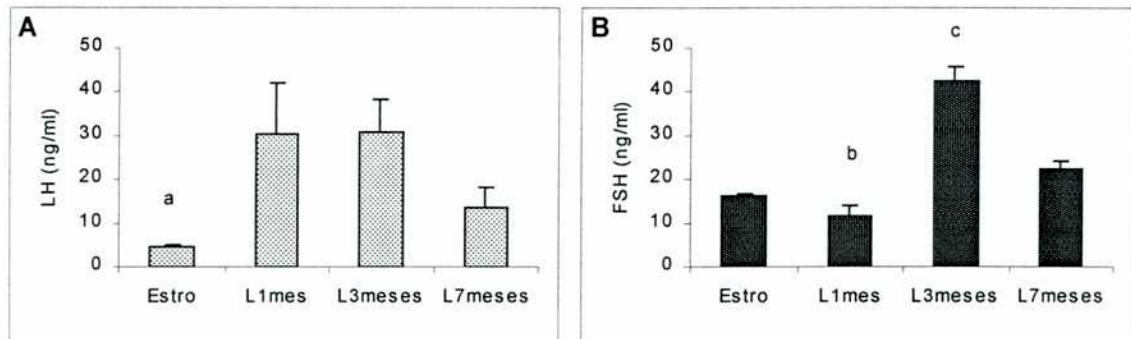


Figura 1: Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) de ratas portadoras de luteomas de 1, 3 y 7 meses de desarrollo (L1mes, L3meses y L7meses, respectivamente) y de ratas en estro (Estro). a: Estro difiere significativamente de L1mes y L3meses ($p<0.05$); b: L1mes difiere significativamente de L7meses ($p<0.001$) y L3meses ($p<0.001$); c: L3meses difiere significativamente de Estro ($p<0.001$), de L1mes ($p<0.001$) y de L7meses ($p<0.001$).

Expresión de RNA mensajero de las distintas subunidades de inhibina

Los diferentes RNAs de las subunidades de inhibina fueron detectados por Northern blot en los tumores de 1, 3 y 7 meses de desarrollo con un patrón de expresión característico para cada uno de ellos (Fig. 2). Cuando se hibridizó con la sonda para la subunidad α se detectó una banda de 1.4 kb. Cuando se hibridizó con la sonda para βA , se observaron dos

bandas, una de 5.8 correspondiente a la forma grande de βA y otra de 3.2 kb correspondiente a la forma pequeña. La sonda para βB mostró una banda de 3.5 kb. El RNAm para G3PDH (1.2 kb), de expresión constitutiva, fue utilizado como control interno.

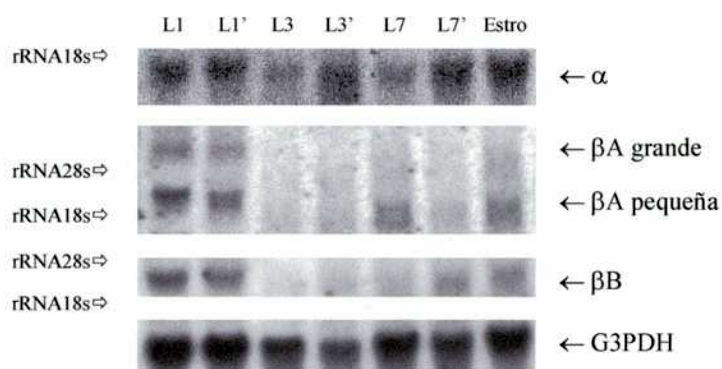


Figura 2: Gel representativo del análisis de los RNAm de las subunidades de inhibina por Northern blot. Se sembraron 20 μ g/calle de RNA total proveniente de luteomas de 1 (L1 y L1'), 3 (L3 y L3') y 7 (L7 y L7') meses de desarrollo y de un ovario de una rata en estro (Estro). Las sondas utilizadas para cada gel se indican a la derecha del panel. A la izquierda del mismo se muestran las posiciones de migración de los RNA ribosomales de 18s y 28s.

Cuantificación de la expresión de las distintas subunidades de inhibina

Se relativizó la expresión de cada subunidad de inhibina respecto de la expresión de G3PDH observándose que la subunidad α no evidenció variaciones significativas a lo largo del desarrollo tumoral, y sus niveles de expresión fueron semejantes a los de un ovario en estro (Fig. 3). Además sus niveles de expresión fueron considerablemente mayores que los correspondientes a las subunidades β .

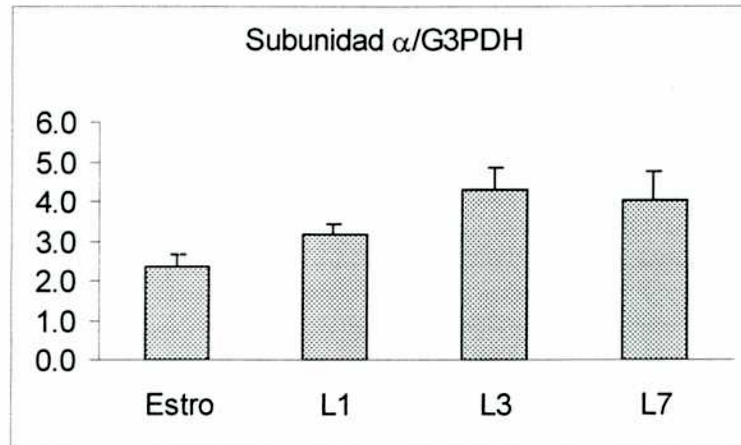


Figura 3: Cuantificación de la expresión del RNAm correspondiente a la subunidad α de inhibina relativizada con la señal de G3PDH. Para éste y los siguientes gráficos: L1: luteoma de 1 mes; L3: luteoma de 3 meses; L7: luteoma de 7 meses; Estro: ovario de una rata en estro. ANOVA: NS.

Con respecto a la subunidad βA se observó que en tumores de 1 mes de desarrollo la expresión de la variante βA grande aumentó significativamente respecto del ovario en estro ($p < 0.05$). En tumores de 3 meses de desarrollo cayó bruscamente su expresión ($p < 0.05$) para luego recuperarse parcialmente en tumores de 7 meses (Fig. 4A). El patrón de expresión de βA pequeña es similar a la βA grande (Fig. 4B) y la suma de ambas mantiene el mismo patrón de expresión que βA grande, siendo las diferencias estadísticas aún más significativas (Estro vs. L1: $p < 0.01$ y L1 vs. L3: $p < 0.01$) (Fig. 4C). Además, la expresión relativa de estas variantes (βA grande/ βA pequeña) a lo largo del desarrollo tumoral no varió significativamente (Fig. 5). Los niveles expresión del RNAm de la subunidad βB siguen esencialmente el mismo patrón que βA , pero sus niveles en tumores 7 meses siguen siendo significativamente menores que al mes de desarrollo ($p < 0.01$) (Fig. 6).

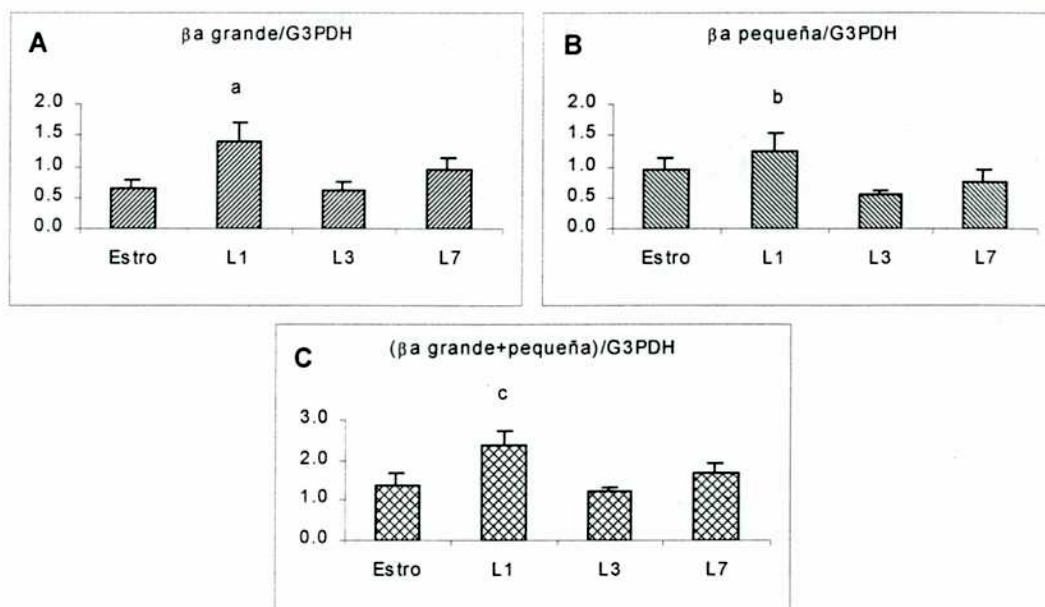


Figura 4: Cuantificación de la expresión de los RNAs correspondientes a las dos variantes de la subunidad βA de inhibina en función de la señal de G3PDH. **A)** Expresión de βA grande relativizada a G3PDH. ANOVA: $p < 0.05$. a: L1 distinto de E y L3 ($p < 0.05$). **B)** Expresión de βA pequeña relativizada a G3PDH. ANOVA: $p < 0.05$. b: L1 distinto de L3 ($p < 0.05$). **C)** Suma de βA grande + βA pequeña relativizada a G3PDH. ANOVA: $p < 0.05$. c: L1 distinto de E y L3 ($p < 0.01$).

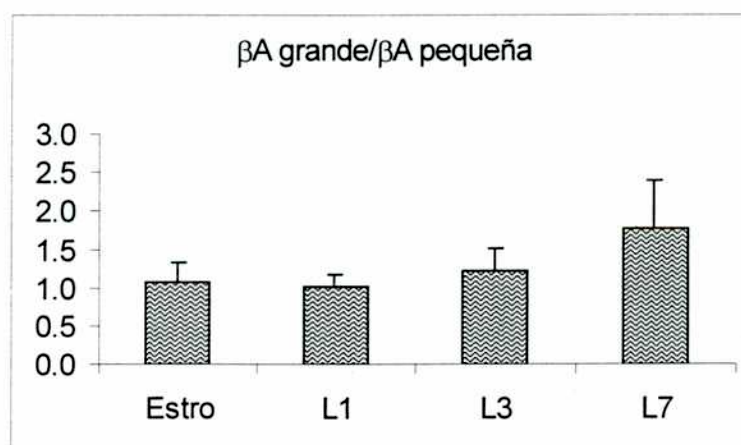


Figura 5: Expresión relativa de las dos variantes de la subunidad βA (βA grande/ βA pequeña) de inhibina a lo largo del desarrollo tumoral. ANOVA: NS.

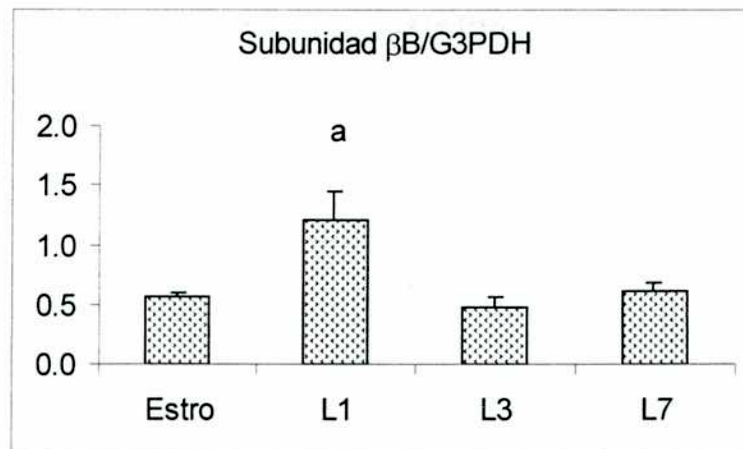


Figura 6: Cuantificación de la expresión del RNAm correspondiente a la subunidad β B de inhibina relativizada con la señal de G3PDH. ANOVA: $p < 0.01$. a: L1 distinto de L3, L7 y E, ($p < 0.01$).

Correlación entre los niveles de las subunidades β de inhibinas y las gonadotrofinas circulantes

Al relacionar los niveles de las subunidades β de inhibinas de los tumores de 1, 3 y 7 meses con los niveles séricos de FSH de los animales respectivos, se observó una significativa correlación negativa con β A (grande+pequeña) ($r: -0.75$, $p < 0.05$), y con β B ($r: -0.68$, $p < 0.05$) (Figs. 7A y 7B, respectivamente).

Por el contrario, no se observaron correlaciones significativas entre las subunidades β y los niveles de LH séricos, ni entre la subunidad α y las gonadotrofinas.

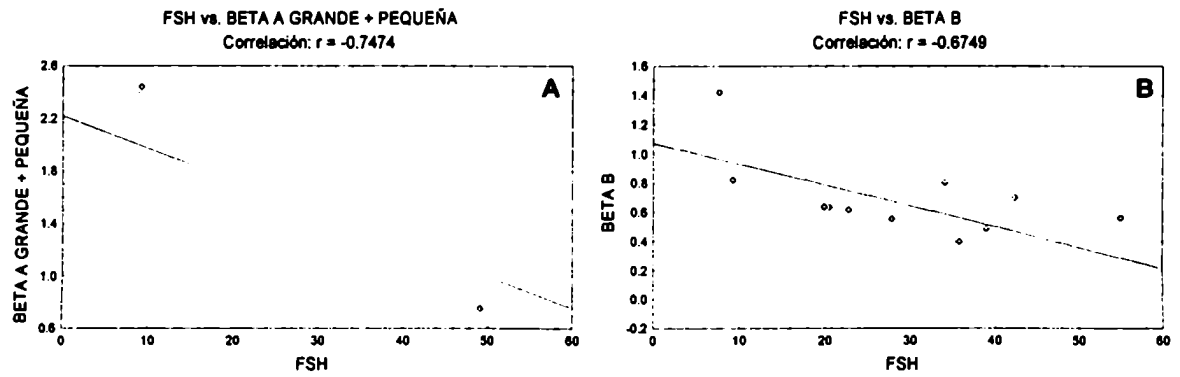


Figura 7: Correlación entre los niveles séricos de FSH y la expresión de los RNAs de las subunidades β de inhibina. A) Correlación entre FSH sérica y la subunidad β A (grande+pequeña), $r = -0.75$, $p < 0.05$. B) Correlación entre FSH sérica y la subunidad β B, $r = -0.68$, $p < 0.05$.

Discusión

Los resultados muestran que estos tumores ováricos experimentales, altamente luteinizados, son capaces de sintetizar activamente los RNA mensajeros de las diferentes subunidades de inhibina α , βA and βB . Se determinaron dos variantes para la subunidad βA , las cuales podrían ser producto del uso de múltiples sitios de poliadenilación, y cuyos pesos moleculares son comparables a aquellos descritos en trabajos previos (Woodruff et al., 1987). Estos resultados corroboran la detección de inhibinas, con variadas metodologías, en tejido luteinizado, como los cuerpos lúteos de ovarios de ratas hembras pseudopreñadas (Foreman and Wilder 1995) y también en el cuerpo lúteo humano y de otras especies (Groome et al., 1996; Roberts et al., 1993; Fraser et al., 1993; Webley et al., 1994). El hecho de que estos tumores ováricos experimentales sinteticen inhibinas sugiere que estas hormonas podrían ser marcadores de desarrollo tumoral, como fuera descrito para otros tumores ováricos humanos (Lappohn et al., 1992; Cooke et al., 1995). Las inhibinas, tanto las séricas como las detectadas por inmunohistoquímica en cortes de tejido, podrían ser de utilidad diagnóstica y en el seguimiento de tumores ováricos. Diversos trabajos han descrito la medición de las distintas subunidades de inhibinas en una variedad de tumores ováricos de distinto origen y postulan que la presencia de una u otra subunidad facilitan la diferenciación entre éstos. La subunidad α se expresaría en el 100% de los tumores derivados del estroma y de los cordones sexuales, en general conjuntamente con alguna o ambas subunidades β (síntesis de inhibina), tanto en tumores primarios como recurrentes. La presencia de subunidades β en ausencia de α (síntesis de activina) es característica de adenocarcinomas epiteliales tanto mucinosos como serosos (Arora et al., 1997;

Yamashita et al., 1999; Hildebrandt et al., 1997; Rishi et al., 1997; Choi et al., 2000). Por ello, la detección de estas subunidades podría ser de gran valor tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de tumores ováricos.

La detección de las tres subunidades de inhibinas en nuestro luteoma experimental está de acuerdo al origen histológico de estos tumores y hace que sea un excelente modelo de estudio de tumores de granulosa y su relación con el control de la secreción de inhibinas. Queda aún por determinar en futuros trabajos la localización celular de cada una de las subunidades, dado que se ha postulado que la síntesis de la subunidad α se encontraría principalmente en las células estromales, mientras que la β se encontraría en células de granulosa (Dykema and Mayo 1994).

La expresión del RNAm de la subunidad α no varía significativamente a lo largo de siete meses de desarrollo tumoral. Sus valores son francamente superiores a los de las subunidades β a todos los tiempos estudiados, sugiriendo la formación de inhibinas, hecho abalado también por la correlación inversa con FSH. Sus niveles de expresión no correlacionan con ninguna de las dos gonadotrofinas. Si bien se ha descrito que la expresión génica de esta subunidad es estimulada por gonadotrofinas (Davis et al., 1988; Lapolt et al., 1990; Aloï et al., 1995; Erämaa et al., 1995; Woodruff et al., 1987; Uilenbroek et al., 1998), otros factores paracrinos y autocrinos como el estradiol (Tate et al., 1996; Aloï et al., 1995), IGF-I (Li et al., 1998), activina (Kubo et al., 1998), PGE2 (Erämaa and Ritvos, 1996a), TGF β 1 (Lapolt et al., 1990) también estimularían la transcripción de la subunidad α de inhibina en células ováricas. Muchos de estos factores también tienen efectos sobre la secreción de inhibinas al medio de cultivo en células de granulosa cultivadas *in vitro* (Lanuza et al., 1999; Findlay et al., 2000). Por otro lado otros factores

como EGF y FGF (Lapolt et al., 1990), GnRH (Lapolt et al., 1990) (Rivier and Vale, 1989) inhibirían la transcripción de la subunidad α . El equilibrio entre estos factores endocrinos, paracrinós y autocrinos, algunos de los cuales podrían cobrar mayor importancia en tumores de larga evolución, sería el que finalmente controlaría el nivel de expresión de esta subunidad. Con respecto a esto, hemos demostrado en estudios anteriores (Hockl et al., 2000a) que la producción de inhibina A depende estrechamente de los niveles de IGF-I intraováricos durante las primeras semanas de desarrollo tumoral. Por otro lado, otros autores plantean que en el ovario de ratón la expresión de la subunidad α sería independiente de la estimulación gonadotrófica (O'Shaughnessy and Gray, 1995) o que gonadotrofinas en alta concentración, como las observadas en nuestro modelo, podían inducir la aparición de otros factores como el CREM (modulador del elemento respondedor a AMPc) que inhibirían la estimulación de la subunidad α inducida por cAMP (Mukherjee et al., 1998).

A diferencia de lo que se observa con la subunidad α , la expresión de los RNAm de las subunidades βA y βB de inhibina varía marcadamente en función del tiempo de desarrollo de los luteomas, siendo los niveles muy elevados al mes de desarrollo tumoral, cayendo luego alrededor del tercer mes y tendiendo a subir nuevamente en el mes siete. Es importante notar que la expresión de ambas subunidades va en paralelo, ya que en otras situaciones experimentales se observó secreción de inhibina A y B en forma diferencial (Woodruff et al., 1996). Además, es interesante notar que el cociente entre las variantes de la subunidad βA es aproximadamente de 1 tanto para ovarios en estro como en los tumores, permaneciendo este parámetro inalterado a lo largo del desarrollo tumoral. Si bien no queda esclarecido por este diseño experimental qué factor/es inducen la expresión de las

subunidades β de inhibina en estos tumores en distintas etapas de desarrollo, tanto LH como FSH han sido propuestas como estimuladoras de la expresión de estas subunidades además de otros factores autocrinos y paracrinos (Woodruff et al., 1987; Meunier et al., 1988; Erämaa et al., 1995; Lapolt et al., 1990; Aloï et al., 1995; Robertson et al., 1988; Erämaa and Ritvos, 1996b). A pesar de esto, y de acuerdo con lo propuesto por otros autores (Woodruff et al., 1996; Yohkaichiya et al., 1991; Fahy et al., 1995; Meunier et al., 1988), demostramos una clara correlación negativa entre la expresión de los RNAm de las subunidades βA (grande+pequeña) y βB y los niveles séricos de FSH para los luteomas de 1, 3 y 7 meses de desarrollo, sugiriendo una íntima relación entre síntesis de los mensajeros y secreción de estas hormonas peptídicas ováricas involucradas principalmente en la regulación de la secreción de FSH. Este patrón particular de expresión de las subunidades β sugiere que la producción de inhibinas estaría estrechamente regulada en respuesta a condiciones transitorias, como fuera propuesto para el ciclo estral por Woodruff y col. (Woodruff et al., 1988).

Con respecto al patrón de secreción de gonadotrofinas en animales portadores de tumores ováricos intraesplénicos, se observaron los mismos patrones de secreción determinados en un trabajo anterior en que fueron estudiados detalladamente durante un año (Chamson-Reig et al., 1999a), donde surgió el interrogante sobre una posible participación de la inhibina sobre el control de la secreción de FSH. Es interesante destacar la disminución en los niveles de LH del mes 7. Ya habíamos demostrado que esta caída se producía en ausencia de fluctuaciones de estradiol (Chamson-Reig et al., 1999a). 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 et al., 1988;

Jakubowiak et al., 1990). Otros hallaron un efecto inhibitorio sólo bajo la estimulación de GnRH (Kotsuji et al., 1988), mientras que otros autores no encontraron efecto alguno (Stillman et al., 1983). Además se ha propuesto que inhibina podría reducir los receptores para GnRH en gonadotropos y de esta manera influir sobre la secreción de ambas gonadotropinas (Childs et al., 1997; Braden et al., 1990). En nuestro modelo experimental, en el que existiría una hipersecreción de GnRH por la falta de la retroalimentación negativa, un efecto de inhibina sobre la secreción de LH parece probable luego de largo tiempo de evolución del tumor. El mecanismo por el cual se ejerce este efecto en los animales portadores de tumor será motivo de futuros estudios.

En conclusión, estos resultados demuestran que en los animales portadores del tumor los niveles séricos de FSH y la síntesis de inhibina están estrechamente correlacionados, evidenciando patrones particulares a lo largo del desarrollo, además de demostrar que estos tumores altamente luteinizados son capaces de producir inhibinas, las que podrían considerarse marcadores de tumores de granulosa.

Capítulo III

Vías de señalización de GnRH en células del luteoma

Introducción y objetivos

La presencia de un sistema de GnRH en el ovario normal y tumoral ha sido ampliamente descrito, incluyendo el péptido y su receptor, tanto a nivel del RNA como a nivel proteico (Clayton et al., 1979; Pieper et al., 1981; Aten et al., 1987; Peng et al., 1994; Olofsson et al., 1995; Chamson-Reig et al., 1999b; Gründker et al., 2002; Schally et al., 2001). Su papel como un regulador autocrino/paracrino en el ovario está sostenido por una amplia variedad de efectos atribuidos a la señalización mediada por la unión de GnRH a su receptor, los cuales van desde la modulación de la esteroidogénesis, tanto basal como la inducida por gonadotrofinas, hasta la inducción de la transcripción de numerosos genes involucrados en la maduración folicular, ovulación y atresia (Leung and Steele 1992; Cheng and Leung, 2000). Más aún, GnRH ha mostrado tener efectos inhibitorios directos sobre el crecimiento en tumores hormono sensibles (Emons et al., 1998; Limonta et al., 1999; Nicholson et al., 1985), incluyendo carcinomas de ovario (Kang et al., 2000b; Kimura et al., 1999; Gründker et al., 2001b; Emons et al., 1996). En trabajos previos, nosotros hemos demostrado que un análogo superactivo de GnRH inhibió el desarrollo del tumor ovárico intraesplénico, altamente luteinizado (luteoma) mediante la inhibición de la secreción de gonadotrofinas (Lux-Lantos et al., 1995). También sugerimos una acción directa sobre el tumor por la presencia del receptor de GnRH en el mismo y la acción inhibitoria de GnRH sobre la producción hormonal del tumor (Chamson-Reig et al., 1997). Al analizar el mecanismo de acción que subyace a este efecto, demostramos que el clásico camino de señalización de GnRH, activación de la fosfolipasa C (PLC), parece estar inactivo, ya que el agonista no indujo incrementos en las concentraciones de inosítoles fosfatos o de calcio

intracelular (Chamson-Reig et al., 1999b). Esta falta de activación de la PLC ante la estimulación de GnRH ha sido también observada en otros tumores endocrinos que expresan el receptor de GnRH (Limonta et al., 1999; Emons et al., 1996). Además del clásico camino de transducción de GnRH, el cual involucra la estimulación de la proteína $G_{q/11}$, la cual activa a la fosfolipasa $C\beta$, generando los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato y calcio como así también diacilglicerol (DAG) temprano requerido para la activación de la proteína kinasa C (PKC) convencional, también se han descripto otras fosfolipasas activadas por GnRH. Luego de un breve tiempo de latencia (1-2 minutos), GnRH puede activar a la fosfolipasa A_2 (PLA2) y a la fosfolipasa D (PLD), las cuales pueden proveer de DAG tardío para la activación de las isoformas de las PKC nóveles Ca^{2+} -independientes (Stojilkovic et al., 1994; Shacham et al., 1999). Más aún, los ácidos araquidónico, oleico, linoleico y linolénico pueden activar isoformas específicas de PKC, sin el requerimiento de otros cofactores o pueden inducir la activación de PKCs en presencia de cofactores tal como Ca^{2+} , DAG o fosfatidilserina (Shacham et al., 1999). Por lo tanto la activación secuencial de las fosfolipasas celulares por GnRH proveería activadores lipídicos de PKC en una forma tiempo dependiente, lo cual podría estar coordinado con variados eventos fisiológicos generados por GnRH. Además, se ha demostrado que GnRH activa las cascadas de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) en formas PKC dependiente e independiente, las cuales podrían mediar la regulación transcripcional nuclear por la activación de los factores de transcripción c-fos y c-jun entre otros (Naor et al., 2000). Esto ha sido demostrado en células hipofisarias (Haisenleder et al., 1998; Sim et al., 1995; Reiss et al., 1997) (Han and Conn, 1999; Johnson et al., 2000) y también en células ováricas (Kang et al., 2002a; Kang et al., 2002b;

Kananen et al., 1997). También se ha sido demostrada la activación de tirosina kinasas por GnRH en células α T3-1, una línea celular de gonadotropos (Johnson et al., 2000).

Evidencias de estudios con toxinas y segundos mensajeros indicaron que múltiples proteínas G median las acciones del receptor de GnRH (Cheng and Leung 2000; Stanislaus et al., 1998a). Recientemente utilizando la estimulación de la palmitoilación de proteínas G vía GnRH, Stanislaus y col. demostraron que los receptores de GnRH acoplan a proteínas $G_{q/11}$, $G_{i\alpha}$ y $G_{\alpha x}$ en gonadotropos de rata (Stanislaus et al., 1997; Stanislaus et al., 1998b). Acople a G_i también ha sido demostrado en tumores del tracto reproductivo por diferentes metodologías (Imai et al., 1996; Limonta et al., 1999; Gründker et al., 2001b; Stanislaus et al., 1997; Stanislaus et al., 1998b). Como fuera descripto más arriba, los receptores de GnRH están acoplados a varias proteínas G, y cambios en el número de receptores pueden resultar en el acople diferencial a estas proteínas, permitiendo la activación de diferentes caminos de transducción de señales y finalmente logrando diferentes respuestas fisiológicas. Un ejemplo de esto fue demostrado en células GH₃, transfectadas con receptores de GnRH (G-GH₃). Mientras que la producción de AMPc estimulada por GnRH no fue modificada por cambios en el número de receptores/célula, la producción de inosítoles fosfato (IPs) estimulada por GnRH se incrementó cuando el número de receptores aumentaba (Pinter et al., 1999).

En vista de la complejidad del sistema de señalización de GnRH, decidimos estudiar los caminos alternativos activados por GnRH para producir sus efectos en células del luteoma. Se ha evaluado la activación de la PLD, PLA₂, adenilil ciclasa y MAPK en células del luteoma y en células luteinizadas controles bajo el estímulo de GnRH, como así también la expresión de las proteínas G en ambos tipos celulares.

Materiales y métodos

Animales

Animales portadores del tumor: ratas adultas bilateralmente ovariectomizadas y con implante de un ovario en el bazo, como fuera previamente descrito, 6-8 semanas antes de realizar los experimentos *in vitro* (luteoma).

Animales controles: ratas hembra de 23-25 días, inyectadas con 25 IU de PMSG (Novormon, Syntex, Buenos Aires) y 25 IU hCG (Endocorion, Elea, Buenos Aires) 48 horas más tarde. Estos animales fueron sacrificados por decapitación cinco días luego de la inyección con hCG (SPO), cuando sus ovarios muestran un alto grado de luteinización.

Cultivos celulares

Se aislaron las células de los tumores ováricos, así como también a partir de los ovarios de ratas de 23-25 días de edad superovuladas (SPO) utilizando colagenasa (GIBCO BRL, Life Technologies, New York, Estados Unidos), como fuera descrito previamente (Lux-Lantos et al., 1995; Chamson-Reig et al., 1997). Brevemente, las células fueron cultivadas en placas de cultivo de plástico de 24 pocillos, cubiertas con 500 µl de una solución de 0.5 mg/ml de colágeno (SIGMA, St. Louis, MO) y se incubaron en medio DMEM-F12 (GIBCO BRL) suplementado con 2,2 g/l de bicarbonato de sodio (BIC), 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL) (BIC-SFB), Fungizona (GIBCO BRL) y Gentamicina (GIBCO BRL). Luego de 24 horas de cultivo se reemplazó el medio. Luego de 7 días de cultivo, se lavaron las células una vez con medio libre de suero suplementado con seroalbúmina bovina (SIGMA, St Louis, MO) (DMEM-F12 con 2,2 g/l de bicarbonato de sodio, 0.1%

BSA: BIC-BSA) y luego se las incubó con el estímulo correspondiente en este medio durante los tiempos indicados.

Expresión de proteínas G

Para evaluar la expresión de las proteínas G, se lavaron los cultivos de 8 días de células del luteoma y de SPO (700.000 células/pocillo) con PBS frío y se les agregó 50 µl de buffer de muestra (125 mM Tris base, 1% SDS, 0.1% Azul de Bromofenol, 5% glicerol, 25 mM DTT). Las células se rasparon y los lisados se transfirieron a tubos Eppendorf, se calentaron a 100°C durante 5 minutos, se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 minutos y se mantuvieron a -70°C. En el día de la electroforesis, se corrieron 20 µl de los lisados celulares en geles SDS-PAGE al 15% y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con buffer TTBS-5%BSA (0.1% Tween-20, 10 mM Tris base, 0.07 M NaCl, pH=8) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron luego con anticuerpos generados contra las diferentes variantes de proteínas G, a saber: anti- $G_{\alpha q/11}$ (1:1000) donado gentilmente por el Dr. P. Michael Conn (Oregon, Estados Unidos) y anti- $G_{\alpha 0}$ (1:800), anti- $G_{\alpha i-1}$ (1:1000, el cual también tiene reacción cruzada con $G_{\alpha i-2}$ y $G_{\alpha i-3}$) y anti- $G_{\alpha s}$ (1:1600) de Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, Estados Unidos, durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de proceder con los lavados, los complejos fueron detectados con un segundo anticuerpo anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:2000, 1 hora a temperatura ambiente) y visualizados mediante detección de quimioluminiscencia. Se muestran las imágenes de los inmunoblots.

Actividad de la fosfolipasa D

La actividad de la fosfolipasa D se determinó como descrito por Liscovich y Amsterdam (Liscovitch and Amsterdam, 1989; Amsterdam et al., 1994). Brevemente, las células de los luteomas y SPO (400.000 células/pocillo) fueron preincubadas con [9,10-³H(N)]-ácido oleico (NEN, Boston, MA, 2 µCi/pocillo) durante 24 horas en BIC-0.1% BSA libre de ácidos grasos (SIGMA, St Louis, MO) (BIC-FAF-BSA). Luego, las células se lavaron 3 veces con BIC-FAF-BSA. El medio se cambió a BIC-FAF-BSA 0.5% etanol y se incubó durante 60 minutos en presencia de Buserelina, un agonista superactivo de GnRH ([D-Ser(-tBu)⁶-des-Gly¹⁰]-GnRH-*N*-etilamida, gentilmente donada por Hoechst, Buenos Aires, 1, 10 o 100 ng/ml) o 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, 100 mM, SIGMA) como control positivo. Para finalizar las incubaciones, las placas se colocaron sobre hielo y se enjuagaron dos veces con buffer fosfosalino (PBS) frío. Se agregó metanol frío (1 ml) a cada pocillo, se rasparon las células y la suspensión metanólica se transfirió a tubos de extracción de vidrio, a la cual se agregó 1 ml de cloroformo y 1 ml de una mezcla de 1 N HCl, 1 mM EGTA (SIGMA). Los tubos se vortexearon y centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Se colectó la fase inferior clorofórmica que contiene los lípidos extraídos, se dejó secar y se guardó a 4°C para su posterior análisis. El ³H-fosfatidil etanol, producido por la actividad fosfatidil transferasa de la fosfolipasa D cuando el etanol actúa como el aceptor del grupo fosfatidil, y el ³H-ácido fosfatídico fueron separados de los otros lípidos y entre sí por cromatografía en capa delgada (placas de sílica gel Whatman LK6D), con una fase orgánica compuesta por una mezcla de acetato de etilo/2,2,4-trimetilpentano/ácido acético/agua (13:2:3:10). Las regiones correspondientes a los estándares de fosfatidil etanol y ácido fosfatídico (ICN, Irvine CA, Estados Unidos) en las placas se rasparon y contaron

luego del agregado de líquido centellante en un contador β . Todos los experimentos fueron corridos por duplicado y se repitieron 4 veces. Los resultados se expresaron relativos a la incorporación de ^3H -ácido oleico en cada cultivo.

Actividad de la fosfolipasa A_2

La actividad de la PLA_2 se determinó como fuera descripto por Watanabe y col. (Watanabe et al., 1990) con algunas modificaciones menores. Luego de 48 horas en cultivo, las células (400.000 células/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos) fueron incubadas con [5,6,8,9,11,12,14,15- ^3H (N)]-ácido araquidónico (NEN, 0.5 $\mu\text{Ci/ml/pocillo}$) durante 24 horas. Las células premarcadas se lavaron 3 veces con BIC-FAF-BSA y luego se preincubaron con el mismo buffer por 45 minutos. Luego se incubaron las células en presencia o ausencia de quinacrina (ICN, 10 $\mu\text{M/pocillo}$, 200 μM) por 15 minutos. Se agregaron entonces los estímulos [Bus: 100 ng/ml o prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$): $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$] por 10 minutos. Las placas se colocaron luego sobre hielo, se recogió el medio y se lo contó mediante centelleo líquido. Los resultados se expresan en relación a la incorporación de ^3H -ácido araquidónico en cada cultivo. Con el objeto de determinar que la radioactividad en el medio corresponde al ácido araquidónico, los extractos orgánicos de los medios de cultivo fueron inyectados en una columna de fase reversa (Microsorb-MV C18) y analizados por HPLC utilizando un gradiente de solventes que va desde acetonitrilo:agua:ácido acético (50:50:0.1) hasta acetonitrilo:ácido acético (100:0.1) en 40 minutos, seguido de una fase isocrática con la última mezcla de solventes durante 10 minutos como fuera descripto por Omata et al (Omata et al., 1992). El tiempo de elución del estándar de ^3H -ácido

araquidónico coincidió con el pico en las muestras ensayadas, confirmando de esta manera la identidad de los compuestos radioactivos en el medio de cultivo.

Mediciones de AMPc intracelular

Luego de una preincubación de 24 horas con la toxina de Pertussis (PTX, SIGMA, 150 ng/ml) en BIC-SFB o con medio sólo (control), se lavaron las células del luteoma y SPO (400.000 células/pocillo) con BIC-BSA y se incubaron con Buserelina (100 o 1000 ng/ml), hCG (NIDDKD, $1 \cdot 10^{-9}$ M) o FSK (forskolina, SIGMA, 5 μ M) durante 30 minutos en presencia de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, SIGMA, 0.1 mM). Luego de las incubaciones, las células se colocaron sobre hielo y se lavaron con BIC-BSA, se agregaron 0.7 ml de etanol frío a cada pocillo, se rasparon las células, se transfirió los lisados a tubos Eppendorf, se calentaron durante 5 minutos a 95°C y se los centrifugó a 10.000 rpm. Los sobrenadantes se secaron y se guardaron a -20°C. Finalmente, los extractos fueron resuspendidos en buffer de RIA para AMPc. El AMPc intracelular fue medido por RIA como descrito previamente (del Punta et al., 1996) utilizando un anticuerpo provisto por el NIDDKD. La sensibilidad del ensayo fue de 20 fmol/400000 células. Los experimentos fueron repetidos 4 veces. Los resultados se expresan como porcentaje de incremento sobre los niveles basales considerados como el 100%.

Determinación de PMAK y MAPK por Western blots

Las células del luteoma y SPO (400.000 células/pocillo) se incubaron durante 10 minutos (Han and Conn1999) con Bus (100 o 1000 ng/ml) o PMA (1 μ M) solos o en combinación con los siguientes pretratamientos: toxina de Pertussis (PTX: 150 ng/ml, 24 horas antes del experimento con el objeto de ADP ribosilar a la proteína G_{i0}), PMA (1 μ M, 24 horas antes

del experimento para depletar a la proteína kinasa C, PKC), PD 98059 (SIGMA, 50 μ M, 1 hora antes del experimento para inhibir a la MEK, la enzima que fosforila a la MAPK). En un segundo juego de experimentos se trató a las células con medio o Bus (1 ng/ml) sola o en combinación con los siguientes pretratamientos: SQ 22536 (un inhibidor de la adenilil ciclasa, 0.5 mM, 30 minutos antes del estímulo, ICN Biomedicals Inc, Aurora OH, Estados Unidos), o SQ 22536 (0.5 mM) en combinación con PMA (1 μ M, 24 horas antes del experimento). Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS frío y se agregaron 50 μ l de buffer de muestra. Se rasparon las células, se transfirieron los lisados a tubos Eppendorf y se guardaron a -70°C. En el día de la electroforesis, los lisados celulares se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 10.000xg durante 5 minutos. 20 μ l de los lisados se corrieron en geles SDS-PAGE al 15% y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra). Las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente (ta) con TTBS - 3% leche descremada. El anticuerpo específico anti fosfo-MAPK (p-MAPK) (1:2000) generado en ratón, el cual detecta MAPK p44 y p42 solamente si están fosforiladas en Thr²⁰² y Tyr²⁰⁴, fue utilizado para medir la activación de la MAPK (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, Estados Unidos). En forma alternativa, las membranas fueron reveladas con un anticuerpo policlonal para MAPK 44/42 generado en conejo (1:1200), el cual detecta MAPK total (t-MAPK), independientemente del estado de fosforilación. Las incubaciones con el primer anticuerpo fueron realizadas durante 1 hora a ta. Luego de los respectivos lavados, las señales fueron detectadas con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:2000, 1 hora ta) y visualizadas por detección de quimioluminiscencia.

La cuantificación de los *immunoblots* se realizó con el programa Imagequant. Los niveles de p-MAPK fueron estandarizados contra los niveles de t-MAPK en cada muestra.

Determinación de progesterona

Se determinó la progesterona en el medio de cultivo de células tumorales y luteales controles (400.000 células/pocillo) estimuladas con hCG ($1 \cdot 10^{-9}$ M) en presencia o ausencia de Buserelina (100 ng/ml) durante 24 horas y con o sin preincubaciones con PTX (150 ng/ml, 24 h de preincubación antes del agregado de los estímulos) o Bisindolilmaleimida I (GF 109203X, un inhibidor de la PKC, 25 μ M, 30 min antes del agregado de los estímulos, ICN Biomedicals Inc). La progesterona se determinó por RIA. Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron 3 veces.

Radioinmunoanálisis de progesterona

Preparación de la muestra: a 300 μ l de medio de cultivo se les agregó 200 μ l de buffer fosfato 0.075 M, pH 7.5, conteniendo 0.5% (P/V) de gelatina (buffer fosfato gelatina).

Estándares: se prepararon a partir de una solución de progesterona de 1 μ g/ml (SIGMA) en etanol, en un rango de 6.25 a 6400 pg por tubo en 500 μ l de buffer fosfato gelatina.

Antisuero: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 200 μ l de antiprogesterona (GDN 337) gentilmente donada por el Dr. Niswender (Font Collins, CO, Estados Unidos), disuelta en buffer fosfato gelatina en una dilución de 1:2400.

Hormona radioactiva: la progesterona tritiada (NEN) 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 μ l), 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 adsorbe 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 solución centellante. 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 6.25 pg/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.5% y 11.9%, respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ SE. Los datos fueron analizados por ANOVA en uno o dos sentidos, según el caso, seguidos del test de las comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls, utilizando en programa Statistica V5. Cuando sólo se comparó dos grupos se utilizó el test Student. En todos los casos los resultados fueron considerados significativos si $p < 0.05$.

Resultados

Expresión de proteínas G en células ováricas tumorales y controles

Dado que en trabajos previos habíamos demostrado que las células tumorales difieren de las células luteales control en la señalización de GnRH, como primer objetivo determinamos si esto podía deberse a diferencias en la expresión de las proteínas G que se acoplan al receptor de GnRH. En este capítulo demostramos que ambos tipos celulares expresan todas las proteínas G evaluadas, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha i}$, y $G_{\alpha o}$, detectadas en los pesos moleculares esperados (Fig. 1), indicando que la diferencia en la respuesta a GnRH entre las células tumorales y las controles no se debía a la falta de alguna clase de proteína G en las mismas.

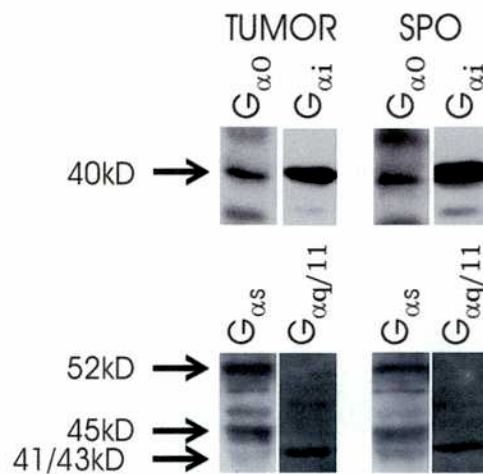


Figura 1: Expresión de las proteínas G en células tumorales y SPO. Las proteínas G se determinaron por *Western blots* con antisueros específicos. Las flechas indican los pesos moleculares a los cuales se detectan las bandas específicas.

Activación de la PLD inducida por Buserelina en células ováricas tumorales y controles

La activación de la PLD, medida como el incremento de fosfatidil etanol y ácido fosfatídico intracelulares en relación a la incorporación de ^3H -ácido oleico en respuesta a diferentes estímulos, fue determinada en células tumorales y SPO. La incorporación de ^3H -ácido oleico fue de $63.0 \pm 1.1\%$ en células tumorales y de $75.5 \pm 0.9\%$ en células SPO, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). En condiciones de ausencia de estimulación, las células tumorales mostraron niveles de fosfatidil etanol significativamente menores que las células SPO (Tumor ($^3\text{H-PE}/^3\text{H-OA}$): 1.78 ± 0.05 vs SPO ($^3\text{H-PE}/^3\text{H-OA}$): 2.77 ± 0.25 , $p < 0.01$, $n:4$). Además, mientras que las células SPO mostraron un incremento de fosfatidil etanol dependiente de la concentración en presencia de Buserelina (1, 10 o 100 ng/ml) luego de 60 minutos de incubación, alcanzando significancia estadística a partir de 1 ng/ml (Fig. 2, panel derecho), en células tumorales solamente la concentración mayor estimuló el incremento de fosfatidil etanol (Fig. 2, panel izquierdo) y en menor grado que en las células SPO [fosfatidil etanol inducido por Buserelina (veces de incremento): Tumor: 1.23 ± 0.05 vs SPO: 1.510 ± 0.09 , $p < 0.03$, $n:4$]. La respuesta a PMA ($0.5 \mu\text{M}$), un conocido activador de la PLD, fue también significativamente más intensa en células SPO que en células tumorales [fosfatidil etanol inducido por PMA (veces de incremento): Tumor: 3.75 ± 0.77 vs SPO: 7.77 ± 0.67 , $p < 0.01$, $n:4$].

Además, Bus (100 ng/ml) y PMA ($0.5 \mu\text{M}$) provocaron incrementos significativos de ácido fosfatídico en ambos tipos celulares (no se muestra).

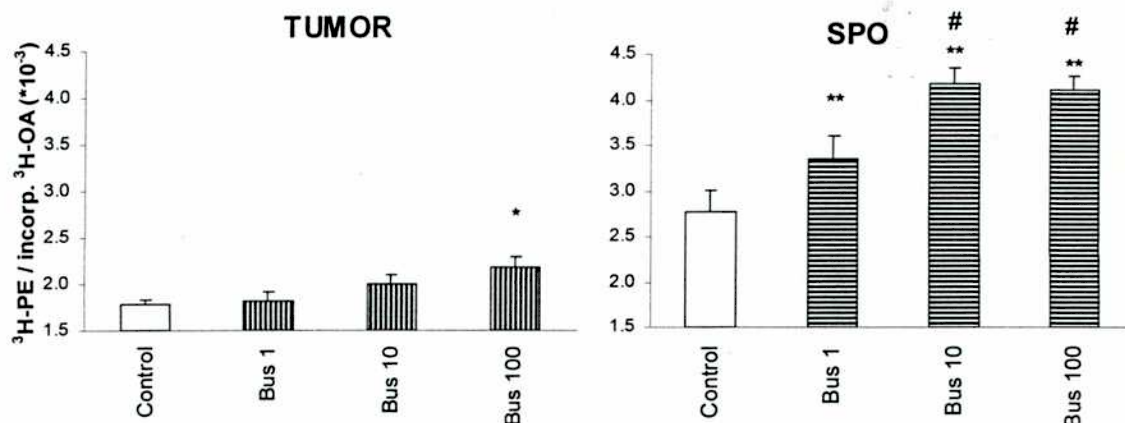


Figura 2: Activación dosis dependiente de PLD por Buserelina (1, 10 o 100 ng/ml), medida como el cociente entre el ^3H -fosfatidil etanol formado ($^3\text{H-PE}$: cpm) luego de 60 minutos de estimulación y el ^3H -ácido oleico incorporado en las células ($^3\text{H-OA}$: cpm) en células tumorales y SPO.

*: significativamente diferente del control.

#: significativamente diferente de Bus 1, $p < 0.05$ o menor.

Activación de la PLA_2 inducida por Buserelina en células ováricas tumorales y controles

Se determinó la activación de la PLA_2 , medida como el incremento de ^3H -ácido araquidónico libre en el medio de cultivo en relación a la incorporación de ^3H -ácido araquidónico en cada cultivo luego de 10 minutos de estimulación de las células con Buserelina (100 ng/ml) o $\text{PGF2}\alpha$ (1.10^{-5} M, utilizado como control). La incorporación de ^3H -ácido araquidónico en las células tumorales oscila entre el 31% al 67% con una incorporación media de $54.5 \pm 7.5\%$, mientras que en células SPO el rango fue de 64% hasta 75% con una incorporación media de $69.5\% \pm 2.5$, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.04$). Las células SPO respondieron significativamente a ambos estímulos con un incremento en los niveles de ácido araquidónico tritiado en el medio de cultivo (Fig

3, panel derecho). Contrariamente, no se evidenciaron incrementos en ^3H -ácido araquidónico en el medio correspondiente a células tumorales ante ningún estímulo (Fig 3, panel izquierdo). En presencia de 200 μM de quinacrina, un inhibidor de la PLA_2 , se observó una reducción significativa en los niveles basales de ^3H -ácido araquidónico en las células SPO. Además, los efectos estimulatorios de Buserelina y de $\text{PGF}2\alpha$ fueron completamente abolidos, indicando la especificidad de la respuesta. En las células tumorales no se observaron variaciones significativas en los niveles de ^3H -ácido araquidónico, tanto en condiciones basales como estimuladas, en presencia del inhibidor.

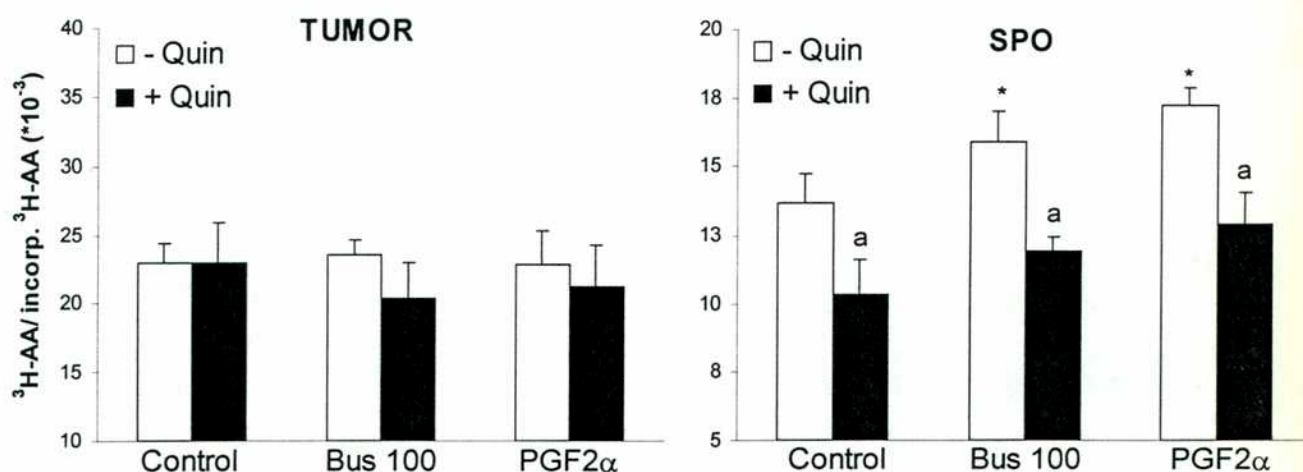


Figura 3: Efecto de la Buserelina (Bus 100 ng/ml) y $\text{PGF}2\alpha$ (1.10^{-5} M) sobre la activación de la PLA_2 medida como el cociente entre el ^3H -ácido araquidónico liberado al medio (^3H -AA: cpm) luego de 10 minutos de estimulación y el ^3H -ácido araquidónico incorporado en las células (cpm). Los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de Quinacrina, el inhibidor de la PLA_2 (Quin: 200 μM) en células tumorales y SPO.

*: significativamente diferente del control.

a: significativamente diferente de las células sin quinacrina. $p < 0.05$ o menor.

Efecto de Buserelina sobre la producción de AMPc en células ováricas tumorales y controles

Los niveles basales de AMPc, cuando fueron corregidos en relación al contenido de DNA, fueron aproximadamente seis veces mayores en células luteinizadas controles (SPO) que en células tumorales [AMPc (fmol/ μ g DNA): Células tumorales: 18.4 ± 1.2 vs. células SPO: 114.5 ± 1.0 , $p < 0.01$, $n: 6$]. Con el objeto de analizar la capacidad de cada tipo celular de responder a diferentes estímulos, se expresaron los niveles de AMPc como el porcentaje de incremento con respecto a los niveles basales. Se utilizó forskolina, un estimulador de la adenilil ciclase, como control positivo y la respuesta de ambos tipos celulares a este estímulo fue similar (Fig. 4, paneles izquierdo y derecho). Buserelina indujo un incremento en la producción de AMPc en ambos tipos celulares, pero mientras que las células tumorales respondieron a ambas concentraciones ensayadas, las células SPO solamente respondieron a la menor y en un grado similar que en células tumorales (Fig 5, paneles izquierdo y derecho).

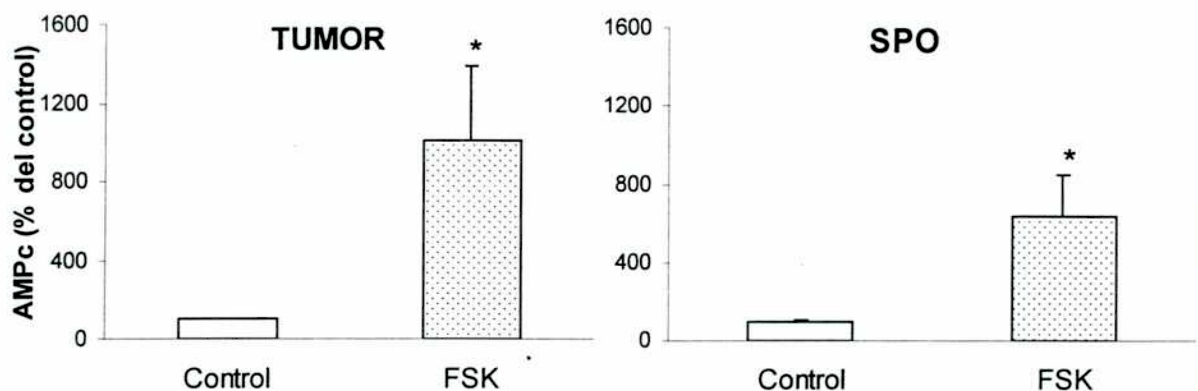


Figura 4: AMPc (% del control) en células tumorales y SPO tratadas con medio como control (100%) o Forskolina 5μ M durante 30 minutos en presencia de IBMX.
*: significativamente diferente del control.

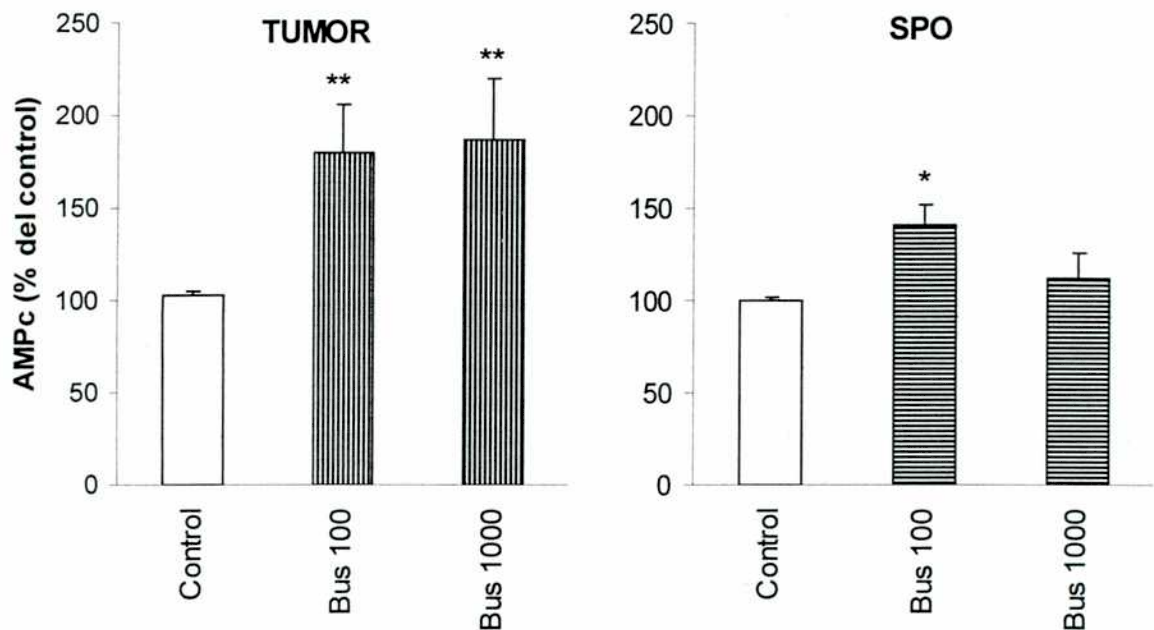


Figura 5: AMPc (% del control) en células tumorales y SPO tratadas con medio como control (100%) o Buserelina (Bus: 100 y 1000 ng/ml) durante 30 minutos en presencia de IBMX.

*: significativamente diferente del control.

El efecto de hCG fue probado solo o en combinación con Buserelina en ambos tipos celulares. Esta gonadotrofina estimuló significativamente la producción de AMPc en ambos tipos celulares (Fig 6, paneles izquierdo y derecho). hCG indujo significativamente mayores niveles de AMPc en células tumorales que en células SPO [AMPc (veces de respuesta): Tumor-hCG: 3 ± 0.7 vs. SPO-hCG: 1.7 ± 0.2 , $p < 0.05$, $n: 6$]. Además, mientras que en las células tumorales la combinación de hCG y Buserelina inhibió la producción de AMPc inducido por hCG, en células SPO la combinación de drogas indujo niveles de AMPc similares a aquellos observados con hCG o Buserelina solos.

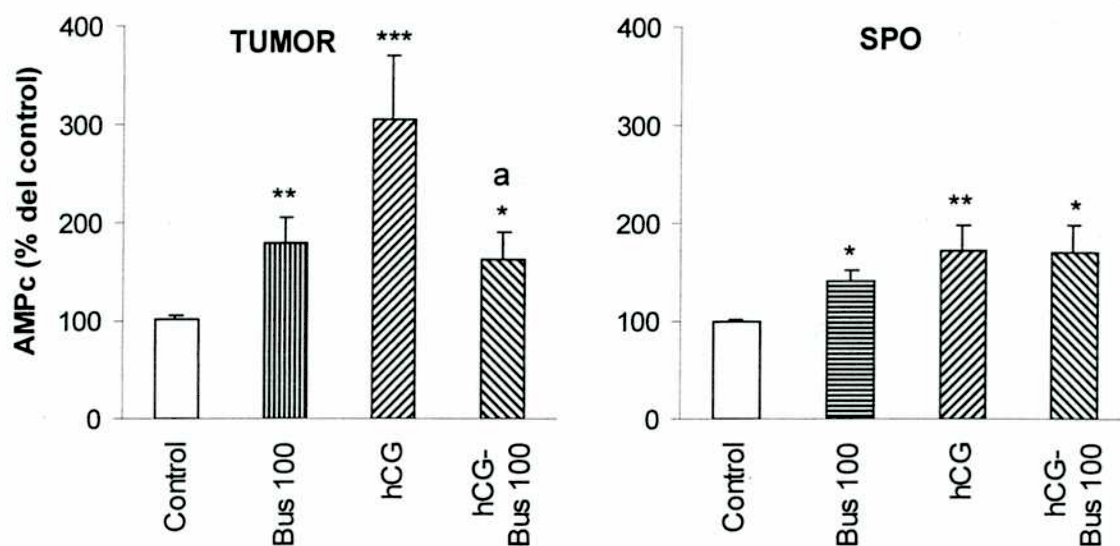


Figura 6: AMPc (% del control) en células tumorales y SPO tratadas con medio como control (100%), Bus 100 ng/ml, hCG: 1.10^{-9} M o la combinación de ambos durante 30 minutos en presencia de IBMX.

*: significativamente diferente del control.

a: significativamente diferente de hCG. $p < 0.05$ o menor.

Con el objeto de determinar si el efecto de la Buserelina sobre la producción de AMPc involucraba una proteína G del tipo i/o, se pretrataron las células durante la noche con PTX y se sometieron luego al estímulo con Buserelina. El efecto de Buserelina no se alteró con la preincubación con PTX en ningún tipo celular, pero la inactivación de Gi/o indujo un incremento significativo en los niveles basales de AMPc solamente en las células tumorales (Fig. 7, paneles izquierdo y derecho).

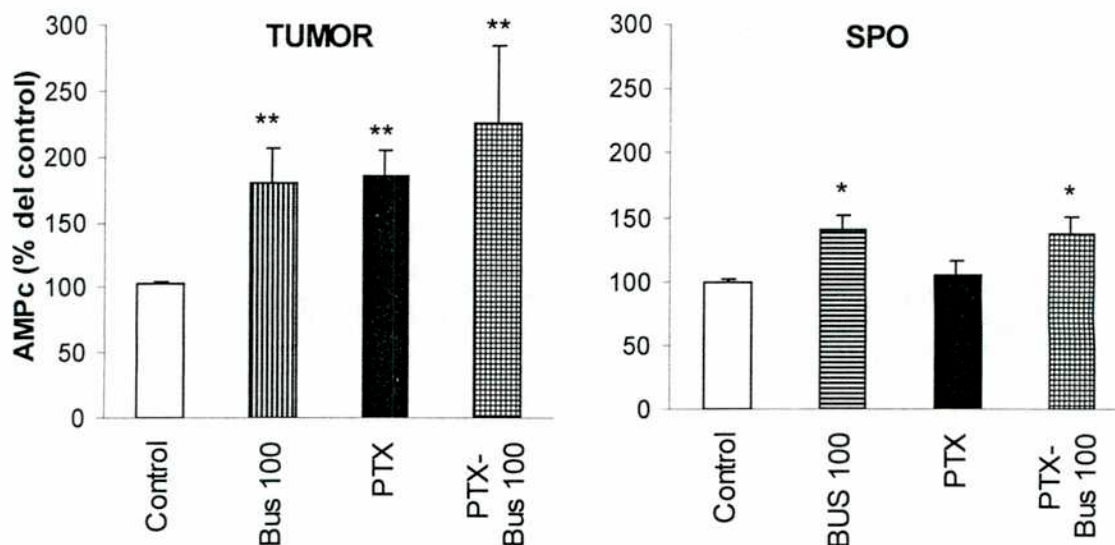


Figura 7: AMPc (% del control) en células tumorales y SPO tratadas con medio como control (100%), Bus 100 ng/ml, Toxina de Pertussis (PTX: 150 ng/ml, 24 horas de preincubación) o la combinación de ambos durante 30 minutos en presencia de IBMX.

*: significativamente diferente del control.

a: significativamente diferente de hCG. $p < 0.05$ o menor.

Efecto de la Buserelina sobre la secreción de progesterona basal e inducida por hCG en células del tumor: participación de la proteína $G_{i/o}$

En las células tumorales la Buserelina mostró una tendencia a incrementar los niveles de progesterona, sin alcanzar significancia estadística; además la misma ejerció un efecto inhibitorio sobre los niveles de progesterona estimulados por hCG (Fig. 8). Estos resultados están de acuerdo con el efecto de la Buserelina sobre la producción de AMPc (ver más arriba). Para profundizar en la evaluación de la participación de las proteínas $G_{i/o}$ en la inhibición de la secreción de progesterona estimulada por hCG, se pretrataron las células tumorales con PTX. PTX incrementó por sí misma en forma significativa los niveles de progesterona [Prog (pg/400.000 células): control: 9.7 ± 1.7 vs PTX: 34.1 ± 4.9 , $p < 0.01$, $n=3$] consistentemente con el incremento en los niveles de AMPc mencionados más arriba. La combinación de PTX y hCG potenció el efecto sobre la secreción de progesterona (Fig. 9).

La inhibición inducida por Buserelina sobre la secreción de progesterona estimulada por hCG no se alteró en presencia de PTX, indicando que la Buserelina no está actuando a través de proteínas $G_{i/o}$ en células tumorales para inducir este efecto.

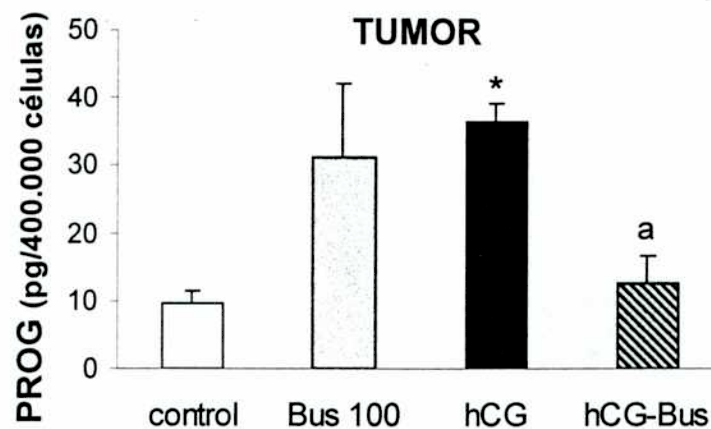


Figura 8: Secreción de progesterona al medio de cultivo en células tumorales tratadas con Bus (100 ng/ml), hCG (1.10^{-9} M) o en combinación de ambas

*: significativamente diferente del control.

a: significativamente diferente de hCG.

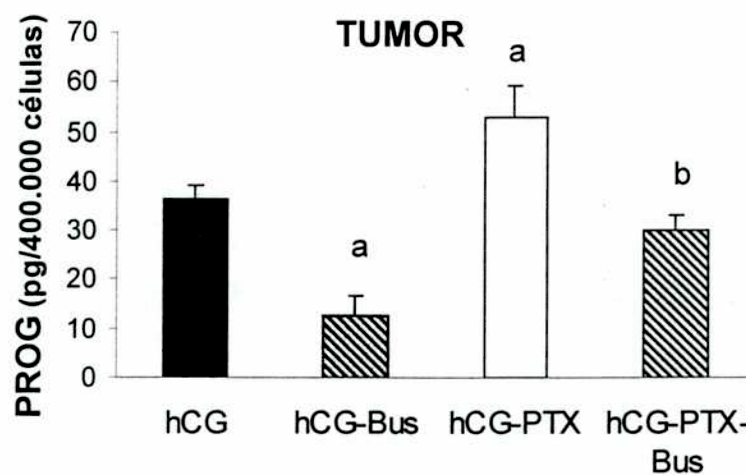


Figura 9: Secreción de progesterona al medio de cultivo en células tumorales tratadas con: hCG (1.10^{-9} M) sola o en combinación con Bus (100 ng/ml) en ausencia o presencia de PTX

a: significativamente diferente de hCG.

b: significativamente diferente de hCG-PTX.

Participación de la protein kinasa C en el efecto inhibitorio que ejerce la Buserelina sobre la progesterona estimulada por hCG en células del tumor

Con el objeto de evaluar si la proteína kinasa C estaba involucrada en la respuesta inhibitoria de la Buserelina sobre la secreción de progesterona inducida por hCG, se preincubaron las células tumorales con GF 109203X (25 mM, 30 minutos), el cual es un inhibidor selectivo de la proteína kinasa C. En presencia de GF 109203X se abolió completamente el efecto inhibitorio de la Buserelina, sin afectar el efecto estimulador de hCG (Fig. 10), indicando que la PKC está involucrada en forma crítica en este efecto.

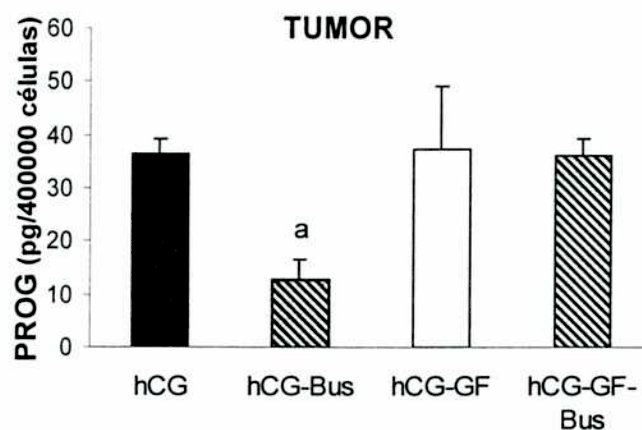


Figura 10: Secreción de progesterona al medio de cultivo en células tumorales tratadas con: hCG (1.10^{-9} M) sola o en combinación con Bus (100 ng/ml) en ausencia o presencia de GF 109203X (25 μ M), el inhibidor específico de la PKC.
a: significativamente diferente de hCG.

Fosforilación de la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK) p44/42 inducida por Buserelina en células ováricas tumorales y controles

Ambos tipos celulares respondieron a la Buserelina con la activación de la MAPK luego de 10 minutos de incubación (Fig. 11, paneles izquierdo y derecho), siendo el grado de

estimulación significativamente superior en las células SPO [veces de incremento: tumor: 2.411 ± 0.614 vs SPO: 19.761 ± 7.020 , $p < 0.05$, $n:4$]. No se observaron diferencias entre las concentraciones de Buserelina de 100 y 1000 ng/ml sobre la activación de la MAPK en ningún tipo celular.

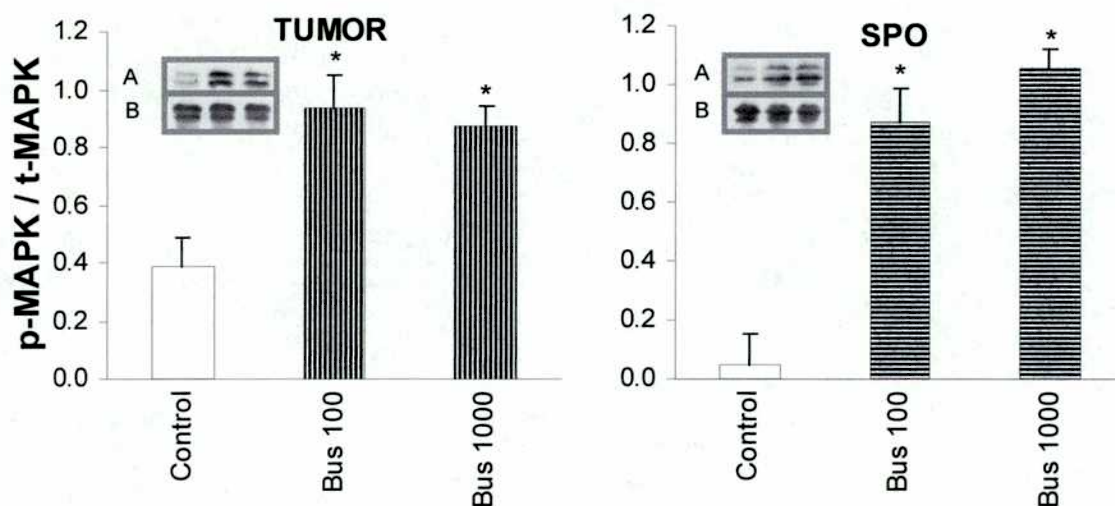


Figura 11: Activación de la MAPK inducida por Buserelina (100 y 1000 ng/ml) en células tumorales y SPO. La activación de la MAPK se determinó mediante *Western blots* con antisueros específicos. La cuantificación de los *immunoblots* se realizó por densitometría (Imagequant soft). Para esta y las siguientes figuras: los resultados se expresan como la media del cociente entre la MAPK fosforilada (p-MAPK) y la MAPK total (t-MAPK) en cada pocillo en 3-5 experimentos. Recuadro interior: *immunoblots* representativos: A: p-MAPK, B: t-MAPK.

*: significativamente diferente del control.

Para evaluar si la estimulación inducida por Buserelina era un efecto específico sobre la fosforilación de la MAPK, se testeó la Buserelina en combinación con 50 μ M de PD 98059, el inhibidor de la MEK (MAPK kinasa). En ambos tipos celulares PD 98059 abolió completamente la activación de la MAPK (Fig. 12).

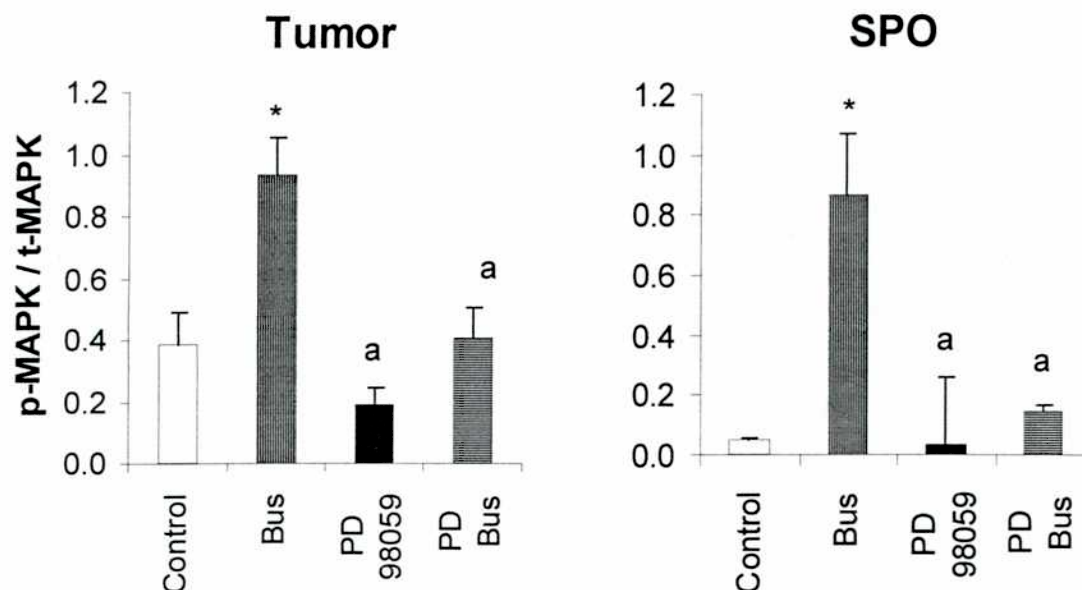


Figura 12: Activación de la MAPK inducida por Buserelina (Bus 100 ng/ml) en células tumorales y SPO en presencia o ausencia del inhibidor de MEK1, PD 98059 50 μ M.

*: significativamente diferente del control.

a: significativamente diferente de Bus.

Efecto del pretratamiento con PMA o PTX sobre la activación de la MAPK p44/p42 inducida por Buserelina en células tumorales y SPO

Con el objeto de examinar si la vía de transducción de la señal de la proteína kinasa C estaba involucrada en la fosforilación de la MAPK inducida por Buserelina, se pretrataron las células durante 24 horas con PMA (1 μ M), un tratamiento que depleta la PKC. Este pretratamiento abolió completamente la fosforilación de la MAPK inducida por Buserelina y PMA en ambos tipos celulares, indicando que se trataba de un fenómeno PKC dependiente (Fig. 13, paneles izquierdo y derecho). Resultados similares se obtuvieron en presencia del inhibidor de la PKC, el GF 109203X (no se muestra).

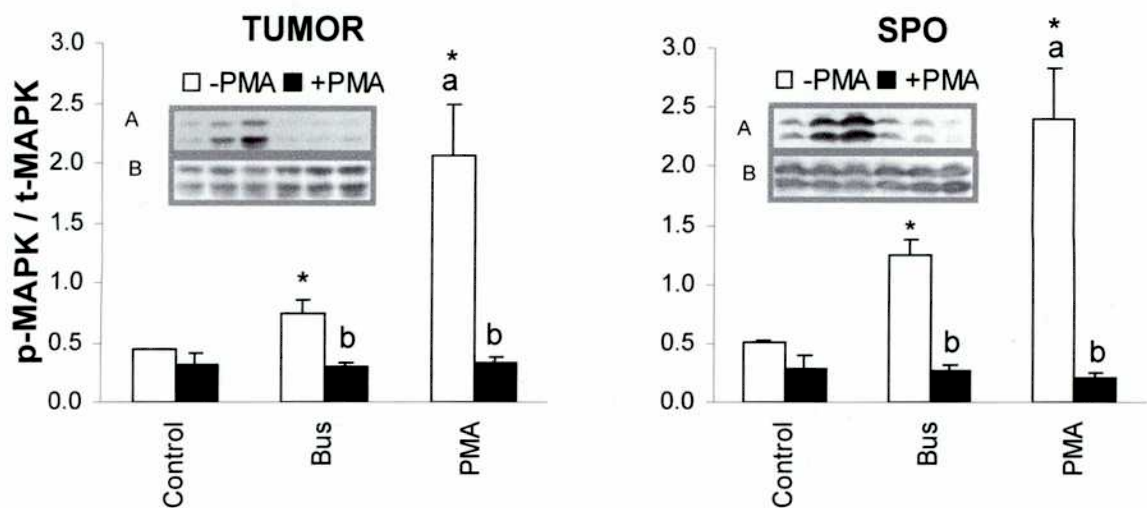


Figura 13: Activación de la MAPK inducida por Buserelina (100 ng/ml) y PMA (1 μ M) en presencia o ausencia del pretratamiento con PMA (1 μ M, 24 horas antes del experimento) en células tumorales y SPO. Recuadro interno: *immunoblots* representativos: A: p-MAPK, B: t-MAPK, cuadrados abiertos: sin pretratamiento con PMA, cuadrados negros: con pretratamiento con PMA.

*: significativamente diferente del control.

a: significativamente diferente de Bus.

b: significativamente diferente de las células sin pretratamiento con PMA.

Además, para evaluar si la activación de la MAPK inducida por Buserelina estaba mediada por proteínas del tipo $G_{i/o}$, las células fueron pretratadas con PTX (150 ng/ml) durante la noche. La activación de la MAPK inducida por Buserelina no se alteró por el pretratamiento con PTX en ningún tipo celular, indicando que este tipo de proteína G no estaba involucrado en la respuesta (Fig. 14, paneles izquierdo y derecho).

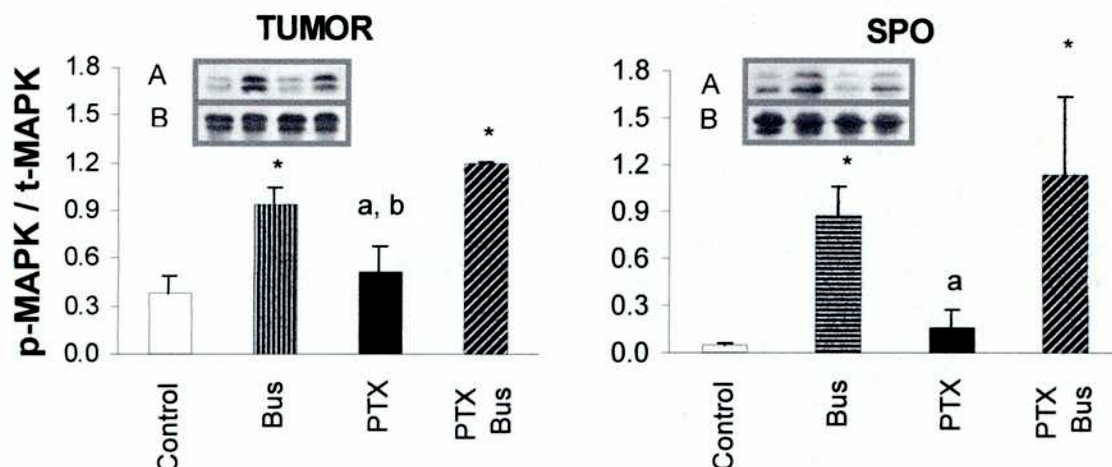


Figura 14: Activación de la MAPK inducida por Buserelina (100 ng/ml) en células tumorales y SPO, en presencia o ausencia del pretratamiento con PTX (150 ng/ml, 24 horas antes del experimento).

*: significativamente diferente del control.

a: significativamente diferente de Bus.

b: significativamente diferente de PTX-Bus.

Activación de la MAPK p44/p42 inducida por Buserelina en presencia de la inhibición de la adenilil ciclasa o de la adenilil ciclasa y la proteína kinasa C en células tumorales y SPO

En presencia del inhibidor de la adenilil ciclasa, SQ 22536, la fosforilación de la MAPK inducida por Buserelina se inhibió en las células tumorales (Fig. 15, panel izquierdo). En contraste, en las células SPO la preincubación con SQ 22536 no alteró la activación de la MAPK inducida por Buserelina (Fig. 15, panel derecho). La combinación de los inhibidores de la adenilil ciclasa y de la proteína kinasa C abolieron completamente la fosforilación de la MAPK inducida por Buserelina en ambos tipos celulares (Fig. 15, paneles izquierdo y derecho).

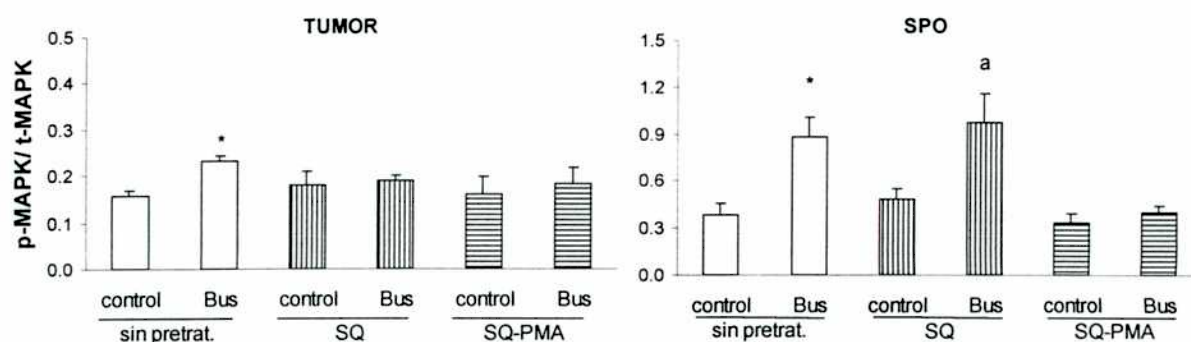


Figura 15: Activación de la MAPK inducida por Buserelina (100 ng/ml) en células tumorales y SPO, en presencia o ausencia de los siguientes pretratamientos: SQ 22536, el inhibidor de la adenilil ciclasa (0.5 mM, 30 minutos antes del estímulo), o SQ 22536 más PMA (1 μ M, 24 horas antes del experimento).

*: significativamente diferente del control en células sin pretratamientos.

a: significativamente diferente del control en células pretratadas con SQ 22536.

Fosforilación de la MAPK p44/p42 inducida por AMPc en células tumorales

Para probar si el AMPc por sí mismo era capaz de incrementar la fosforilación de la MAPK en las células tumorales, éstas fueron estimuladas con 1 mM de dibutilil AMPc durante 10 minutos con o sin previa preincubación con GF 109203X, el inhibidor de la PKC. El AMPc incrementó significativamente la activación de la MAPK (Fig. 16). En presencia del GF 109203X esta estimulación fue abolida.

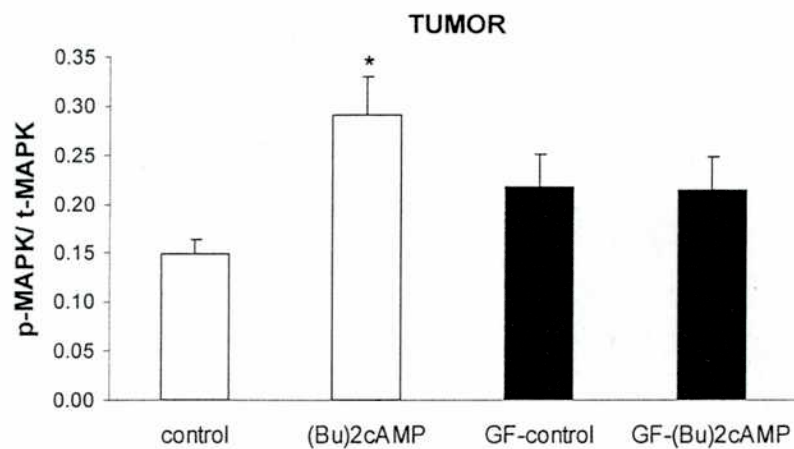


Figura 16: Activación de la MAPK inducida por dibutiryl-AMPc [(Bu)₂cAMP, 1 mM] en células tumorales en ausencia o presencia del inhibidor de la PKC, GF 109203X (25 μM).
*: significativamente diferente del control en células sin pretratamientos.

Discusión

El sistema de transducción de señales disparado por GnRH se ha vuelto cada vez más complejo, involucrando múltiples caminos. La vía clásica y más común involucra el acople a proteínas $G_{q/11}$, activación de fosfolipasa $C\beta$ (PLC), generación de los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol seguido de la activación de la proteína kinasa C y un incremento en el calcio intracelular. Sin embargo, se han descripto además numerosos caminos alternativos incluyendo la estimulación de varias proteínas G, activación de fosfolipasas D y A_2 , activación de adenilil ciclasa y proteína kinasas A, fosforilación de proteínas kinasas activadas por mitógenos (Cheng and Leung2000; Stanislaus et al., 1998a; Shacham et al., 1999; Kraus et al., 2001), activación de tirosina kinasas (Johnson et al., 2000) y fosfotirosinas fosfatasas (Emons et al., 1998; Gründker et al., 2001b). Diferentes tipos celulares expresarían uno o más de estos caminos y la compleja comunicación cruzada resultante entre las moléculas mensajeras condicionan la respuesta a GnRH. Además, cambios en el número de receptores pueden resultar en el acople diferencial a proteínas G. Estos eventos le permitirían al GnRH modular diferentes caminos de transducción, y finalmente arribar a diferentes respuestas fisiológicas (Stanislaus et al., 1998a). El propósito del presente trabajo fue identificar el/los camino/s de transducción de señales activados por GnRH en células ováricas tumorales derivadas de tumores ováricos intraesplénicos, altamente luteinizados, en las cuales se ha demostrado previamente en el laboratorio que GnRH no estimula el camino clásico de transducción vía PLC (Chamson-Reig et al., 1999b). La falta de activación de PLC inducida por GnRH ha

sido también descripta en una variedad de tumores (Emons et al., 1996; Emons et al., 1998).

Como el receptor de GnRH puede acoplarse a numerosas proteínas G (Stanislaus et al., 1998a), nosotros inicialmente intentamos determinar si las proteínas G, las cuales se ha descrito que acoplan a este receptor, se expresan en células tumorales. G_s , $G_{q/11}$, G_i y G_o se expresaron tanto en células tumorales como luteales controles (SPO), descartando entonces que la respuesta atípica respecto a la PLC era consecuencia de una expresión alterada de proteínas G.

Como también había sido descrito que otras fosfolipasas son estimuladas por GnRH tanto en hipófisis (Naor and Catt, 1981; Netiv et al., 1991) como en células ováricas (Minegishi and Leung, 1985; Watanabe et al., 1990; Liscovitch and Amsterdam 1989), se estudió el efecto de la Buserelina sobre la activación de PLA_2 y PLD en nuestro sistema. Las células controles SPO mostraron el esperado incremento en la liberación de 3H -ácido araquidónico en respuesta a la estimulación con Buserelina, indicando la activación de la PLA_2 . En presencia del inhibidor de la PLA_2 , quinacrina, esta activación fue inhibida así como también los niveles basales. En células tumorales no se observó variación en el 3H -ácido araquidónico bajo tratamiento con Buserelina. Además, los niveles basales de ácido araquidónico tampoco se modificaron por quinacrina, sugiriendo que los mismos no derivarían de la acción basal de la PLA_2 sobre los fosfolípidos de la membrana en células tumorales. La PLA_2 ovárica de rata ha demostrado ser calcio dependiente (Minegishi et al., 1987; Kol et al., 1997). Además, en neuronas hipotalámicas inmortalizadas se ha demostrado que la PLA_2 dependiente de calcio actúa "río abajo" de la PLC (Kreda et al., 2001). Por ello, la deficiencia en la estimulación de PLA_2 inducida por Buserelina en células tumorales podría ser consecuencia de la falta de activación significativa de PLC

descrita en respuesta a Buserelina en estas células, dado que no se incrementaron los niveles de inosítoles fosfato y de calcio (Chamson-Reig et al., 1999b). Con respecto a la PLD, los niveles basales de fosfatidil etanol fueron significativamente menores en células tumorales que en SPO, y la respuesta a PMA, un conocido activador de esta enzima, también estuvo considerablemente disminuida en células tumorales. Estos resultados sugieren que los niveles de la PLD estarían disminuidos en este tipo celular o que la actividad de la enzima estaría afectada. En las células SPO el efecto de la Buserelina sobre la acumulación del fosfatidil etanol fue dependiente de la concentración y alcanzó la saturación a una concentración de 10 ng/ml, similar a lo que había sido reportado previamente en células de la granulosa (Liscovitch and Amsterdam 1989). En células tumorales solamente la concentración mayor del agonista de GnRH fue capaz de inducir una respuesta significativa y en menor grado que en las células SPO. En células de hipófisis Zheng y col. demostraron que la activación de la PLD inducida por GnRH era secundaria a una activación previa de PLC-PKC (Zheng et al., 1994). En células de la granulosa esta cascada es menos clara, ya que el tratamiento de las células con el inhibidor de la PKC, H-7, no modificó la producción de fosfatidil etanol inducida por GnRH, mientras que inhibió el efecto del TPA (13-acetato-12-O-tetradecanoil forbol) sobre la PLD, por lo cual los autores propusieron una activación directa de PLD por el agonista de GnRH dependiente de proteína G (Liscovitch and Amsterdam 1989). Aunque la acción de la Buserelina sobre la activación de la PLD en nuestras células tumorales es bastante débil, el ácido fosfatídico liberado podría ejercer efectos directos sobre la esteroidogénesis (Liscovitch and Amsterdam 1989; Amsterdam et al., 1994) o afectar otros sistemas de señalización como por ejemplo la PKC por su conversión a diacilglicerol (Shacham et al., 1999). Por lo tanto, teniendo en consideración los resultados sobre la PLA₂ y la PLD además de los anteriores

sobre la PLC (Chamson-Reig et al., 1999b), se podría sugerir que las fosfolipasas no constituyen los caminos de transducción de señales principales que median los efectos de GnRH en células de los luteomas.

A continuación se intentó determinar la participación de la adenilil ciclasa en la señalización de GnRH en las células tumorales. En un trabajo pionero, Borgeat y col demostraron que GnRH estimuló la acumulación de APMc en lóbulos anteriores de glándulas hipofisarias incubadas *in vitro* (Borgeat et al., 1972). Posteriormente, se confirmó el acople del receptor de GnRH a la proteína $G_{\alpha s}$ en gonadotropos (Stanislaus et al., 1998b) y en células hipofisarias GH₃ (Kuphal et al., 1994; Stanislaus et al., 1998a) y COS-7 (Arora et al., 1998) transfectadas con el receptor de GnRH. Además, se reportaron resultados controvertidos con respecto a este tema en células ováricas, ya que algunos autores informaron incrementos de AMPc inducidos por GnRH (Ranta et al., 1982; Knecht et al., 1981), mientras que otros no observaron efecto alguno (Behrman et al., 1980; Massicotte et al., 1981; Eckstein et al., 1986; Kang et al., 2002b). Además se ha propuesto que GnRH inhibe la producción de AMPc estimulada por LH o FSH tanto en células de granulosa inmaduras como en células de granulosa o luteales diferenciadas (Behrman et al., 1980; Harwood et al., 1980; Massicotte et al., 1981; Ranta et al., 1982). Nosotros observamos que tanto en el luteoma como en las células SPO controles la Buserelina estimuló significativamente la producción de AMPc. Además, la Buserelina inhibió la producción de AMPc estimulada por hCG solamente en células tumorales, en concordancia con nuestros resultados sobre la secreción de progesterona, en los cuales describimos que Buserelina inhibió la secreción de progesterona inducida por hCG en células tumorales pero no en las SPO (Chamson-Reig et al., 1997). La falta de efecto de GnRH sobre la producción de

AMPc inducida por hCG en las células SPO, a pesar de estar en concordancia con nuestros resultados de progesterona, difiere de los resultados de otros laboratorios y podría ser consecuencia de las diferentes condiciones experimentales. El efecto de GnRH sobre la producción de AMPc es independiente de $G_{\alpha i/o}$, ya que no se alteró por el tratamiento con toxina de Pertussis. Llamativamente, el tratamiento con PTX por sí mismo incrementó los niveles de AMPc solamente en células tumorales, sugiriendo que estas células poseen una proteína $G_{\alpha i/o}$ basalmente activa, la cual podría estar inhibiendo la función de la adenilil ciclase y podría explicar los niveles basales significativamente menores de AMPc observados en células tumorales en comparación con las células SPO controles. La estimulación de la vía de señalización del AMPc por GnRH, simultáneamente a la ausencia de efecto sobre el camino de la PLC, podría ser consecuencia del número de receptores de GnRH expresados en las células tumorales, ya que se ha descrito que un bajo número de los mismos no interfiere con la producción de AMPc mientras que sí afecta la formación de IP (Pinter et al., 1999; Johnson et al., 2000). Hemos demostrado previamente que los receptores de GnRH son cinco veces menos abundantes en estos tumores ováricos que en la hipófisis anterior (Chamson-Reig et al., 1997). Sin embargo, también demostramos que su número es significativamente mayor en tumores ováricos intraesplénicos que en ovarios SPO (Chamson-Reig et al., 1999b), sugiriendo que a pesar de que el número de receptores no explica por sí solo la ausencia de respuesta de la PLC en células tumorales, podría justificar la respuesta del AMPc inducida por GnRH en ambos tipos celulares. Más aún, mediante experimentos de mutagénesis dirigida aplicadas al receptor de GnRH se demostró que la producción de inositoles fosfato inducido por Buserelina estaba atenuada, mientras que su respuesta a través del AMPc no se afectó (Awara et al., 1996; Lin et al., 1998).

Otros investigadores hallaron que el sitio de señalización para AMPc reside en residuos específicos en el primer dominio intracelular, los cuales no estarían involucrados en la activación de la PLC (Arora et al., 1998), demostrando la independencia de ambos caminos y sugiriendo una posible explicación para diferentes respuestas en ambos tipos celulares. Los efectos de la Buserelina sobre el AMPc en células tumorales van en paralelo con sus efectos sobre la secreción de progesterona. La acción estimuladora parecería responder a una estimulación directa de la adenilil ciclasa por acoplamiento a G_s , como ha sido propuesto previamente (Stanislaus et al., 1998b). Aquí demostramos que la acción inhibitoria de la Buserelina sobre la producción de AMPc o progesterona inducida por hCG es independiente de la participación de $G_{i/o}$ y probablemente involucre la acción de la PKC, ya que la inhibición de la PKC con GF 109203 abolió la inhibición ejercida por Buserelina sobre los niveles de progesterona inducidos por hCG. La participación de la PKC en este efecto ha sido previamente propuesta por Amsterdam y col. (Amsterdam et al., 1994). Más aún, también se ha descrito que la actividad de la MAPK estimulada por GnRH contribuye a la inhibición de progesterona inducida por GnRH en células de granulosa luteínicas humanas (Kang et al., 2002a). En experimentos preliminares hemos hallado que la preincubación con el inhibidor de MEK1, PD 98089, enzima que fosforila a las MAPK, impidió la inhibición inducida por Buserelina de la secreción de progesterona inducida por hCG, en concordancia con esta observación, sugiriendo un camino PKC-MAPK en este efecto (ver más abajo). Con respecto a la activación de la PKC inducida por Buserelina en células tumorales, no parecería ser dependiente de PLC, sin embargo DAG originado de la activación de la PLD podría estar activando la PKC (Amsterdam et al., 1994). Además, también se ha propuesto que la PKA, activada por niveles incrementados de AMPc, pueda

ejercer efectos estimulatorios sobre PKC (Rosado et al., 2002; Yu et al., 1996) (ver más abajo).

También se ha propuesto que la señalización de GnRH en la hipófisis involucra la activación de la MAPK p44-p42 (Sim et al., 1995; Sundaresan et al., 1996; Reiss et al., 1997; Han and Conn1999; Johnson et al., 2000); esto también se observó en las células ováricas (Kang et al., 2002b; Kimura et al., 1999; Kang et al., 2002a), por lo tanto estudiamos el efecto de la Buserelina sobre la fosforilación de MAPK en células tumorales y SPO. La Buserelina indujo fosforilación significativa en ambos tipos celulares, a pesar de que el grado de estimulación fue menor en células tumorales. De nuestro conocimiento, esta es la primer descripción de la activación de la MAPK inducida por GnRH en células ováricas luteinizadas de rata. Se había demostrado previamente que el receptor de GnRH podía acoplar a $G_{i/o}$ (Stanislaus et al., 1998a) entre otras proteínas G, pero la participación de esta proteína G en la activación de la MAPK ha permanecido controvertida (Sim et al., 1995; Reiss et al., 1997). Nuestros resultados muestran claramente que la activación de la MAPK inducida por Buserelina es independiente de $G_{i/o}$ en ambos tipos celulares. Además, se han propuesto caminos dependientes e independientes de la PKC en la fosforilación de la MAPK inducida por GnRH (Han and Conn1999). La activación de la MAPK en células tumorales y SPO controles fue marcadamente PKC dependiente, ya que la inhibición o depleción de la PKC abolió los efectos de la Buserelina o PMA sobre la activación de la MAPK en ambos tipos celulares, en concordancia con reportes previos en la hipófisis (Sim et al., 1995; Reiss et al., 1997; Amsterdam et al., 1994) y células ováricas (Kang et al., 2002b). Como Buserelina estimuló la producción de AMPc y este nucleótido ha sido involucrado en la activación de la MAPK (Kang et al., 2002b; Han and Conn1999; Reiss et al., 1997; Johnson et al., 2000), nosotros investigamos si el camino del AMPc estaba

involucrado en la activación de la MAPK por Buserelina en estas células. Llamativamente, la inhibición de la adenilil ciclasa mediante SQ 22536 impidió la fosforilación de la MAPK inducida por Buserelina en células tumorales pero no tuvo efecto en células SPO. El pretratamiento con el inhibidor de la adenilil ciclasa y depleción de la PKC abolieron la respuesta a la Buserelina en ambos tipos celulares, como esperado. En células SPO, las cuales responden a la estimulación con Buserelina con activación de la PLC e incrementos en Ca^{2+} e IP_3 (Chamson-Reig et al., 1999b), la fosforilación de la MAPK se debió probablemente a la estimulación de la PKC calcio-dependiente principalmente. En contraste, en células tumorales, en las cuales la Buserelina no activa a la PLC y estimula marginalmente a la PLD, la fosforilación de la MAPK parecería ser dependiente de AMPc. Además, en células tumorales el dibutilil AMPc también fue capaz de inducir la fosforilación de la MAPK y este efecto fue inhibido en presencia del inhibidor de la PKC, GF 109203X. Por ello, un camino de señalización que incluya la activación secuencial de la adenilil ciclasa-PKC parecería mediar la fosforilación de la MAPK inducida por Buserelina en células tumorales. En relación a esto, se ha propuesto que en células cromafines existe una activación de la PKCε independiente de calcio, estimulada por AMPc, que, a su vez, estimula a ERK a través de la vía Ras/Raf/MEK (Takekoshi et al., 2001). También se han sugerido incrementos en la actividad de la PKC inducidos por PKA en otros tipos celulares (Rosado et al., 2002; Yu et al., 1996). Nuestros resultados sugieren que un camino similar podría estar activo en la fosforilación de la MAPK inducida por Buserelina en células tumorales, quedando aún por determinarse la isoforma de la PKC involucrada en estas células. En la Figura 17 mostramos la vía clásica de señalización de GnRH en las células controles y proponemos un camino alternativo de señalización en las tumorales.

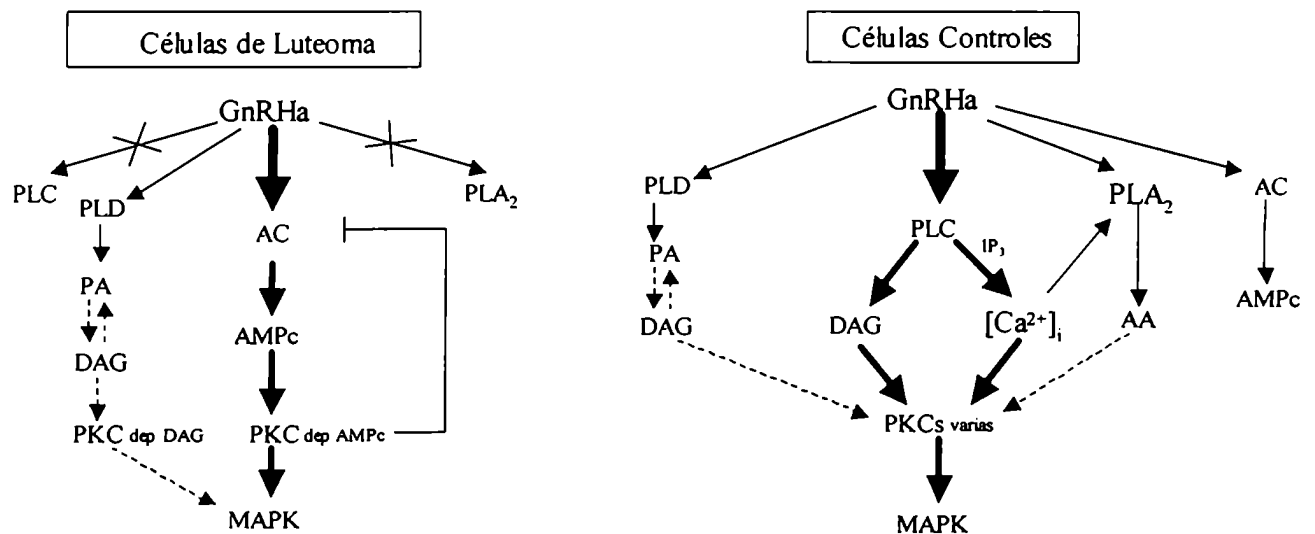


Figura 17: Diagrama proponiendo diferentes caminos de señalización en células del luteoma y en células luteales normales. GnRHa: análogo de GnRH, PLD: fosfolipasa D, PA: ácido fosfatídico, DAG: diacilglicerol, PLC: fosfolipasa C, IP₃: inositol trifosfato, [Ca²⁺]_i: concentraciones intracelulares de calcio, PKC: proteína kinasa C, PLA₂: fosfolipasa A₂, AA: ácido araquidónico, AC: adenilil ciclasa, MAPK: proteína kinasa activada por mitógeno. → : activación;→ : activación débil; —| : inhibición; ✕ : vía no activada.

En su conjunto estos resultados muestran que mientras que las fosfolipasas (PLA₂ y PLC) no son activadas o solo marginalmente activadas (PLD) por análogos de GnRH en células del luteoma, los caminos de transducción de señales de la adenilil ciclasa, PKC y MAPK mediarían los efectos de GnRH en estas células. En consecuencia, mientras que la transformación del ovario en un luteoma, un tumor hiperplásico benigno, implica la pérdida de las vías clásicas de señalización de GnRH (PLC), similar a lo observado en varios tipos de tumores (Emons et al., 1998; Emons et al., 1996), los sistemas generadores de segundos mensajeros que se determinan en respuesta a Buserelina en estas células tampoco se asemejan a aquellos observados en tejido transformado como por ejemplo la activación de

MAPK por $G_{i/o}$ o la activación de fosfotirosin fosfatasas, (Imai et al., 1996; Gründker et al., 2001b; Limonta et al., 1999; Kimura et al., 1999; Emons et al., 1996; Gründker et al., 2001a). Esto demuestra que la señalización de GnRH varía considerablemente en diferentes tipos celulares, lo cual hace posible una diversidad de respuestas dependiendo de los caminos de segundos mensajeros activados en cada caso.

Capítulo IV

Expresión de GnRH en tejido tumoral y regulación en células del luteoma

Introducción y objetivos

Se sugiere que el GnRH en el ovario tiene acciones autocrinas o paracrinas. Se ha demostrado la presencia del RNAm de GnRH (Goubau et al., 1992; Oikawa et al., 1990) y su péptido (Aten et al., 1987), de sitios de unión para GnRH (Leung and Steele 1992) y de receptores para GnRH (Kogo et al., 1995; Whitelaw et al., 1995; Bauer-Dantoin and Jameson, 1995; Pieper et al., 1981) en el ovario de rata. Ohno y col. (Ohno et al., 1993) detectaron la expresión del RNAm de GnRH en carcinoma de epitelio ovárico humano, pero no en ovario normal, mientras que otros autores (Dong et al., 1993; Minaretzis et al., 1995) reportaron que el RNAm de GnRH sí se expresaba en este tejido. Similarmente, se ha reportado la ausencia de sitios de unión para GnRH en el ovario (Clayton and Huhtaniemi, 1982), presentes pero con baja afinidad en el cuerpo lúteo (Bramley et al., 1986; Popkin et al., 1983) o presentes con alta afinidad en la capa de células de la granulosa del folículo preovulatorio (Latouche et al., 1989). Trabajos previos del laboratorio demostraron la presencia de receptores de GnRH en los luteomas experimentales con características similares a los de la hipófisis (Chamson-Reig et al., 1997; Chamson-Reig et al., 1999b). Peng y col. (Peng et al., 1994) demostraron que el RNAm de GnRH y su receptor se expresan en células de granulosa-luteínicas humanas y que la expresión de ambos está regulada por GnRH. En forma similar, estudios hechos en células de epitelio de superficie ováricas humanas y células de cáncer de epitelio ovárico humano (OVCAR-3) describen también la presencia tanto del GnRH como de su receptor, y la regulación de ambos por un agonista de GnRH (Kang et al., 2000b; Kang et al., 2000a). Estos datos sugieren fuertemente que GnRH puede actuar como un regulador autocrino/paracrino en las células

granulosa-luteínicas humanas, en células normales de epitelio de superficie ovárica humanas y células de cáncer de epitelio ovárico humano. De nuestro conocimiento no existen evidencias de este mecanismo en células ováricas de rata.

Teniendo en cuenta entonces, que la regulación de GnRH en el ovario no está aún bien esclarecida y considerando los resultados obtenidos anteriormente, en los cuales se demuestra la presencia de receptores de GnRH en los luteomas además de la acción directa de análogos del decapeptido sobre las células tumorales, se evaluará si el luteoma expresa el RNAm de GnRH y sintetiza el correspondiente decapeptido. Además se investigará si un análogo de GnRH, la Buserelina, es capaz de regular la síntesis de GnRH. Estos estudios se realizarán utilizando como control de tejido lúteo normal células de ovarios de hembras prepúberes superovuladas.

Materiales y métodos

Animales

Se emplearon animales portadores de tumores, los cuales se sacrificaron por decapitación luego de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas, y 3 y 7 meses de desarrollo. Como fuente de tejido no tumoral se utilizaron hipotálamo medio basal, hipófisis, ovarios de ratas en estro, ovarios de ratas prepúberes superovuladas (SPO) y cuerpos lúteos aislados a partir de ovarios de ratas SPO. Al momento del sacrificio se extrajeron los tejidos para la obtención de RNA.

Cultivo de células

Se realizaron cultivos de células de luteomas y de ovarios provenientes de ratas SPO, utilizado como control de células lúteas, semejante a lo descrito previamente en el capítulo III. Brevemente, se sembraron 1×10^6 células/pocillo en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos, previamente colagenizada, en medio BIC-SFB. Luego de 24 horas se lavaron las células con BIC y se realizó un cambio de medio. Ocho días más tarde se repitió el lavado con BIC, se preincubaron las células con BIC-BSA durante 2 horas y se procedió al agregado de los estímulos: Buserelina 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml en BIC-BSA y controles con medio sólo. Luego de 4 horas de incubación a 37°C en estufa para cultivo se recolectaron los medios y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis. A las células se les repuso nuevamente el estímulo correspondiente en BIC-BSA y se las dejó incubando durante 20 horas más. Luego se recolectó el medio, el cual se guardó a -20°C. Se colocó la placa sobre hielo y se realizó un lavado de las células con PBS estéril frío. Finalmente se agregó 500 µl/pocillo del reactivo de TRIZOL (GIBCO BRL) para la purificación de su RNA, se raspó

el fondo de los pocillos, se recolectó el lisado celular en tubos Eppendorf y se lo guardó a -70°C hasta su posterior uso. Se realizaron 3-5 experimentos por grupo.

Radioinmunoanálisis para GnRH

Las soluciones empleadas fueron: buffer fosfato 0.05 M pH 7.5; buffer fosfosalino compuesto por buffer fosfato 0.05 M, NaCl 0.15 M, EDTA 0.01 M, azida sódica 0.015 M y BSA 0.5% pH final 7.6; solución de cloramina-T: 40 mg/20 ml de buffer fosfato 0.05 M preparada inmediatamente antes de su uso; solución de metabisulfito de sodio: 16 mg/20 ml de buffer fosfato 0.05 M.

La columna de cromatografía usada para la separación de la hormona marcada del ^{125}I libre fue de carboximetilcelulosa (SIGMA) equilibrada en buffer acetato de amonio 2 mM.

Marcación: Se resuspendieron 5 µg de GnRH (SIGMA) en 10 µl de ácido acético 0.1 N. La marcación se realizó en tubos de vidrio, bajo campana. A la hormona disuelta en la solución de ácido acético se le añadieron 0.6 mCi de ^{125}I (NEN) en 12 µl de buffer fosfato 0.5 M. La oxidación se efectuó con 10 µl de la solución de cloramina-T en buffer fosfato 0.05 M, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción fue detenida con 20 µl de metabisulfito de sodio. El contenido del tubo de marcación fue pasado por la columna de intercambio catiónico. Se eluyó con buffer acetato de amonio 2 mM pH 4.5 y se recogieron 5 tubos de 3 ml de eluido cada uno. Luego se cambió el buffer de elución por acetato de amonio 100 mM pH 4.5 y se recogieron 15 fracciones más de 3 ml. Se leyeron 10 µl 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, el cual es el primero en eluir con el buffer de baja fuerza iónica. Los mejores tubos de la marcación se utilizaron en forma individual, sin reunirlos, y se guardaron a 4°C para su posterior uso en

RIA. Previo a los radioinmunoanálisis, se testeó el porcentaje de unión al anticuerpo específico de cada fracción de hormona marcada, para determinar cuál de ellas era la de mejor calidad

Radioinmunoanálisis: El primer antisuero contra GnRH de rata fue R1245 anti-GnRH-BSA provisto por el Dr. Nett. Se diluyó en buffer fosfosalino, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo. La dilución inicial fue de 1:10000. El estándar de referencia fue el mismo GnRH de SIGMA utilizado para la marcación. Los patrones (0.15 a 200 pg por tubo) se prepararon en buffer fosfosalino. La sensibilidad del ensayo fue de 1.5 pg/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7.1% y 11.6%, respectivamente.

El protocolo de rutina fue el siguiente: se trabaja en tubos de Kahn de plástico. Se agregaron el primer anticuerpo (100 µl) y la hormona trazadora (aproximadamente 10.000 cpm/100 µl) a las alícuotas experimentales preparadas en buffer fosfosalino (300 µl), volumen final de reacción: 500 µl; luego de una incubación de 24 horas a 4°C se detiene la reacción con el agregado de 1.5 ml de etanol absoluto frío para permitir la precipitación de las proteínas, se agita y se deja 30 minutos en hielo, para optimizar la precipitación. Luego se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 30 minutos, se invierten los tubos para eliminar el sobrenadante y se cuenta la radioactividad presente en los precipitados directamente en el contador gamma.

Como el objetivo del trabajo era evaluar la autorregulación de la producción de GnRH, hubo que cerciorarse que el RIA detectara selectivamente al GnRH producido por las células y no a su análogo, Buserelina ([D-Ser(tBu)⁶-des-Gly¹⁰]-GnRH-N-etilamida), agregado al medio de cultivo, el cual en cuanto a su estructura apenas difiere de GnRH (la

Gly en posición 6 está sustituida por D-Ser(-tBu) y carece de la Gly en posición 10). Para ello se diseñó inicialmente un ensayo de RIA en el cual se compitió la unión de GnRH marcado radiactivamente con su anticuerpo con distintas concentraciones de Buserelina (1 pg a 100 µg/tubo) preparadas en medio BIC-BSA. Las curvas de desplazamiento indicaron que recién a partir de la concentración de 0.1 µg/tubo de Buserelina, la misma competía con la hormona marcada en la unión con el anticuerpo (Fig. 1). Dado que las concentraciones de Buserelina que serían testeadas en el cultivo eran de 0.1 a 100 ng/ml y la alícuota del medio de cultivo que se toma para realizar el ensayo de RIA era de 100 µl (que corresponden a 0.01 a 10 ng de Buserelina), se pudo trabajar en las condiciones previamente establecidas, sabiendo que el anticuerpo iba a detectar solamente el GnRH producido por las células.

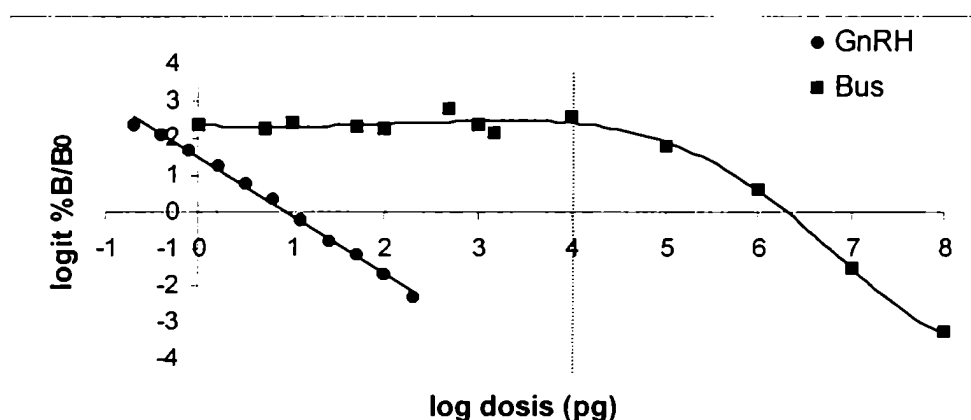


Figura 1: Curvas de desplazamiento del ensayo de RIA de GnRH en el cual se compitió la unión de GnRH marcado radiactivamente a su anticuerpo con distintas concentraciones de GnRH (0.15 a 200 pg/tubo, ●) o Buserelina (1 pg a 100 µg/tubo, ■). IC₅₀ GnRH: 8.6 pg. IC₅₀ Buserelina: 1.07 µg. ----: Dosis máxima de Buserelina en la alícuota de medio de cultivo medida en el RIA.

Purificación de RNA total a partir de diferentes tejidos, células tumorales y de ovarios de ratas SPO en cultivo

Se procedió a la extracción del RNA total mediante el reactivo de TRIZOL (GIBCO BRL), como fuera descrito en el capítulo I. Los RNA totales aislados fueron resuspendidos en agua DEPC (dietilpirocarbonato, SIGMA), cuantificados espectrofotométricamente a 260 nm y evaluada su pureza mediante el cociente de absorbancias 260 nm/280 nm. Los mismos fueron guardados a -70°C hasta su posterior utilización.

Cuantificación del RNAm de GnRH por RT-PCR semicuatitativa

Para evaluar los niveles de expresión del RNAm de GnRH en células tumorales y células lúteas controles en cultivo estimuladas con 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml de Buserelina o sin estimular (medio sólo) se llevó a cabo la técnica de amplificación por RT-PCR semicuantitativa. Para su optimización inicialmente se transcribieron a cDNA diferentes cantidades de RNA total y alícuotas de 2 µl se amplificaron por PCR utilizando diferente número de ciclos. Esto permitió determinar las condiciones bajo las cuales la amplificación por PCR de los cDNAs de GnRH y de β-actina, como control, se encontraba en la fase logarítmica. Para estos ensayos se partió de RNA total proveniente de luteomas de 6 semanas de desarrollo. Con el objeto de descartar la posibilidad de degradación de RNA y poder controlar la variación en las concentraciones del RNAm en las reacciones de RT se realizaron amplificaciones por PCR para β-actina.

Transcripción reversa

Se partió de 1-4 µg de RNA total y se transcribió el cDNA utilizando para ello 200 unidades de transcriptasa reversa de MMLV (USB), 0.025 µg/µl de primers oligo dT, buffer correspondiente, 5.3 unidades de inhibidor de RNAsa (dilución 1:5), 10 mM DTT,

0.5 mM de una mezcla de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato, en un volumen final de 20 μ l, incubándose la reacción a 42°C durante 50 minutos e inactivándola finalmente por calentamiento a 70°C por 15 minutos. 2 μ l de esta mezcla de reacción se sometieron a amplificación por PCR.

Amplificación por PCR

Primers: Los *primers* específicos para detectar el cDNA correspondiente a GnRH de rata (sintetizados por Bio Synthesis, en base al análisis de secuencia realizado mediante el GenBank) fueron los siguientes: *forward*: 5'-GCCGCTGTTGTTCTGTTGACT-3'; *reverse*: 5'-TTCCTCTTCAATCAGACGTTCC-3', los cuales se unen a secuencias específicas ubicadas en el primer y tercer exón, respectivamente, y amplificando un fragmento teórico de 234 pb, según el programa de alineación de secuencias Clustal X (1.81). Los *primers* específicos para β -actina de rata (sintetizados por Invitrogen-Life Technologies en base a las secuencias utilizadas por Brussaard y col. (Brussaard et al., 1999) fueron los siguientes: *forward*: 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'; *reverse*: 5'-GGAAGGTGGACAGTGAGG-3'. Para verificar su especificidad utilizamos el programa BLAST, el cual indicó que la unión de ambos *primers* con el cDNA y el gen de β -actina citoplasmática de *Rattus norvegicus* era 100% específica, proponiendo un tamaño de fragmento amplificado de 440 pb para el RNAm y de 652 pb para el genómico.

PCR: El cDNA fue amplificado en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient en un volumen de reacción de 50 μ l conteniendo 1 unidad de *Taq* polimerasa (GIBCO BRL), y su buffer, 4 mM $MgCl_2$, 0.8 mM deoxinucleótidos trifosfato y 1 μ M de *primers* específicos para GnRH. Para β -actina, las condiciones fueron similares, salvo que se utilizó 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM deoxinucleótidos trifosfato y 0.5 μ M de *primers* específicos para

fragmento en el vector pUCM13, la transformación de bacterias competentes, su selección en un medio sólido apropiado, la amplificación por PCR del fragmento de interés, la amplificación en medio líquido de las bacterias que contienen el plásmido deseado y la purificación de dicho plásmido conteniendo el inserto de interés. A continuación se detallará el protocolo utilizado:

Clonación del fragmento obtenido por PCR utilizando los *primers* de GnRH

a) Ligación:

La ligación se llevó a cabo utilizando el *kit* pGEM-T-Easy Vector Systems (Promega), el cual permite clonar productos de PCR y distinguir posteriormente en forma sencilla aquellas colonias bacterianas que contienen el vector con el inserto de interés. El vector pGEM-T presente en dicho *kit* posee un pequeño segmento de DNA de *E. coli*, que contiene las secuencias regulatorias y la información codificante para los primeros 146 aminoácidos del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*). Las bacterias hospedadoras poseen un plásmido que codifica para la enzima β -galactosidasa inactiva que carece de los aminoácidos 11-41. Cuando estas bacterias son transfectadas con un vector no sustituido (sin inserto) el fragmento amino-terminal de la proteína β -galactosidasa codificado por el vector se asocia con el polipéptido defectuoso para formar una proteína enzimáticamente activa. Dichas bacterias transfectadas con estos vectores no sustituidos formarán colonias azules en un medio sólido que contenga IPTG (isopropiltio- β -D-galactósido, un inductor de la β -galactosidasa) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido, un sustrato cromogénico de la β -galactosidasa). Inserción de DNA foráneo en la región *lacZ* de dicho vector elimina la complementación y da origen a la formación de colonias blancas. La presencia de un sitio de policlonado en la región *lacZ* no tiene efecto sobre el péptido de la

β -galactosidasa para llevar a cabo la complementación. Sin embargo, inserciones de DNA adicionales en este sitio generalmente destruyen la complementación y dan origen a colonias blancas cuando son crecidas en presencia de IPTG y X-gal.

Una alícuota del producto de PCR de GnRH se ligó con el vector pGEM-T. Para ello se utilizaron: 25 ng de vector (0.5 μ l), 5 μ l de Buffer de Ligación 2X, 0.5 μ l del producto de PCR, 1 μ l de la enzima T4 DNA Ligasa, en un volumen final de 10 μ l. Se dejó proceder la reacción durante 2 hs a temperatura ambiente.

b) Transformación:

Se descongelaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes en hielo y se agitaron suavemente antes de continuar con la transformación. Se transfirieron 50 μ l de las células competentes a un tubo preenfriado conteniendo 4 μ l del producto de la ligación y se dejó la mezcla en hielo durante 25 minutos. Luego se aplicó un *shock* térmico a 42°C durante 50-70 segundos. Inmediatamente se colocó el tubo en hielo durante 5 minutos. Luego se agregaron 200 μ l de caldo LB estéril y se colocó el tubo en agitación (~ 150 rpm) a 37 °C durante 1 hora.

c) Plaqueo:

Se prepararon 3 placas con Ágar LB + Ampicilina. El antibiótico (Ampicilina) se utilizó en una concentración 1/1000 en el medio de cultivo. Para 50 ml de ágar LB se colocaron ~70 μ l de ampicilina (100 μ g/ml). Se prepararon las placas, se dejaron secar y luego se colocaron 30 μ l de X-GAL 50 mg/ml y 5 μ l de IPTG 200 mg/ml. Fueron plaqueados 30, 70 y 150 μ l del producto de la transformación. Se dejaron las placas a 37°C durante toda la noche.

d) PCRs de las colonias crecidas en ágar:

Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR a partir de algunas colonias blancas crecidas en ágar (1, 2, 3, 4 y 5). Para dicha reacción se utilizó 1 µl del lisado de células de cada colonia y la concentración de Cl_2Mg empleada fue de 1.5 mM. Utilizando los *primers* pUCM13 *forward* y *reverse* que se unen al vector, se obtuvo una banda del tamaño esperado (~500 pb) solamente para las colonias 1, 3 y 4. Estas colonias positivas para la banda se pusieron a crecer en 3 ml de caldo LB durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 1.5 ml del cultivo para realizar minipreparaciones plasmídicas y 800 µl a los que se le agregó 200 µl de glicerol para guardar a -70°C como reserva. Las bacterias presentes en los 1.5 ml destinadas a la purificación plasmídica, fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 20 minutos y el *pellet* celular fue congelado a -70°C hasta que se realizaron las extracciones.

Se obtuvieron los siguientes rendimientos:

Colonia 1: 374,4 ng/µl. Relación 260/280: 1,75.

Colonia 3: 622,3 ng/µl. Relación 260/280: 1,55.

Colonia 4: 22,9 ng/µl. Mala recuperación.

e) Secuenciación: Se analizaron las colonias 1 y 3. Se enviaron a secuenciar al IIB (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas) organismo dependiente de UNSAM-CONICET, Argentina. El *kit* de secuenciación utilizado fue el DYnamic ET™ terminator Cycle sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) y el secuenciador, ABI Prism 377 DNA Sequencer.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ error estándar. Las diferencias entre las medias de cada grupo se analizaron con el programa INSTAT mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Dunnet o con el programa Statistica V5 para el ANOVA en dos sentidos.

Resultados

Validación del método de RT-PCR

El análisis por RT-PCR mostró la amplificación de una única banda de aproximadamente 230 pb. Varias evidencias apoyan la autenticidad de los productos de PCR detectados. Primero, la PCR detectó productos del mismo tamaño a partir de hipotálamo medio basal e hipófisis de hembra prepúber (Fig. 2). Puede descartarse la posibilidad de contaminación ya que no se obtuvieron productos en los controles negativos: a) reacción de RT sin agregar RNA y luego amplificar ese producto por PCR, y b) sin agregar cDNA a la reacción de PCR. Segundo, los *primers* de GnRH están localizados en exones diferentes, por ello el producto de PCR obtenido debe provenir de la amplificación específica del RNAm y no del DNA genómico. Los *primers* de β -actina utilizados también permiten diferenciar si la amplificación se llevó a cabo a partir de cDNA o DNA genómico contaminante, mediante el tamaño del fragmento amplificado. Igualmente, se realizaron controles de pureza del cDNA. Para ello se realizaron RTs de cada muestra en ausencia de la enzima retrotranscriptasa, y luego ese producto se amplificó por PCR el mayor número de ciclos utilizando *primers* para β -actina. La ausencia de banda en estos tubos corroboró que los cDNAs de estas muestras no estaban contaminados con DNA genómico. Finalmente, el análisis de la secuenciación del producto de PCR reveló una secuencia idéntica con los cDNAs de GnRH hipotalámico e hipofisario. El mismo dio como resultado la siguiente secuencia (en color rojo: secuencia correspondiente al plásmido pGEM-T; en color negro y estilo de fuente **negrita**: secuencia correspondiente a los *primers* de GnRH; en color negro y estilo de fuente regular: secuencia correspondiente al inserto), la cual coincidió en las dos colonias evaluadas:

Colonia 1 de GnRH + pUCM13 *Foward*:

GGGTNACAGGGGCAGTGAATTGTNATACGACTCACTATAGGGCGAATFGGGCCCCGACGTCGCAT
GCTCCCAGGGCCGCCATGGCGGGCCGGGAATTCGATT**TTCCTCTTCAATCAGACGTTCCAGAG**
CTCCTCGCAGATCCCTAAGAGGTGAACGGGGCCAGTGGACAGTGCATTGGAAGTTCTGGGGTTC
TGCCATTTGATCCTCCTCCTTGCCCATCTCTTGGAAGAATCAACCAAGTGTTCAGTATTTCTCTT
CCCCCAGGGCGCAACCCATAGGACCAGTGCTGGCTGGAGCAGCCTTCCAAACACACAGTCAA
CAGAACAACAGCGGCCAATCACTAGTGAATTCGCGGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAG
CTCCCACGGCTGGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGGCGTAAT
CATGGTCAATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTGTAATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGTGCTAACTCACATTAATTCGGTGTG
GCTCACTGNCCTGCTTCCAGTCGGGAAANCTGTGCTGNCAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAACG
CGCGGGGAN

Colonia 1 de mGnRH + pUCM13 *Reverse*: *Reverse* del anterior

AAGCTATFAGGTGAACCTATAGAAATATCAAGCTATGCATTCAACGGCTTGGGAGCTCTCCCATAT
GGTCGACCTGCAGGCGGGCCGGAATTCAGTGAAT**GCCGCTGTTGTTCTGTTGACTGTGTG**
TTTGGAAGGCTGCTCCAGCCAGCACTGGTCCTATGGGTTGCGCCCTGGGGGGAAGAGAAATACT
GAACACTTGGTTGATTCTTTCCAAGAGATGGGCAAGGAGGAGGATCAAATGGNANAACCCCAN
AACTTCGAATGCACTGTCCANTGCACCCGTTACCTCTTANCATCTGCGANNACCTCTGNAACG
TCTGATTGAANATNNAAATCAATNCCCCGNCCNNCAGTNTCCNATCATGNAANNICTNN

Expresión del RNAm de GnRH en tejidos ováricos y en el luteoma

Se observó expresión del RNAm de GnRH en varios tejidos ováricos controles incluyendo ovarios en estro (con cuerpos lúteos frescos), ovarios de las ratas SPO y también en cuerpos lúteos aislados a partir de ratas SPO (Fig. 2). Al analizar el modelo experimental, se determinó la expresión del mensajero de este péptido en luteomas de distinto grado de

desarrollo, incluyendo estadios muy tempranos (tumores de 1-6 semanas) y estadios más tardíos de evolución (tumores de 3 y 7 meses de desarrollo) (Fig. 2).

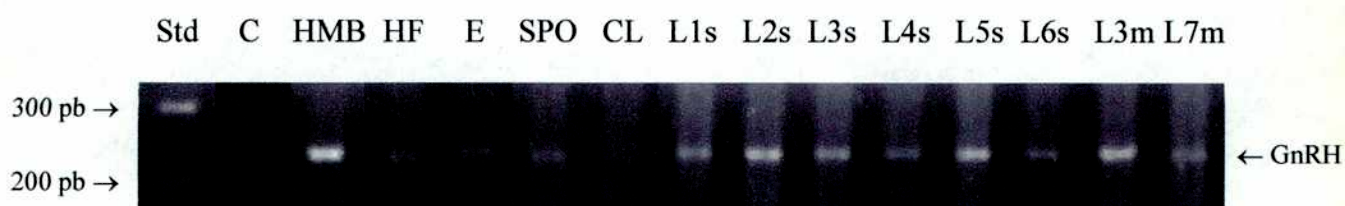


Figura 2: Expresión del RNAm de GnRH en tejidos relacionados al eje reproductor en rata, evaluada mediante la técnica de RT-PCR. Se partió de 1 μ g de RNA total en la RT y se amplificó por PCR utilizando 40 ciclos. Por electroforesis en geles de agarosa se detectó un único producto de amplificación de aproximadamente 230 pb. Los productos de PCR se observan por tinción con bromuro de etidio. Std: estándares de peso molecular; C: control sin agregar cDNA a la reacción de PCR; HMB: hipotálamo medio basal; HF: hipófisis de hembra prepúber; E: ovario en estro; SPO: ovarios de ratas prepúberes superovuladas; CL: cuerpos lúteos aislados a partir de ovarios de ratas SPO; L1-6s: luteoma de 1 a 6 semanas de desarrollo; L3m: luteoma de 3 meses de desarrollo; L7m: luteoma de 7 meses de desarrollo.

Curvas de calibración de la RT-PCR

Se optimizaron las condiciones de amplificación por RT-PCR semicuantitativa, en busca de una relación lineal entre la cantidad de RNA inicial y la densitometría, con el objeto de garantizar una amplificación exponencial a medida que se incrementa el número de ciclos. Se eligió finalmente la cantidad de 1 μ g de RNA total para la reacción de transcripción reversa, y 31 y 18 ciclos para la amplificación por PCR para GnRH y β -actina, respectivamente (Fig. 3). Por lo tanto fueron éstas las condiciones utilizadas para la cuantificación del RNAm de GnRH a partir de células tumorales y lúteas controles.

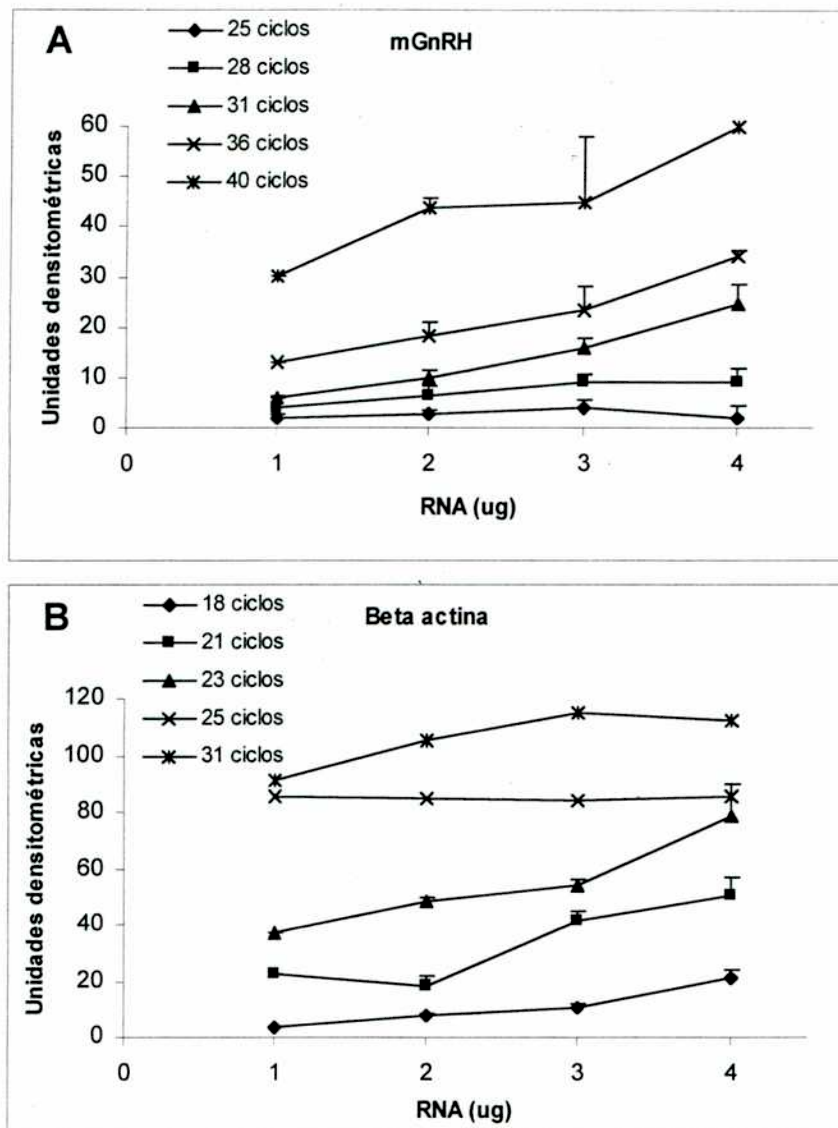


Figura 3: Validación del método de RT-PCR semicuantitativa para GnRH y β -actina. Se transcribieron a cDNA distintas cantidades de RNA total (1, 2, 3 o 4 μ g) provenientes de luteomas de 6 semanas de desarrollo. A continuación, 2 μ l de esta mezcla de reacción se amplificaron por PCR, detectándose por electroforesis en geles de agarosa un único producto de amplificación de aproximadamente 230 pb para GnRH y 440 pb para β -actina. Se amplificaron GnRH y β -actina a partir del cDNA bajo diferentes números de ciclos. A) Para GnRH se realizaron 25, 28, 31, 36 o 40 ciclos de amplificación. B) Para β -actina se evaluaron 18, 21, 23, 25 o 31 ciclos. La mayoría de las curvas fue realizada por cuadruplicado. Para asegurar la linealidad a cantidades menores de RNA, se hicieron algunos ensayos partiendo de 0.5 μ g, corroborando que la misma se conservaba.

Niveles basales de expresión del RNAm y del péptido de GnRH en células tumorales y luteales controles

Los estudios realizados indican que tanto las células tumorales como las células provenientes de ovarios de ratas SPO en cultivo son capaces de sintetizar basalmente tanto el RNAm detectado por RT-PCR como el péptido de GnRH determinado por RIA.

Al comparar los niveles basales de la expresión del péptido de GnRH para ambos tipos celulares, surgió que las células tumorales producen basalmente mayores cantidades de GnRH que las células controles, tanto a las 4 como a las 24 horas de iniciado el experimento (Fig. 4). Lo mismo sucede al comparar la síntesis del RNAm de GnRH, en donde también su expresión es basalmente mayor en las células tumorales que en las controles ($p < 0.05$) a las 24 horas de cultivo (Fig. 5).

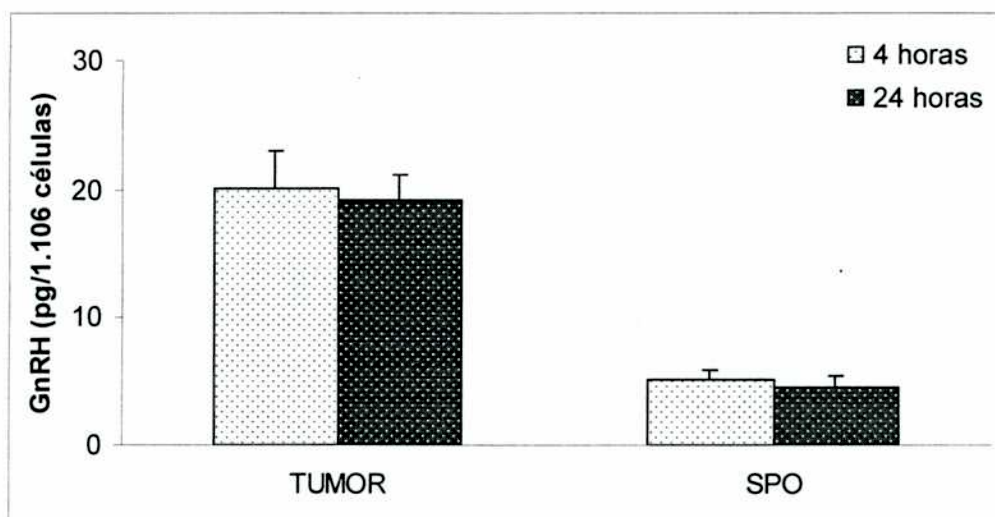


Figura 4: Niveles basales de la síntesis del péptido de GnRH determinada por RIA en células tumorales (TUMOR) y lúteas controles (SPO) luego de 4 y 24 horas de cultivo. Análisis estadístico: ANOVA en dos sentidos: Interacción: NS. Factor tipo celular: $p < 0.001$, factor tiempo: NS.

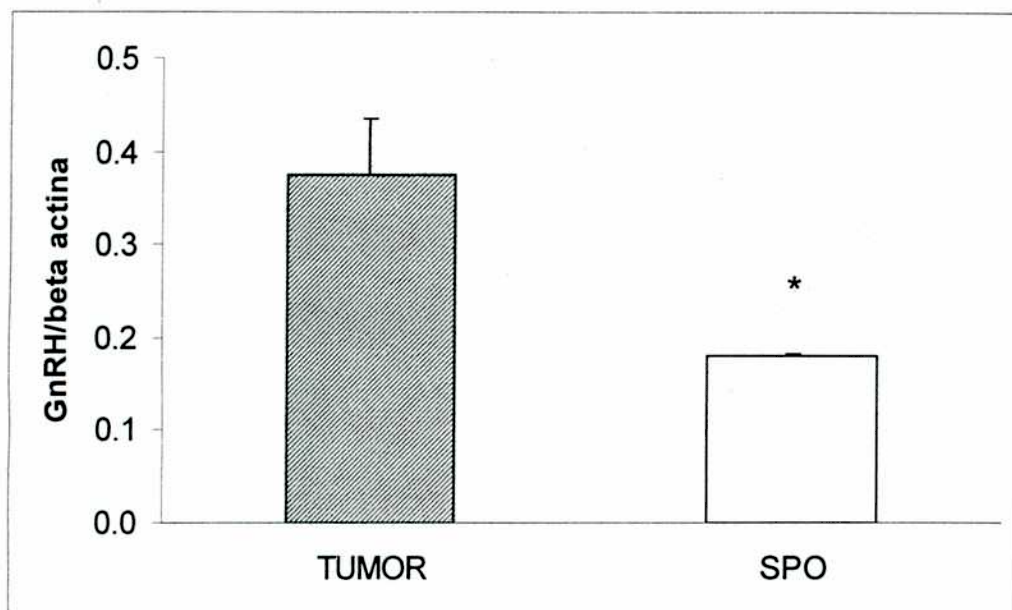


Figura 5: Niveles basales de la expresión del RNAm de GnRH determinada por la técnica de RT-PCR semicuantitativa en las células tumorales (TUMOR) y lúteas controles (SPO) luego de 24 horas de cultivo.*: $p < 0.05$.

Efectos autorregulatorios del GnRH sobre la expresión de su mensajero y su péptido en células tumorales y luteales controles

Cuando se estimularon las células tumorales con Buserelina, no se observó variación en la secreción del péptido de GnRH al medio de cultivo para ninguna de las concentraciones de Buserelina utilizadas, luego de 4 y 24 horas desde el momento de la colocación del estímulo (Fig. 6). Contrariamente, al estimular las células provenientes de ovarios de ratas SPO con 100 ng/ml de Buserelina, se observó un incremento significativo en los niveles de GnRH liberados al medio en comparación con las células sin estimular, tanto a las 4 ($p < 0.01$) como a las 24 horas ($p < 0.01$) luego de la colocación del estímulo.

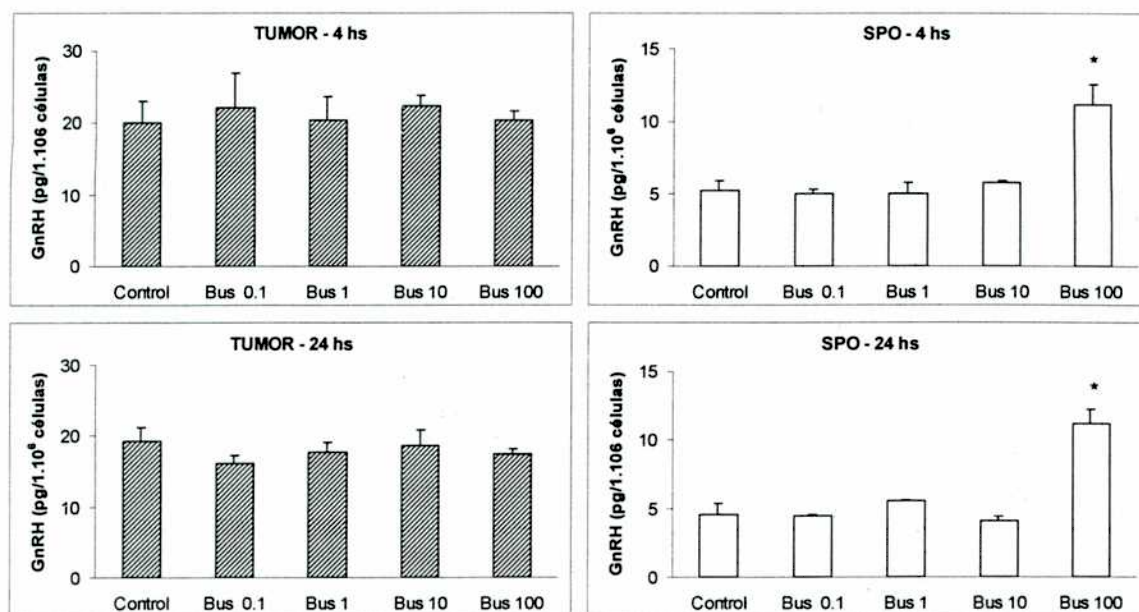


Figura 6: Efecto de la Buserelina (Bus) sobre la secreción al medio de cultivo del péptido de GnRH medido por RIA en células tumorales (TUMOR) y lúteas controles (SPO), luego de 4 y 24 horas de la colocación del estímulo (20 horas de acumulación). Concentraciones de Buserelina evaluadas: 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml. *: Bus 100 vs Control, $p < 0.01$.

Se midió además la síntesis del RNAm de GnRH a partir de ambos tipos celulares bajo estimulación con las distintas concentraciones de Buserelina por la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados indicaron que en las células tumorales la Buserelina no modificó los niveles del RNAm de GnRH en ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que en las células provenientes de los ovarios de las ratas SPO indujo un incremento significativo con respecto al control sin estimular, a la concentración mayor (100 ng/ml) ($p < 0.05$) luego de 24 horas de colocación del estímulo (Fig. 7).

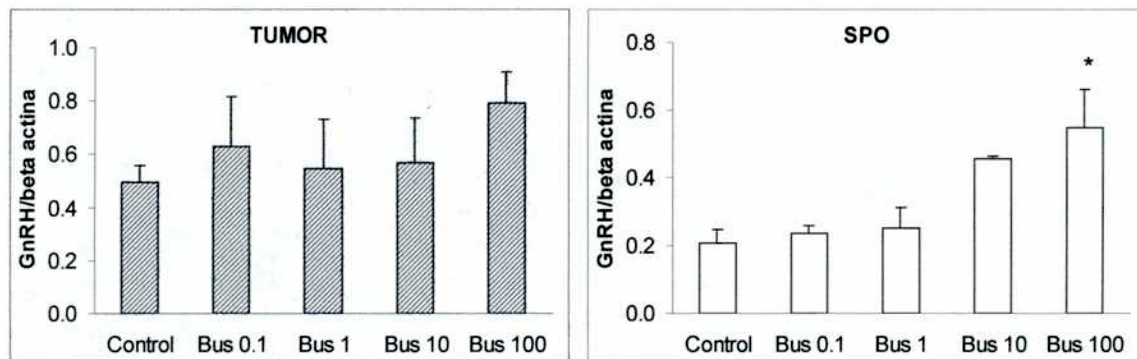
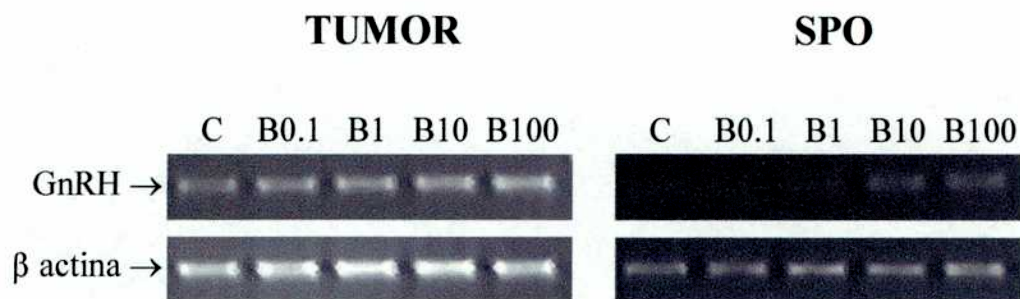


Figura 7: Efecto de la Buserelina sobre la expresión del RNAm de GnRH determinada por la técnica de RT-PCR semicuantitativa en células tumorales (TUMOR, izquierda) y lúteas controles (SPO, derecha), luego de 24 horas de colocación del estímulo. Concentraciones de Buserelina evaluadas: 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml.

Parte superior: Gel representativo en el cual se muestran los productos de PCR de GnRH (31 ciclos) y β -actina (18 ciclos). Visualización de las bandas mediante bromuro de etidio. B: Buserelina.

Parte inferior: Integración de las bandas correspondientes al RNAm de GnRH obtenidas por RT-PCR. *: Bus 100 vs. Control, $p < 0.05$, $n =$ entre 3 y 5.

Discusión

Existen evidencias de diferentes tipos de autorregulación del GnRH, es decir que el decapeptido podría modificar su propia síntesis y secreción, en diferentes tejidos. Se ha sugerido que el GnRH puede inhibir su propia liberación mediante un mecanismo de retroalimentación ultracorto en el hipotálamo de la rata (Bedran de Castro et al., 1985; Valenca et al., 1987; DePaolo et al., 1987). La inyección de una baja dosis de GnRH en el tercer ventrículo reduce los niveles plasmáticos de LH, sugiriendo que GnRH puede inhibir su propia liberación (Bedran de Castro et al., 1985). Esta idea fue luego apoyada por la demostración que la concentración de GnRH en el sistema vascular portal-hipofisario estaba disminuida por el tratamiento con un agonista de GnRH (Valenca et al., 1987) y que GnRH inhibe su propia secreción a partir fragmentos de hipotálamo medio basal in vitro (DePaolo et al., 1987). Estudios posteriores muestran que GnRH estimula o inhibe, dependiendo de las dosis, la secreción de GnRH de neuronas hipotalámicas inmortalizadas (Krsmanovic et al., 1993) y normales (Krsmanovic et al., 1999).

Existen evidencias crecientes de sistemas de GnRH auto y paracrinós en tejidos reproductivos humanos (Gründker et al., 2002). Como mencionáramos anteriormente, hay datos controvertidos con respecto a la expresión de GnRH en tejido ovárico normal humano. Peng y col. (Peng et al., 1994) observaron en células granulosa-luteínicas humanas que la expresión tanto del RNA^m del receptor de GnRH como de GnRH está regulada por el péptido GnRH en forma bifásica, es decir, a bajas dosis (1 nM) GnRH aumenta la síntesis de dichos transcritos, pero no tiene efecto o tiene un efecto apenas inhibitorio sobre la expresión de estos genes a dosis mayores (1 μ M).

En forma similar, otros estudios hechos en células de epitelio de superficie ováricas humanas y células de cáncer de epitelio ovárico humano (OVCAR-3) evidenciaron que altas concentraciones de un agonista de GnRH (10^{-7} – 10^{-9} M) disminuyen la síntesis del RNAm de GnRH y de su receptor, mientras que bajas concentraciones (10^{-11} M) resultan en un incremento del RNAm de GnRH y de su receptor (Kang et al., 2000b; Kang et al., 2000a).

En ovario de rata, Goubau y col. hallaron la presencia de transcritos de GnRH en todos los momentos del ciclo mediante la técnica de RT-PCR (Goubau et al., 1992). Por otro lado, Sakakibara (Sakakibara, 1989) demostró por *Northern blotting* la presencia del RNAm de GnRH y mediante la técnica de hibridización *in situ* que el sitio de síntesis de GnRH eran las células de granulosa. Oikawa (Oikawa, 1991) también detectó por RT-PCR la expresión del RNAm de GnRH en células de granulosa de rata.

Muy pocas evidencias prueban la expresión del RNAm de GnRH en cuerpos lúteos de rata (Clayton et al., 1992). En este capítulo se muestra que el RNAm de GnRH se expresa en ovarios de ratas en estró (cuerpos lúteos frescos), ovarios de las ratas SPO y también en cuerpos lúteos aislados a partir de ratas SPO, reforzando las evidencias de su expresión en células luteales. Además, se puso en evidencia la presencia de dichos transcritos en tejido lúteo tumoral, como ser los luteomas de distinto tiempo de evolución, abarcando desde etapas muy tempranas hasta avanzadas de desarrollo. Novedosamente, en este trabajo se demuestra la expresión basal del RNAm y del péptido de GnRH en cultivos de células provenientes del luteoma, aún después de 8 días en cultivo, sugiriendo que estas células expresan dicho gen aún en ausencia de estímulos específicos. Además se demostró un efecto autorregulatorio del análogo de GnRH, Buserelina, tanto sobre la síntesis del transcripto como sobre el péptido de GnRH en células lúteas controles (SPO), en las que la

dosis más alta utilizada, 100 ng/ml, estimuló significativamente ambos parámetros. De nuestro conocimiento esta es la primera evidencia de un efecto autorregulatorio de GnRH sobre su propia expresión en células ováricas de rata. Llamativamente, este efecto no se observa en las células del luteoma, demostrando nuevamente alteraciones ya no sólo en la señalización de GnRH en estos tumores sino también en la regulación de su expresión. Por otro lado, tanto la expresión del RNAm como del péptido de GnRH es basalmente mayor en las células tumorales que en las células lúteas controles, lo cual podría explicar la refractariedad o falta de respuesta de las células tumorales a la estimulación con Buserelina. Sería de interés determinar qué factores mediarían esta expresión de GnRH basalmente incrementada en los tumores y que incidencia tendría en el desarrollo y la actividad secretora de los luteomas.

En conclusión, estos hallazgos proveen evidencias que GnRH podría ser un regulador autocrino/paracrino en las células del luteoma, las que poseen receptores para dicho péptido, dado que estos tumores sintetizan GnRH y su expresión se encuentra basalmente incrementada. Por lo tanto el GnRH podría estar constituyendo una parte integral de los complejos mecanismos regulatorios intratumorales que modulan la fisiología del tumor.

Capítulo V

Acción de drogas inmunosupresoras sobre el desarrollo tumoral

Introducción y objetivos

La inmunodeficiencia, tanto primaria como secundaria a drogas inmunosupresoras, radiación, infección u otras causas, pueden incrementar la incidencia de la aparición de tumores (Beverley, 1997). Hay evidencias en humanos que la incidencia de tumores está significativamente incrementada en individuos inmunosuprimidos (Sheil, 1992). Sin embargo, a pesar de observarse un leve incremento en la frecuencia de la mayoría de los tumores, en algunos tumores se observan incrementos desproporcionados. El riesgo relativo de padecer algunos tumores raros, como el sarcoma de Kaposi o linfoma cerebral, puede estar incrementado 1000 veces en individuos inmunosuprimidos; para tumores endocrinos, este riesgo relativo está incrementado 320 veces (Beverley 1997).

La localización en el bazo del tumor ovárico experimental desde la perspectiva inmunológica es un punto muy interesante. El sitio para el injerto ovárico ha sido seleccionado para asegurar la metabolización esteroidea por el hígado y como consecuencia, permitir el desarrollo tumoral bajo hipergonadotrofinemia, como fuera descrito anteriormente. Desde el punto de vista inmunológico el bazo es un sitio crítico de presentación de antígeno, teniendo en cuenta la hipótesis propuesta por Zinkernagel y col. (Zinkernagel et al., 1997). Ellos postulan que la localización, dosis y cinética temporal de duración del antígeno en el huésped forman una integral tridimensional que determina la respuesta inmunológica, siendo la localización del antígeno en órganos linfoides secundarios (bazo y/o nódulos linfáticos) un componente crítico de este paradigma, tanto para antígenos extraños como propios que hasta el momento habían sido inmunológicamente ignorados (como probablemente sea el caso del ovario en nuestro

modelo). En vista de esto, y dada la falta de información respecto al compromiso del sistema inmune en el desarrollo del luteoma, resultó atractivo el estudio de la progresión tumoral bajo inmunosupresión.

Con el objeto de establecer si la inmunosupresión podía alterar el desarrollo de este tumor experimental, se evaluaron los efectos de ciclosporina A (CsA) y dexametasona (Dex) en los animales portadores de tumor. Estas drogas ejercen sus acciones sobre el sistema inmune mediante distintos mecanismos. CsA es un producto microbiano con potentes propiedades inmunosupresoras, las cuales resultan de una inhibición selectiva de la activación de los linfocitos T. CsA interactúa con la señalización intracelular gatillada por la activación del receptor de las células T (TCR) formando un complejo con la ciclofilina y calcineurina, bloqueando la translocación del factor de transcripción NF-AT al núcleo, y consecuentemente inhibiendo la síntesis de varias citoquinas. Esto suprime selectivamente la respuesta adaptativa de los linfocitos T así como su desarrollo *de novo* en el timo (Sigal and Dumont, 1992). Gracias a su capacidad de interferir con la activación de las células T, esta droga es utilizada como potente agente inmunoterapéutico en enfermedades autoinmunes y también para prevenir el rechazo de órganos transplantados (Arai and Vogelsang, 2000). Por otra parte, Dex es un glucocorticoide sintético diez a veinte veces más activo que el cortisol y la corticosterona. Es un potente antiinflamatorio e inmunosupresor que actúa inhibiendo factores de transcripción como AP-1 (activation protein – 1) y NF- κ B, suprimiendo la inducción de citoquinas, receptores y moléculas de adhesión involucrados en la activación, migración y reclutamiento celular. Como consecuencia se produce la inhibición de la proliferación de los linfocitos T periféricos, acompañado por la inhibición de la migración celular a sitios de inflamación y control de recirculación de leucocitos (Fauci et al., 1976; De Bosscher et al., 1997; Rondinone et al.,

1991). Además, induce apoptosis de timocitos CD4(+)CD8(+), produciendo atrofia del timo (Ashwell et al., 2000; Rondoni et al., 1989).

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo se centró en estudiar el desarrollo del tumor bajo un estado de inmunosupresión, más precisamente, analizar el efecto de las drogas inmunosupresoras ciclosporina A y dexametasona sobre la evolución de los luteomas, comparándolo con un grupo de animales con operación ficticia. Para ello se evaluaron distintos parámetros endocrinos, inmunológicos e histológicos, supervivencia y peso del animal a lo largo del tratamiento, además del tamaño del tumor al finalizar el experimento. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con respecto al efecto de la CsA sobre los timos de los animales, se decidió evaluar el efecto de la inhibina sobre la proliferación de timocitos en cultivo en presencia o ausencia de CsA.

Materiales y métodos

Materiales

CsA (ciclosporina A, Sandimmun Neoral, 50 mg/ml, gentilmente donada por Sandoz, Argentina) fue diluida en aceite de ricino (EWE)-etanol (75:25); Dex (fosfato disódico de dexametasona, Decadron inyectable, 4 mg/ml, Sidus, Argentina), fue diluido en solución fosfosalina estéril. Medio de cultivo: RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino y $2 \cdot 10^{-5}$ M de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 0.25 µg/ml fungizona (RPMI-10%SFB). Fitohemaglutinina-P (PHA) (SIGMA); Inhibina A recombinante humana (NIBSC, Gran Bretaña).

Animales

Se utilizaron ratas portadoras de luteomas (grupo Tumor), los cuales se desarrollaron como consecuencia de los elevados niveles de gonadotrofinas en los animales injertados como previamente descrito, y como control de operación se utilizaron animales castrados con injerto de un trozo de músculo abdominal en el bazo (grupo Sham). Luego de la cirugía se los agrupó de a cuatro animales por jaula.

Tratamientos

Luego de un mes de desarrollo del tumor se iniciaron los siguientes tratamientos, asignándose los animales al azar dentro de cada grupo (Tumor o Sham): CsA 25 mg/kg (según los protocolos de Murphy y col. y Hojo y col. (Murphy et al., 1988; Hojo et al., 1999), Dex 0.1 mg/kg o vehículo constituido por una mezcla 75:25 aceite de ricino-etanol.

Las respectivas dosis fueron administradas durante la mañana en forma subcutánea, día por medio, durante 50 días. Además se determinaron los pesos corporales de los animales una vez a la semana para ajustar las dosis. Cada grupo estaba compuesto por 7 a 12 animales.

Obtención de las muestras

Al finalizar el tratamiento se procedió a extraer la mayor cantidad de sangre yugular de cada animal con jeringas heparinizadas (Calciparina) bajo anestesia con éter. Luego se sacrificaron los animales por dislocación cervical teniendo la precaución de no dañar los timos, y se extrajeron los tumores y los timos. Además se realizaron autopsias de los animales en busca de desórdenes inducidos por el tumor o propagación metastásica. Se llevó a cabo la observación macroscópica de varios órganos y tejidos, incluyendo pulmones, corazón, hígado, riñones, glándulas adrenales, intestinos, útero, bazo, tejido adiposo y peritoneo con el objeto de determinar la presencia de alguna anomalía.

Los timos fueron colocados inmediatamente en solución fisiológica y luego pesados. Los tumores fueron medidos en dos dimensiones (diámetros mayor y menor) con un calibre y los volúmenes de los mismos se calcularon considerando una forma elipsoidal ($V = \frac{4}{3}\pi \cdot r_1^2 \cdot r_2$, donde r_1 es el radio menor) (Clark and Holder, 1984; DeSombre and Arbogast, 1974). Algunos tumores de cada grupo fueron embebidos en formalina para realizar estudios histológicos, otros fueron destinados a la obtención de RNA.

Parámetros hematológicos

Con el objeto de verificar el estado inmunológico de los animales, se realizó un recuento leucocitario mediante el uso de un contador de células (Contador Hematológico Royco Cell CRIT 920-A), en el cual se determinó el número de linfocitos, neutrófilos segmentados y

monocitos a partir de la sangre heparinizada. Además se realizaron recuentos de hematíes y se midió la cantidad de hemoglobina.

Determinaciones hormonales

a) Determinación de hormonas proteicas

Radioinmunoanálisis para LH y FSH

Los niveles séricos de LH y FSH fueron determinados mediante RIA para hormonas proteicas como descrito en el capítulo II. Los resultados se expresaron según los estándares RP₃ de rata para LH y FSH. La sensibilidad de los ensayos fue 0.015 ng/ml para LH y 0.1175 ng/ml para FSH. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron 7.2% y 11.4% para LH, y 8.0% y 13.2% para FSH, respectivamente.

Radioinmunoanálisis para prolactina (PRL)

El protocolo utilizado fue similar al empleado para la medición de gonadotrofinas. Se utilizó para marcar con ¹²⁵I₂ 5µg 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 tirotrofina menor al 0.3%. El método de marcación fue semejante al descrito en el capítulo anterior. El primer antisuero contra PRL de rata fue NIDDK-anti-rat-PRL-RIA-9 obtenido al inmunizar conejos con PRL de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rPRL-I-6. El mismo se diluyó a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo (entre 1:1500 y 1:2500). El estándar de referencia fue PRL de rata NIDDK-rPRL-RP-3, con una actividad biológica de 30 UI/mg. La curva patrón se extiende de 0.0396 a 10 ng por tubo. Los resultados se expresaron según

los estándares RP₃ de rata para PRL. La sensibilidad de los ensayos fue 1.6 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayos fueron 8.1% y 11.4%.

b) Determinación de hormonas esteroideas

Los RIA para hormonas esteroideas se realizaron según el Dr. Libertun (Libertun 1980a).

Radioinmunoanálisis para 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 antisuero anti estradiol específico generosamente provisto por el Dr. G. D. Niswender, (Koreman et al., 1974) disuelto 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 por el agregado de una suspensión de Carbón (0.5%)- Dextrano (0.05%) en buffer fosfato, recientemente preparada. Esta suspensión adsorbe 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 500 μ l del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 3 ml de líquido centelleante (Optiphase 'HiSafe' 3, Fischer Chemicals). 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 1.7 pg y los coeficientes de varianción intra e interensayo fueron 9.3% y 11.4%, respectivamente.

Histología

Una vez extraídos los luteomas, se guardaron inmediatamente en formol 10%, se incluyeron en parafina y se realizaron secciones de 4 μ m utilizando un micrótomos, como fuera realizado en estudios previos (Chamson-Reig et al., 1999a). Para su observación al microscopio óptico se realizó la coloración con hematoxilina y eosina según protocolos estándar. Tres o cuatro tumores diferentes pertenecientes a cada grupo experimental fueron evaluados a doble ciego por un patólogo independiente. Se examinaron varios cortes de cada tumor.

Obtención de RNA total y Northern blotting de inhibinas

Se purificó RNA total a partir de algunos de los tumores pertenecientes a los distintos grupos según fuera descrito en el capítulo I. Luego se realizaron *Northern blots* con el objeto de detectar los RNAs correspondientes a las distintas subunidades de inhibina: α , β A y β B. Para ello se procedió como descrito anteriormente en el capítulo II.

Ensayo de proliferación de timocitos en cultivo

La obtención y cultivo de timocitos se realizó como fuera descrito por Rondinone y col (Rondinone et al., 1989). Brevemente, se extrajeron los timos de ratas hembra adultas castradas sacrificadas con éter, se los lavó en campana de esterilidad con solución fisiológica estéril y se los disgregó utilizando dos portaobjetos esmerilados en medio RPMI-10%SFB en una placa de Petri. Se filtra a través de una malla de Nytex. La suspensión celular se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió el pellet celular en RPMI-10%SFB. Se contaron las células con tinción de Azul Trypán y se sembraron 1×10^6 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se estimularon con 50 µg/ml de PHA en presencia o ausencia de 50 ng/ml de CsA y/o 10^{-7} M inhibina (repartida en 3 dosis cada 24 hs de 3.3×10^{-8} M cada una, para lograr un estímulo sostenido durante los 3 días de cultivo). Se cultivaron las placas en estufa gaseada (5% CO₂ en aire) a 37°C. Luego de 48 hs se colocó un pulso de [³H]timidina (0.5 µCi por pocillo) y 18-24 hs más tarde se cosecharon las células (Cell Harvester 8, NUNC) utilizando un filtro de microfibra de vidrio GF/C (Whatman). Los trozos de filtro correspondiente a cada pocillo se introdujeron en viales de plástico conteniendo 500 µl de líquido centellante (Optiphase 'HiSafe' 3, Fischer Chemicals) y se contaron en viales apropiados en un contador β (Beckman).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar. Las diferencias entre las medias de cada grupo se analizaron con el programa Statistica v 5.0 mediante el análisis de varianza múltiple (ANOVA de dos vías), seguido del test Newman-Keuls para los factores de interacción en los casos en los cuales la interacción resultó significativa ($p < 0.05$), o para

los efectos principales, en los casos la interacción no resultó significativa (Sokal and Rohlf 1995a). Las diferencias entre los porcentajes se evaluaron mediante un test de comparación de dos porcentajes (Lison, 1976). $p < 0.05$ fue considerado significativo.

En el caso del análisis estadístico correspondiente a los estudios *in vitro*, se utilizó un diseño de medidas repetidas (Anova en un sentido). La estadística se llevó a cabo con datos que sufrieron transformación de inversas, con el objeto de que cumplan los supuestos de homogeneidad de varianza.

Resultados

Sobrevida

La sobrevida total fue de un 91% (48/53), observándose que las bajas se presentaron exclusivamente en los grupos tratados con CsA. Sobrevivió el 75% de los animales tratados con CsA tanto en el grupo Tumor (9/12) como en el grupo Sham (6/8), siendo este valor significativamente menor ($p<0.01$) que en los grupos tratados con Dex o vehículo (Tabla I). Las muertes se registraron en las semanas 6 y 7 de iniciados los tratamientos.

Tabla 1. Tasas de sobrevida de animales portadores del tumor y Sham tratados con ciclosporina A (25 mg/kg/día por medio), dexametasona (0.1 mg/kg/día por medio) o vehículo durante 50 días luego de un mes de desarrollo tumoral en ausencia de tratamientos.

Tasa de sobrevida (%)	Ciclosporina A	Dexametasona	Vehículo
Tumor	75	100	100
	(9/12)	(12/12)	(7/7)
Sham	75	100	100
	(6/8)	(7/7)	(7/7)
TOTAL	75*	100	100
	(15/20)	(19/19)	(14/14)

Nota: Las tasas de sobrevida fueron determinadas luego de 7 semanas de tratamiento. Ciclosporina A: CsA, Dexametasona: Dex, Vehículo: Veh.

* CsA vs Veh o Dex: $p<0.01$.

Peso corporal

Los animales tratados con vehículo mostraron un incremento significativo de sus pesos corporales a partir de la primer semana *post* inicio de los tratamientos en el grupo Sham ($p<0.05$) o tercer semana en el grupo Tumor ($p<0.05$), manteniéndose los pesos superiores a los iniciales hasta el final del experimento (Fig. 1).

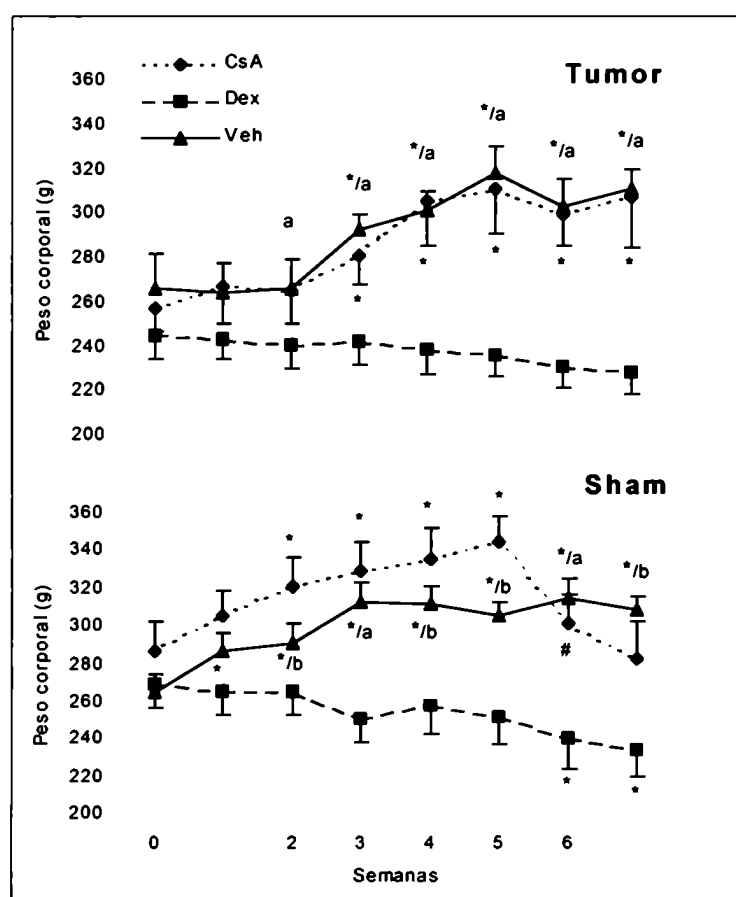


Figura 1: Evolución semanal de los pesos corporales de las ratas pertenecientes a los grupos Tumor (arriba) y Sham (abajo), tratadas con CsA (25 mg/kg/día por medio), Dex (0.1 mg/kg/día por medio) o vehículo durante 50 días luego de un mes de desarrollo tumoral. Significancia dentro de cada tratamiento: * vs. valor inicial $p<0.05$; # vs. semana 5, $p<0.001$. Significancia entre tratamientos para cada tiempo: a vs. Dex $p<0.05$; b vs. CsA y Dex, $p<0.05$.

Tanto los animales Sham como los portadores del tumor respondieron en forma similar a la administración de Dex, mostrando una inhibición significativa del incremento de los pesos corporales a partir de la segunda semana, en comparación con los animales controles tratados con vehículo ($p<0.05$). Con respecto a los valores iniciales, en los animales tratados con Dex pertenecientes al grupo Sham se observó una disminución significativa de los pesos corporales en las semanas 6 y 7 ($p<0.05$ y $p<0.005$, respectivamente), mientras que en el grupo Tumor no se evidenciaron diferencias significativas, a pesar de que se observa una tendencia a la caída de peso.

Los pesos corporales de las ratas del grupo Tumor con tratamiento con CsA se incrementaron significativamente a partir de la 3er semana y continuaron incrementándose hasta el final del experimento, en forma semejante al de los animales tratados con vehículo ($p<0.05$). En el caso de las Sham, el tratamiento con CsA permitió el incremento de sus pesos a partir de la semana 2 en adelante ($p<0.001$), observándose un máximo en la semana 5. A partir de este momento se observa una abrupta caída de los mismos ($p<0.001$) para alcanzar valores similares a los iniciales. En la semana siete los pesos de los animales Sham tratados con CsA son significativamente inferiores a los alcanzados por los animales Sham tratados con vehículo ($p<0.05$).

Parámetros inmunológicos

Con el objeto de verificar la eficacia de los tratamientos inmunosupresores (CsA y Dex) se evaluaron algunos parámetros indicadores de dicho estado. El tratamiento con Dex disminuyó significativamente el tamaño de los timos tanto en el grupo Tumor ($p<0.005$) como en el grupo Sham ($p<0.001$), con respecto al inyectado con vehículo (Fig. 2). La CsA redujo exclusivamente los tamaños de los timos en los animales Sham ($p<0.005$), mientras

que en el grupo Tumor no se observó ningún efecto. Los mismos resultados fueron observados cuando se expresó el peso del timo relativo al peso corporal (no se muestra).

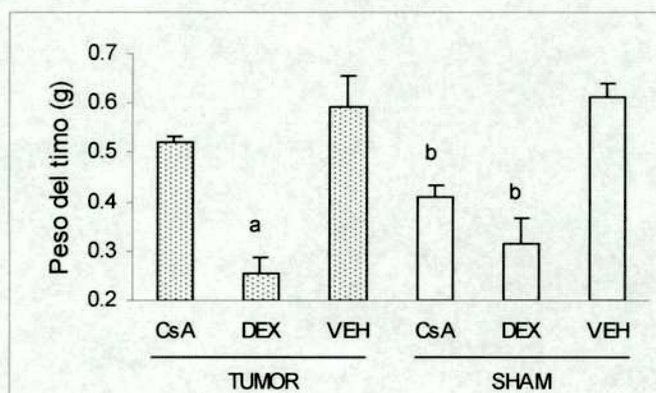


Figura 2: Peso del timo (gr) de las ratas pertenecientes a los grupos Tumor y Sham, tratadas con CsA (25 mg/kg/día por medio), Dex (0.1 mg/kg/día por medio) o vehículo durante 50 días luego de un mes de desarrollo tumoral. Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el experimento. a: significativamente diferente de vehículo, $p < 0.001$. b: significativamente diferente de vehículo, $p < 0.005$.

Con respecto a los parámetros hémicos estudiados, la concentración de hemoglobina en los animales tratados con CsA fue significativamente inferior a los tratados con vehículo ($p < 0.01$) o Dex ($p < 0.01$) (Fig. 3A). Ni CsA ni Dex modificaron el número de hematíes/ mm^3 (no se muestra). El número de neutrófilos segmentados/ mm^3 no varió significativamente con ninguno de los tratamientos, sin embargo fue superior en los animales Sham en su conjunto con respecto a los del grupo Tumor ($p < 0.05$) (Fig. 3B). El número de linfocitos/ mm^3 en los animales tratados con Dex fue menor que en los tratados con vehículo, ($p < 0.005$) y que en los tratados con CsA ($p < 0.001$) (Fig. 3C). La CsA no afectó este parámetro. Por otro lado, CsA indujo un incremento en el número de

monocitos/mm³ solamente en los animales Sham ($p<0.005$), mientras que Dex no tuvo efecto (Fig. 3D).

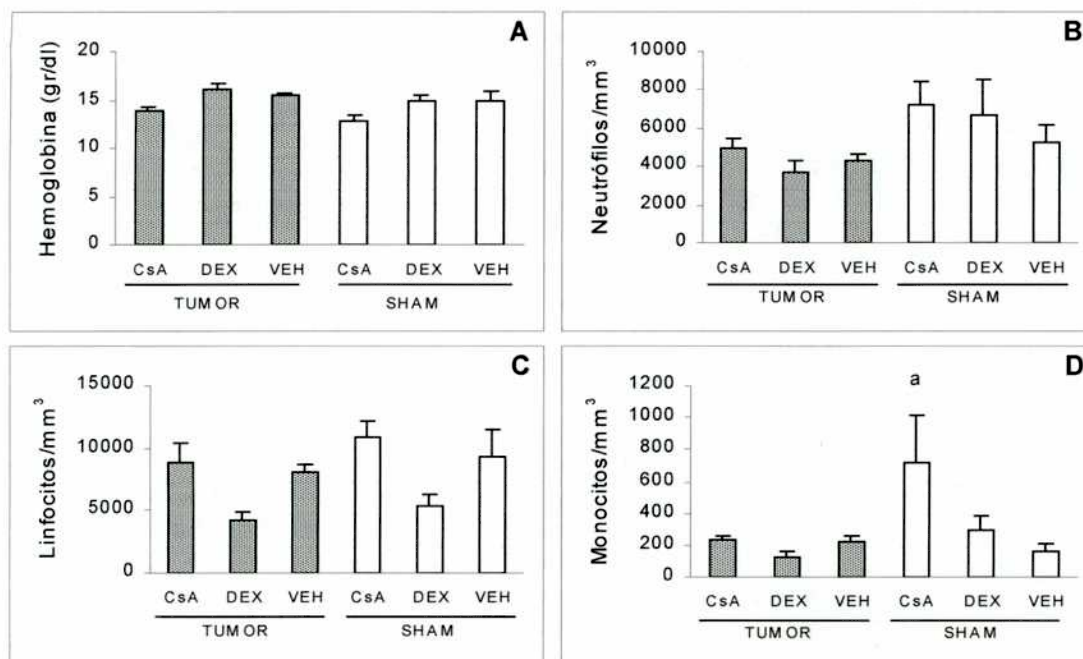


Figura 3: Concentración de hemoglobina sérica (gr/dl) (A), número de neutrófilos segmentados (B), de linfocitos (C) y de monocitos (D) por mm³ de suero de las ratas pertenecientes a los grupos Tumor y Sham, tratadas con CsA (25 mg/kg/día por medio), Dex (0.1 mg/kg/día por medio) o vehículo durante 50 días luego de un mes de desarrollo tumoral. Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el experimento. a: significativamente diferente de vehículo, $p<0.01$.

Hemoglobina sérica: Interacción NS. Tratamiento con CsA es significativamente diferente de vehículo, $p<0.05$.

Neutrófilos segmentados/mm³: Interacción NS. Grupo Tumor difiere significativamente del grupo Sham, $p<0.05$.

Linfocitos/mm³: Interacción NS. Tratamiento con Dex es significativamente diferente de vehículo, $p<0.005$.

Niveles hormonales: gonadotrofinas, prolactina y estradiol

De acuerdo a lo esperado, las gonadotrofinas en los animales portadores de tumor se encontraban elevadas. Además, y según describiéramos en trabajos anteriores (Lux-Lantos et al., 1995), tanto los niveles de LH como de FSH fueron superiores en los animales Sham con respecto a los portadores de tumor ($p < 0.005$ y $p < 0.001$, respectivamente) (Fig. 4A y 4B). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de gonadotrofinas debidas a los tratamientos con las diferentes drogas.

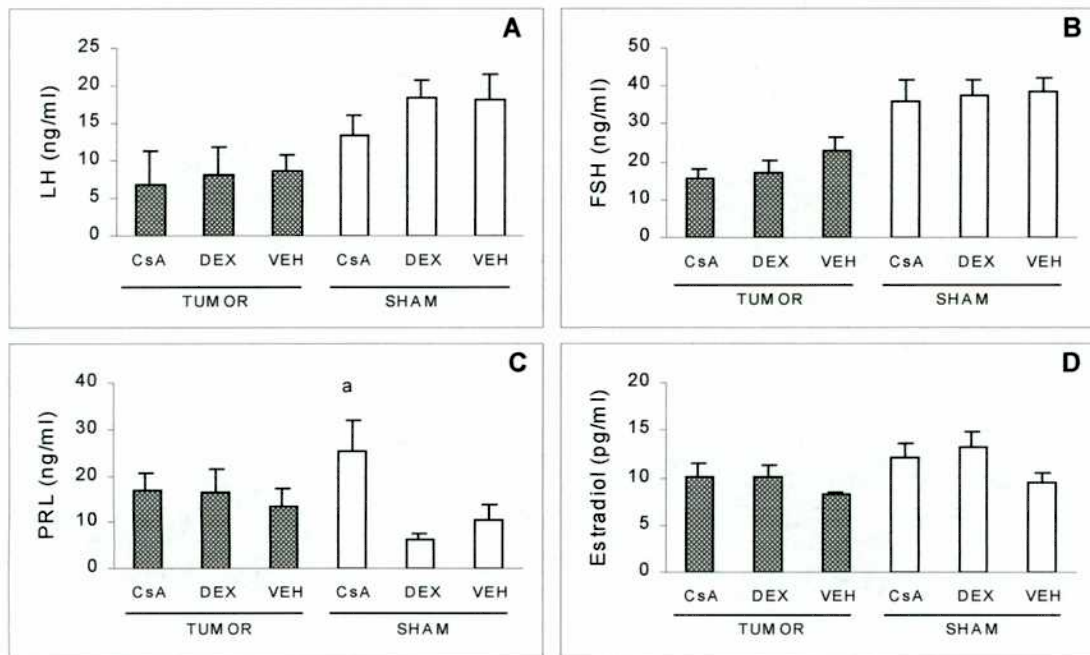


Figura 4: Niveles séricos de LH (ng/ml) (A), FSH (ng/ml) (B), prolactina (ng/ml) (C) y estradiol (pg/ml) (D) de las ratas pertenecientes a los grupos Tumor y Sham, tratadas con CsA (25 mg/kg/día por medio), Dex (0.1 mg/kg/día por medio) o vehículo durante 50 días luego de un mes de desarrollo tumoral. Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el experimento. a: significativamente diferente de vehículo, $p < 0.05$.

LH y FSH: Interacción NS. Grupo Tumor difiere significativamente del grupo Sham, $p < 0.005$.

Estradiol: Anova NS.

Con respecto a PRL, CsA indujo un incremento significativo solamente en los animales Sham ($p < 0.05$) (Fig. 4C); los distintos tratamientos no alteraron la secreción de PRL en el grupo Tumor. No se observaron variaciones en los niveles de estradiol con ningún tratamiento en ningún grupo (Fig. 4D).

Volumen tumoral

Ni Dex ni CsA indujeron variaciones significativas en el volumen de los tumores con respecto a los animales tratados con vehículo (Fig. 5). Además no se observaron metástasis o alteraciones visibles en ninguno de los órganos evaluados.

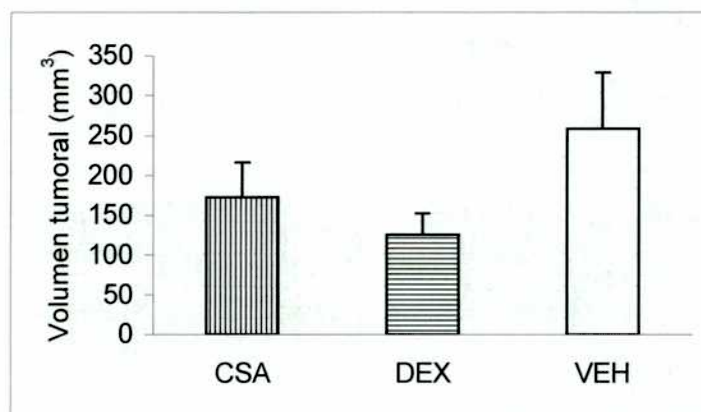


Figura 5: Tamaño del tumor de las ratas tratadas con CsA (25 mg/kg/día por medio), Dex (0.1 mg/kg/día por medio) o vehículo durante 50 días luego de un mes de desarrollo tumoral. Las determinaciones fueron realizadas al finalizar el experimento. Anova NS.

Histología tumoral

El análisis histológico mostró que el 86% de los tumores presentaron tejido altamente luteinizado mientras que el 11% mostró predominancia en células de granulosa (Tabla II). No se observaron signos de involución de cuerpos lúteos, en concordancia con la ausencia de detección de células positivas para TUNEL en estos tumores, como observado en el

capítulo I (Soriano et al., 2002). Los tratamientos con los inmunosupresores no alteraron la histología tumoral, observándose ausencia de signos de transformación maligna. Se observó una interfase de colágeno en 3/10 tumores con un patrón focalizado.

Tabla II: Análisis histológicos de tumores ováricos intraesplénicos tratados con vehículo, ciclosporina A o dexametasona.

Tratamientos del animal	Porcentaje de células tumorales lúteas vs granulosa	Alteraciones celulares (signos de transformación maligna)	Presencia de depósitos de colágeno en la interfase entre luteoma y bazo
Vehículo	96% vs 4% (3)	ninguna	1/3 (hasta 26µm ancho, focalizados)
Ciclosporina A	83% vs 17% (3)	ninguna	0/3
Dexametasona	75% vs 25% (4)	ninguna	2/4 (hasta 40µm ancho, focalizados)

Nota. Tres o cuatro tumores diferentes de cada grupo experimental fueron evaluados a doble ciego por un patólogo independiente; número entre paréntesis = número de tumores por grupo. Signos de transformación maligna evaluados: índice mitótico, atipias citológicas, necrosis, invasión vascular hematológica o linfática.

Expresión del RNAm de las subunidades de inhibina en el luteoma bajo inmunosupresión

Nuestros resultados muestran claras evidencias que en los animales portadores de tumor uno o más factores presentes en estos animales evitan que los efectos de la CsA se manifiesten, como lo hacen en el grupo Sham. Hedger y col (Hedger et al., 1989) habían observado que la inhibina era capaz de revertir el efecto antiproliferativo de la CsA en timocitos estimulados. Dado que estos tumores ováricos intraesplénicos son capaces de sintetizar los RNAs de las subunidades de inhibina, como describiéramos en el

capítulo II, se deseó evaluar si aún en estado de inmunosupresión estos tumores seguían teniendo la capacidad de sintetizar inhibina. Para ello se realizaron *Northern blots* con RNA total proveniente de luteomas de animales tratados con CsA, Dex o vehículo. Los geles muestran que los tumores continúan produciendo los RNAs correspondientes a las subunidades α , βA y βB de inhibina aún bajo la influencia de las drogas inmunosupresoras CsA y Dex en las dosis utilizadas, siendo βB de muy baja producción (Fig. 6).

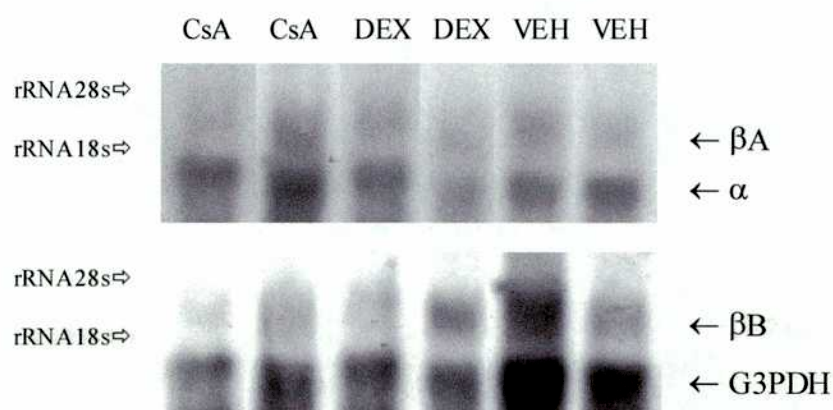


Figura 6: Expresión de los RNAs de las subunidades α , βA y βB de inhibina en los luteomas de ratas tratadas con CsA (25 mg/kg/día por medio), Dex (0.1 mg/kg/día por medio) o vehículo durante 50 días luego de un mes de desarrollo tumoral. Se utilizó la expresión del RNAm de G3PDH como control de siembra.

Efecto de la inhibina sobre la proliferación de timocitos en cultivo

Habiendo demostrado que los tumores expresan los RNAm de inhibina aún bajo inmunosupresión y teniendo en cuenta el antecedente de Hedger y col. (Hedger et al., 1989), se deseó evaluar si la inhibina estaba comprometida en compensar los efectos inhibitorios del crecimiento del timo inducidos por CsA en los animales portadores del

tumor. Para ello se decidió analizar el efecto de la inhibina sobre la proliferación de timocitos en cultivo estimulados con PHA. Los resultados indican que la inhibina no revierte el efecto inhibitorio sobre la proliferación inducido por la CsA (Fig. 7). Contrariamente a lo hipotetizado, la inhibina inhibe *per se* la proliferación de los timocitos estimulados con PHA ($p < 0.05$).

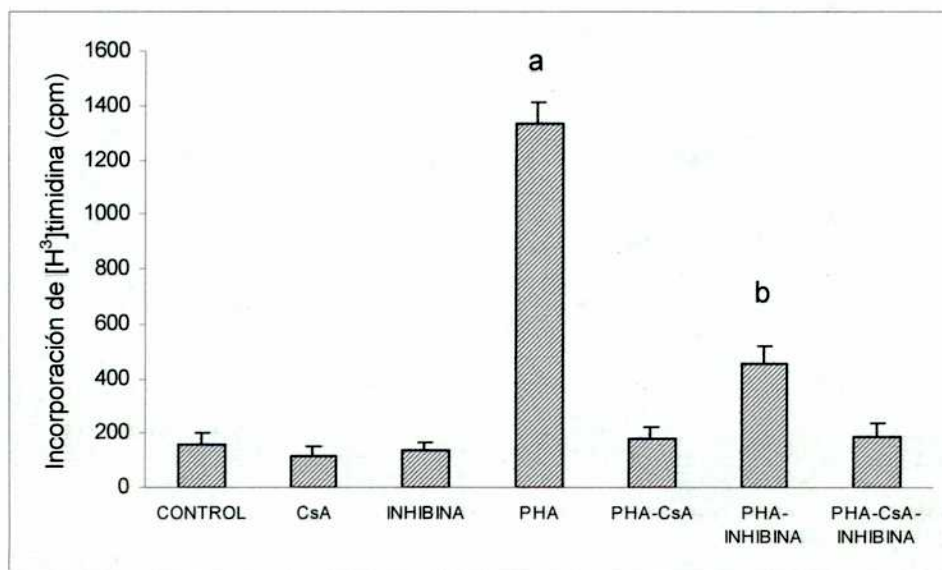


Figura 7: Efecto de la inhibina sobre la proliferación de timocitos tratados con CsA, estimulados o no con PHA. ANOVA: $p < 0.05$.

a: PHA distinto de todos ($p < 0.01$) menos de PHA-INHIBINA.

b: PHA-INHIBINA distinto de control, PHA-CSA y PHA-CSA-INHIBINA ($p < 0.01$).

Discusión

Aquí hemos evaluado el efecto de dos drogas inmunosupresoras sobre el desarrollo de un tumor ovárico experimental, ya que se había postulado que la inmunosupresión podría incrementar la incidencia y/o malignización de tumores y que la localización intraesplénica del tumor es crítica en cuanto a la exposición de antígenos frente al sistema inmune.

Con respecto a la tasa de sobrevivencia de los animales, solamente CsA indujo una reducción significativa en este parámetro tanto en el grupo Sham como en el Tumor, sugiriendo un efecto tóxico de esta droga en el presente protocolo de administración.

En los animales Sham tratados con vehículo se observó el esperable aumento de peso postcastración. La presencia del tumor postergó este aumento de peso tanto en animales tratados con vehículo como con CsA. Esto sugeriría que el tumor produce algún/os factor/es que pudiera/n tener algún efecto inhibitorio sobre el aumento de peso o que en estos animales no se establece el estado postcastración de la misma manera que en los animales Sham (en concordancia con menores niveles de gonadotrofinas, ver más abajo).

Los animales portadores de tumores tratados con CsA, que sobrevivieron hasta el final del experimento, mostraron un peso promedio similar a los tratados con vehículo, mientras que en los animales Sham, la CsA indujo una pérdida significativa del peso luego de 6 semanas de tratamiento, lo que sugeriría un efecto protector presente en los animales portadores del tumor con respecto a la acción de la CsA. Por otra parte, Dex indujo importantes caídas en los pesos corporales de los animales a partir de la segunda semana de tratamiento tanto en animales Sham como portadores del tumor, en concordancia con el efecto catabólico extensamente descripto para esta droga (Coirini et al., 1994).

El efecto de CsA sobre las tasas de supervivencia y peso corporal podría deberse a efectos colaterales de la droga. En este contexto, Whiting y col. describieron que ratas tratadas durante siete semanas con CsA presentaron anomalías renales tanto estructurales como funcionales, como así también daño hepático (Whiting et al., 1983).

Con respecto al peso de los timos, la Dex indujo la esperada caída (aproximadamente 50%) de este parámetro tanto en los animales Sham como en los portadores del tumor (Ashwell et al., 2000), dado que se ha demostrado que los glucocorticoides inducen apoptosis de los timocitos (Ashwell et al., 2000; Rondinone et al., 1989). Por otro lado, CsA indujo un 30% de reducción del timo en los animales Sham, en concordancia con datos previos (Damoiseaux et al., 1997), mientras que no se observó efecto en las ratas portadoras del tumor. Nuevamente, este hecho hace pensar en la presencia de algún factor secretado por el luteoma que estaría protegiendo al timo de la acción de la CsA. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que estos tumores secretan inhibinas (Chamson-Reig et al., 1999a; Hockl et al., 2000a). Hedger y col. (Hedger et al., 1989) demostraron que la inhibina estimula la incorporación de [H^3]timidina en cultivos de timocitos de rata macho adulta en varias condiciones experimentales. Por lo tanto, postulamos la siguiente hipótesis: la acción proliferativa de la inhibina podría oponerse al efecto antiproliferativo de la CsA, previniendo la pérdida del peso del timo en los animales portadores del tumor.

Los resultados indicaron que los tumores seguían teniendo la capacidad de expresar los RNAm de las subunidades de inhibinas en los animales inmunosuprimidos, a pesar de que las subunidades β se expresaban en baja cantidad. Sin embargo, y en contraposición con los resultados de Hedger y col., la inhibina no pudo compensar la inhibición de la proliferación inducida por CsA en cultivos de timocitos de rata hembra ovariectomizada estimulados con

fitohemaglutinina en nuestras condiciones experimentales. Incluso se pudo observar una inhibición significativa de la proliferación inducida por la presencia de inhibina.

Por ello, bajo nuestras condiciones, la inhibina no pareciera ser la responsable de compensar las acciones de la CsA en los animales portadores del tumor. Otras proteínas no inactivadas por el hígado, como por ejemplo IGF-I, la cual es producida por estos tumores (Hockl et al., 2000a) y ha evidenciado inducir proliferación en timocitos (Sabharwal and Varma, 1996), podría estar involucradas en estos efectos. Además, IGF-I ha mostrado acelerar la reconstitución del timo de la rata luego de la involución inducida por CsA (Beschoner et al., 1991). Futuros experimentos intentarán evaluar si es éste el factor involucrado en el efecto protector observado en animales portadores de tumor.

Al analizar otros parámetros relacionados con la inmunosupresión, observamos que la Dex disminuyó el número de linfocitos/mm³ en ambos grupos, tal como lo avalan datos previos (Fauci et al., 1976), mientras que la CsA no tuvo efecto. La falta de efecto de CsA sobre el número de linfocitos pudo deberse a una dosis insuficiente, lo cual es improbable ya que con la dosis utilizada, se observaron efectos adversos. Esta respuesta podría estar también condicionada por la cepa de ratas utilizada. Con respecto a los monocitos, en el grupo Sham la CsA incrementó el número de monocitos/mm³ en concordancia con los datos obtenidos por Whiting y col. (Whiting et al., 1983). A semejanza de lo que sucede con respecto al tamaño del timo y a la caída de peso, algún producto del tumor estaría impidiendo la acción de la CsA sobre el número de monocitos en los animales portadores del tumor. Mientras que ninguno de los dos tratamientos modificó el número de hematíes/mm³, se observó anemia asociada con una disminución de la concentración de hemoglobina sérica en los animales tratados con CsA, también de acuerdo con datos previos (Whiting et al., 1983);

este parámetro no pareciera estar alterado por este posible factor tumoral, ya que dicha anemia ocurre tanto en los animales Sham como en los portadores del tumor.

Se analizó también el entorno hormonal de estos animales. En concordancia con datos previos de nuestro laboratorio (Lux-Lantos et al., 1995), observamos que en los animales portadores del tumor los niveles de LH y FSH son manifiestamente superiores a los valores de un animal en estro ($LH_{\text{estro}}: 1.3 \pm 0.2$ ng/ml; $FSH_{\text{estro}}: 6.6 \pm 0.4$ ng/ml), sin embargo son menores a los observados en los animales Sham. Estas diferencias en los niveles de gonadotrofinas con respecto a los animales Sham no se deberían a un escape de estradiol del metabolismo hepático, ya que los niveles de este estrógeno en sangre periférica fue similar en ambos grupos, Sham y Tumor. Las drogas inmunosupresoras no tuvieron efecto alguno sobre las gonadotrofinas en ninguno de los dos grupos. Contrariamente, se observó un aumento de los niveles séricos de PRL inducidos por CsA en los animales Sham, pero no en animales portadores del tumor, observaciones que refuerzan nuestra hipótesis de la existencia de un factor secretado por el tumor que impide algunas de las acciones de CsA. Un incremento sérico de PRL mediado por la administración de CsA ya había sido demostrado por Esquifino y col. (Esquifino et al., 1995). Los efectos de la CsA sobre los monocitos y la secreción de PRL podrían constituir eventos relacionados, ya que se ha demostrado que monocitos y linfocitos T y B humanos expresan el RNAm del receptor de PRL y también su proteína (Pellegrini et al., 1992) (Russell et al., 1984). Además, PRL aumenta el número absoluto de unidades formadoras de colonias granulocíticas-macrofágicas esplénicas en ratones inmunosuprimidos (Woody et al., 1999).

El análisis histológico de las muestras tumorales mostró un alto grado de luteinización, el cual no fue modificado por el tratamiento con las drogas inmunosupresoras. Es interesante

notar que el porcentaje de los tumores con predominancia de células luteinizadas (cuerpos lúteos o folículos luteinizados) sobre células de granulosa (estructuras foliculares bien desarrolladas) fue similar al observado en tumores luego de un año de desarrollo (Chamson-Reig et al., 1999a).

Nuestro objetivo original fue evaluar si drogas inmunosupresoras lograban modificar el desarrollo de este tumor experimental, especialmente teniendo en consideración que, a causa de su localización intraesplénica, existía la posibilidad que el sistema inmune hubiera limitado el desarrollo del injerto (Zinkernagel et al., 1997). Ni CsA ni Dex modificaron significativamente el volumen del tumor, los parámetros histológicos del mismo ni provocaron la aparición de metástasis visibles en los órganos analizados. Ninguna de las drogas, en las presentes condiciones experimentales, indujeron exacerbación tumoral o malignización. Esta falta de exacerbación bajo terapia inmunosupresora podría deberse a que los tumores presentaron antígenos de diferenciación y por eso indujeron una respuesta inmune débil; en este caso, la inmunosupresión no afectaría sustancialmente su desarrollo. Además, uno de los mecanismos de transformación maligna es la reducción de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Van Niekerk y col., estudiando el perfil de marcadores de tejidos ováricos normales y los tumores derivados de ellos, han demostrado una pérdida de moléculas MHC de clase I en aquellas áreas en las que habían células tumorales (Van Nierkerk et al., 1993). Como nuestro tumor no presentó transformación maligna, el tejido probablemente expresó niveles normales de moléculas de MHC clase I, no presentando antígenos extraños, y en consecuencia el sistema inmune no habría sido inducido. Más aún, en un trabajo reciente, Ochsenbein y col. (Ochsenbein et al., 2001) describieron que células tumorales inyectadas directamente en el bazo, pero separadas de las células T por barreras que incluyen colágeno

u otros factores de hemostasis, no indujeron activación de células T citotóxicas y, consecuentemente, no fueron rechazadas. Observaciones histológicas de nuestros preparados muestran que pareciera haberse formado una interfase de colágeno alrededor de algunos de los tumores ováricos intraesplénicos (3/10 tumores analizados, ver Tabla II), lo cual podría explicar, en parte, la falta de diferencias en el desarrollo tumoral entre los animales control y los inmunosuprimidos.

Es interesante notar que, a pesar de que Hojo y col. (Hojo et al., 1999) han demostrado que CsA promueve la progresión del cáncer por un mecanismo celular directo que induce alteraciones morfológicas en células tumorales tales como plegamiento de membrana y adquisición de pseudopodios exploratorios, no se observaron alteraciones celulares en tumores ováricos intraesplénicos bajo tratamiento con CsA.

Concluimos que la inmunosupresión inducida por CsA o Dex, a pesar de ser efectiva sobre parámetros inmunológicos, no afectó el desarrollo tumoral. A diferencia de los animales portadores del tumor, en animales Sham la CsA indujo efectos sobre varios parámetros como por ejemplo el peso corporal, peso del timo, número de monocitos y niveles de PRL, sugiriendo la presencia de factor/es secretado/s por el tumor que impiden o compensan algunas de las acciones de CsA. Experimentos futuros tratarán de verificar esta hipótesis.

Discusión general

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de un tumor ovárico intraesplénico altamente luteinizado (luteoma) en rata e involucró la investigación de distintos aspectos de la biología y fisiopatología del mismo.

Inicialmente se deseó describir inmunocitoquímicamente la presencia de ciertas moléculas relacionadas con el desarrollo tumoral y la función endocrina. Se examinaron parámetros relacionados al crecimiento efectivo del tumor, el cual resulta de un balance entre proliferación y muerte celular. Para ello se seleccionó el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que es un indicador de la activación de la mitosis en el ciclo celular. El mismo se halló principalmente en células de granulosa de folículos en desarrollo y estuvo ausente en folículos luteinizados, lo que sugeriría que los luteomas desarrollarían preferentemente a partir de folículos que no han ovulado por hipertrofia y proliferación de células foliculares. En el luteoma, la mayor diferencia con respecto a los ovarios normales fue la ausencia casi completa de células apoptóticas luego de uno a dos meses de desarrollo tumoral, determinada por el método de TUNEL. Esta observación sugiere el impedimento de la regresión de los cuerpos lúteos o de atresia folicular en este luteoma experimental, en el cual se observaron ambos: cuerpos lúteos y folículos en diferentes estadios de desarrollo y de luteinización.

Estos datos referentes a proliferación y apoptosis sugieren que el luteoma representa un modelo tumoral no metastásico altamente diferenciado, el cual desarrollaría preferentemente a partir de folículos que no han ovulado por hipertrofia y proliferación de células foliculares y persistencia de cuerpos lúteos.

Un factor interesante analizado en las secciones del luteoma lo constituyeron las uniones estrechas, las cuales podrían jugar un papel importante en la regulación de la foliculogénesis y atresia folicular como así también en el crecimiento, diferenciación, y

regresión del cuerpo lúteo (Grazul-Bilska et al., 1998). En el luteoma, la proteína Cx43, que forma parte de las uniones estrechas del ovario, fue hallada principalmente en folículos (células de granulosa) y se expresó pobremente o estuvo ausente en folículos luteinizados, difiriendo de los cuerpos lúteos activos en el ovario normal. La expresión de Cx43 muestra claramente que en los luteomas que presentan cuerpos lúteos persistentes se encuentran alterados algunos de los rasgos característicos del tejido lúteo normal.

En el tejido tumoral se demostró una activa esteroidogénesis por la elevada expresión de la proteína StAR, la cual constituye el paso limitante en la esteroidogénesis, aún en etapas tardías del desarrollo tumoral. Se halló expresión de StAR solamente en folículos luteinizados y en células tecales, pero estuvo ausente en células de granulosa de folículos, indicando que estas últimas no participan en la producción *de novo* de esteroides.

La P₄₅₀ aromatasa, enzima clave que cataliza el último paso de la biosíntesis del estradiol en el ovario, se expresó en forma muy intensa en células de granulosa y estuvo también presente en células luteales, en concordancia con la elevada secreción de estradiol por las células tumorales (Chamson-Reig et al., 1997).

Con respecto a SNAP-25, la proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa la cual está involucrada en los procesos de exocitosis regulada, se observó inmunotinción asociada a membrana y citoplasmática, en grupos de células endocrinas pertenecientes a folículos en desarrollo y en folículos luteinizados, a lo largo del desarrollo tumoral. Es de destacar, que no se hallaron fibras inmunorreactivas ni para SNAP-25, ni para TH (tirosina hidroxilasa) en los injertos, indicando que luego del trasplante en el bazo, los ovarios no sufren una reinnervación manifiesta.

Teniendo en cuenta los parámetros inmunocitoquímicos estudiados en los luteomas, podemos concluir que la mayoría de ellos no demuestran alteraciones manifestadas respecto

del ovario normal. Las gonadotrofinas y otros factores producidos por el tumor parecerían cumplir un papel fundamental en el mantenimiento de la expresión de las proteínas arriba analizadas, evitando la apoptosis en este tejido. Estos tumores representan un modelo tumoral no metastásico altamente diferenciado, en el cual se conservan muchos de los rasgos normalmente observados en el ovario, mientras que otros se encuentran alterados, y presentan un interesante modelo para el estudio de la participación de las gonadotrofinas en el desarrollo de tumores.

Estos tumores ováricos experimentales, altamente luteinizados, son capaces de sintetizar activamente los RNA mensajeros de las diferentes subunidades de inhibina α , βA and βB , con un patrón característico. El hecho de que estos tumores sinteticen inhibinas sugiere que estas hormonas podrían ser marcadores de desarrollo tumoral, pudiendo ser de utilidad diagnóstica y en el seguimiento de tumores ováricos. La detección de las tres subunidades de inhibinas en nuestro luteoma experimental está de acuerdo al origen histológico de estos tumores y hace que sea un excelente modelo de estudio de tumores de granulosa y su relación con el control de la secreción de inhibinas. Estos resultados demuestran que en los animales portadores del tumor los niveles séricos de FSH y la síntesis de inhibina están estrechamente correlacionados, evidenciando patrones particulares a lo largo del desarrollo, además de demostrar que tejido altamente luteinizado es capaz de producir inhibinas.

La presencia de SNAP-25 ha sido relacionada a la exocitosis de productos peptídicos. El hecho de haberse detectado en el luteoma tanto la expresión de dicha proteína SNAP-25 como también los RNAs correspondientes a las distintas subunidades de inhibina, sugiere

que podría tratarse de eventos relacionados. Futuros estudios de colocalización demostrarán si ambas proteínas son sintetizadas por la misma célula.

Por otro lado se sabe que el GnRH tiene efectos autocrinos/paracrinos en el ovario que abarcan desde la modulación de la esteroidogénesis basal e inducida por gonadotrofinas, hasta la inducción de la transcripción de numerosos genes involucrados en la función ovárica (Leung and Steele 1992; Cheng and Leung 2000). En estudios previos observamos que un análogo superactivo del GnRH, inhibió el desarrollo del luteoma mediante la inhibición de la secreción de las gonadotrofinas (Lux-Lantos et al., 1995) y probablemente además teniendo un efecto directo sobre el tumor (Chamson-Reig et al., 1997). Cuando se analizó el mecanismo de transducción de señales que desencadena el GnRH en el tumor, se demostró que el clásico camino de señalización de GnRH, activación de PLC, parecería estar inactivo (Chamson-Reig et al., 1999b). Considerando la complejidad del sistema de señalización de GnRH, se decidió estudiar los caminos alternativos activados por GnRH para producir sus efectos en células del luteoma. Los resultados obtenidos muestran que las fosfolipasas no son activadas (PLA_2 y PLC) o sólo marginalmente (PLD) por análogos de GnRH en células del luteoma, y los caminos de transducción de señales de la adenilil ciclasa, PKC y MAPK mediarían los efectos de GnRH en estas células. En consecuencia, mientras que la transformación del ovario en un luteoma, un tumor hiperplásico benigno, implica la pérdida de las vías clásicas de señalización de GnRH (PLC), los sistemas generadores de segundos mensajeros que se determinan en respuesta a Buserelina en estas células tampoco se asemejan a aquellos observados en tejido transformado. Esto demuestra que la señalización de GnRH varía considerablemente en diferentes tipos celulares, lo cual

hace posible una diversidad de respuestas dependiendo de los caminos de segundos mensajeros activados en cada caso.

Dado que se había propuesto que el GnRH podría tener efectos autocrinos/paracrinos en células ováricas, se determinó la expresión del RNAm de GnRH en células luteales controles y en tejido lúteo tumoral. Novedosamente, se observó presencia de RNAm tanto en tejido control como en tumores en distintos etapas de desarrollo, incluyendo estadios muy tempranos (1 semana) hasta muy tardíos (7 meses). Asimismo, en este trabajo se demuestra la expresión del RNAm y del péptido de GnRH en cultivos de células provenientes del luteoma. Por otro lado, se evidenció un efecto autorregulatorio del análogo de GnRH, Buserelina, tanto sobre la síntesis del transcripto como sobre el péptido de GnRH en células lúteas controles (SPO), constituyendo de nuestro conocimiento, la primera evidencia de un efecto autorregulatorio de GnRH sobre su propia expresión en células ováricas de rata. Curiosamente, este efecto no se observa en las células del luteoma, demostrando nuevamente alteraciones ya no sólo en la señalización de GnRH en estos tumores sino también en la regulación de su expresión. Por otro lado, tanto la expresión del RNAm como del péptido de GnRH es basalmente mayor en las células tumorales que en las células lúteas controles, lo cual podría explicar la refractariedad o falta de respuesta de las células tumorales a la estimulación con Buserelina.

En conclusión, estos hallazgos proveen evidencias que GnRH podría ser un regulador autocrino/paracrino en las células del luteoma, las cuales poseen receptores para dicho péptido, dado que estos tumores sintetizan GnRH y su expresión se encuentra basalmente

incrementada. Por lo tanto el GnRH podría estar constituyendo una parte integral de los complejos mecanismos regulatorios intratumorales que modulan la biología del tumor.

Por otro lado, dada su ubicación anatómica, el tumor se encuentra en un órgano clave presentador de antígenos del sistema inmune, el bazo. Por lo tanto, se evaluó el efecto de las drogas inmunosupresoras Ciclosporina A (CsA) y Dexametasona (Dex) sobre el desarrollo del tumor ovárico experimental, en comparación con un grupo de animales con operación ficticia (Sham). Para ello se evaluaron distintos parámetros endocrinos, inmunológicos e histológicos, sobrevida y peso del animal a lo largo del tratamiento, además del tamaño del tumor al finalizar el experimento. Los resultados indicaron que la inmunosupresión inducida por CsA o Dex, a pesar de ser efectiva sobre parámetros inmunológicos, no afectó el desarrollo tumoral. A diferencia de los animales portadores del tumor, en animales Sham la CsA indujo efectos sobre varios parámetros como por ejemplo el peso corporal, peso del timo, número de monocitos y niveles de PRL, sugiriendo la presencia de factor/es secretado/s por el tumor que impiden o compensan algunas de las acciones de CsA en estos animales.

Este tumor ovárico experimental es un modelo interesante para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo y la regulación de tumores ováricos, en especial los que desarrollan en respuesta a la hipergonadotrofinemia y presentan actividad endocrina. A través de estudios que comprenden desde el animal portador del lutcoma hasta la expresión de algunos genes en el tumor involucrados en su desarrollo, demostramos que la evolución del ovario hacia este tumor benigno involucra alteraciones, tanto a nivel celular como subcelular, en varios aspectos respecto del tejido ovárico normal.

Conclusiones generales

- El desarrollo del luteoma se produce a expensas de proliferación de células de granulosa y marcada ausencia de apoptosis.
- Estos tumores ováricos experimentales, altamente luteinizados, sintetizan las subunidades de inhibina α , βA and βB . La expresión de los RNAm de las subunidades β varía ampliamente en función del tiempo de evolución de los luteomas, correlacionando con los niveles séricos de FSH.
- Los caminos de señalización activados por GnRH en células del luteoma están marcadamente alterados con respecto a células lúteas controles.
- GnRH podría ser un regulador autocrino/paracrino en las células del luteoma, dado que estos tumores sintetizan GnRH y su expresión se encuentra basalmente incrementada.
- Las drogas inmunosupresoras Ciclosporina A y Dexametasona no modificaron el desarrollo del tumor ovárico experimental, a pesar de ser efectivas sobre parámetros inmunológicos. Los tumores secretarían factor/es que protegerían a los animales portadores de los mismos frente a la acción de la CsA.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Parte III: Bibliografía

Listado de referencias

- Aloi,J., Dalkin,A.C., Schwartz,N.B., Yasin,M., Mann,B., Haisenleder,D.J., Marshall,J.C., 1995. Ovarian inhibin subunit gene expression: regulation by gonadotropins and estradiol. *Endocrinology* 136, 1227-1232.
- Amsterdam,A., Dantes,A., Liscovitch,M., 1994. Role of phospholipase-D and phosphatidic acid in mediating gonadotropin-releasing hormone-induced inhibition of preantral granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 135, 1205-1211.
- Arai,S., Vogelsang,G.B., 2000. Management of graft-versus-host disease. *Blood.Rev.* 14, 190-204.
- Arora,D.S., Cooke,I.E., Ganesan,T.S., Ramsdale,J., Manek,S., Charnock,F.M., Groome,N.P., Wells,M., 1997. Immunohistochemical expression of inhibin/activin subunits in epithelial and granulosa cell tumors of the ovary. *J.Pathol.* 181, 413-418.
- Arora,K.K., Krsmanovic,L.Z., Mores,N., O'Farrell,H., Catt,K., 1998. Mediation of cyclic AMP signaling by the first intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J.Biol.Chem.* 273, 25581-25586.
- Ashwell,J.D., Lu,F.W.M., Vacchio,M.S., 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu.Rev.Immunol.* 18, 309-345.
- Aten,R.F., Polan,M.L., Bayless,R., Behrman,H.R., 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.
- Awara,W.M., Guo,C.-H., Conn,P.M., 1996. Effects of Asn³¹⁸ and Asp⁸⁷Asn³¹⁸ mutations on signal transduction by the gonadotropin-releasing hormone receptor and receptor regulation. *Endocrinology* 137, 655-662.
- Bao,B., Calder,M.D., Xie,S., Smith,M.F., Salfen,B.E., Youngquist,R.S., Garverick,H.A., 1998. Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biol.Reprod.* 59, 953-959.
- Bauer-Dantoin,A.C., Jameson,J.L., 1995. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 136, 4432-4438.
- Bedran de Castro,J.C., Khorram,O., McCann,S.M., 1985. Possible ultra-short feedback of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the ovariectomized rat. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med* 179, 132-135.

- Behrman,H.R., Preston,S.L., Hall,A.K., 1980. Cellular mechanism of the antigonadotropic action of luteinizing hormone-releasing hormone in the corpus luteum. *Endocrinology* 107, 656-664.
- Beschorner,W.E., Divic,J., Pulido,H., Yao,X., Kenworthy,P., Bruce,G., 1991. Enhancement of thymic recovery after cyclosporine by recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor I. *Transplantation* 52, 879-884.
- Beverley,P., 1997, Immunology of cancer. In: Franks, L.M. and Teich, N.M. (eds.), Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press, New York, pp. 311-329.
- Beyer,C., Gree,S.J., Barker,P.J., Huskinsson,N.S., Hutchinson,J.B., 1994. Aromatase-immunoreactivity is localised specifically in neurons in the developing hypothalamus and cortex. *Brain Res.* 638, 203-210.
- Billig,H., Furuta,I., Hsueh,A.J.W., 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, 245-252.
- 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.
- Borgeat,P., Chavancy,G., Dupont,A., Labrie,F., Arimura,A., Schally,A., 1972. Stimulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland *in vitro* by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69, 2677-2681.
- Braden,T.D., Farnworth,P.G., Burger,H.G., Conn,P.M., 1990. Regulation of the synthetic rate of gonadotropin-releasing hormone receptors in rat pituitary cell cultures by inhibin. *Endocrinology* 127, 2387-2392.
- Bramley,T.A., Menzies,G.S., Baird,D.T., 1986. Specificity of gonadotropin-releasing hormone binding sites of the human corpus luteum: comparison with receptors of rat pituitary gland. *J.Endocrinol.* 108, 323-328.
- Brussaard,A.B., Devay,P., Leyting-Vermeulen,J.L., Kits,K.S., 1999. Changes in properties and neurosteroid regulation of GABAergic synapses in the supraoptic nucleus during the mammalian female reproductive cycle. *J.Physiol.* 516.2, 513-524.
- Calakos,N., Scheller,R.H., 1996. Synaptic vesicle biogenesis, docking and fusion: a molecular description. *Physiol.Rev.* 76, 1-29.
- Carr,B.R., 1994, Disorders of the ovaries and female reproductive tract. In: Knobil, E. and Neill, S. (eds.), The physiology of reproduction. Raven Press NY,pp. 751-817.

- Casagrande,J.T., Pike,M.C., Ross,R.K., Louie,E.W., Roy,S., Henderson,B.E., 1979. "Incessant ovulation" and ovarian cancer. *The Lancet* 2, 170-173.
- Chamson-Reig,A., 1999, Desarrollo y control de un tumor experimental de ovario: Universidad de Buenos Aires. 1-163 p.
- Chamson-Reig,A., Bianchi,M.S., Rey-Roldán,E.B., Sorianello,E., Libertun C, Lux-Lantos VA, 1999a. Development of an experimental ovarian tumor over a year in the rat. *Life Sci.* 65, 1275-1285.
- Chamson-Reig,A., Lux-Lantos,V.A.R., Tesone,M., Libertun,C., 1997. GnRH receptors and GnRH endocrine effects on luteoma cells. *Endocrine* 6, 165-171.
- Chamson-Reig,A., Pignataro,O.P., Libertun,C., Lux-Lantos,V., 1999b. Alterations in intracellular messengers mobilized by gonadotropin-releasing hormone in an experimental ovarian tumor. *Endocrinology* 140, 3573-3580.
- Cheng,K.W., Leung,P.C.K., 2000. The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 78, 1029-1052.
- Chico,A., García,J.L., Matias-Guiu,X., Webb,S.M., Rodriguez,J., Prat,J., Calaf,J., 1995. A gonadotrophin dependent stromal luteoma: a rare cause of post-menopausal virilization. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 43, 645-649.
- Childs,G., Miller,B.T., Miller,W.L., 1997. Differential effects of inhibin on gonadotropin stores and gonadotropin-releasing hormone binding sites. *Endocrinology* 138, 1577-1584.
- Choi,Y.L., Kim,H.S., Ahn,G., 2000. Immunoexpression of inhibin alpha subunit, inhibin/activin betaA subunit and CD99 in ovarian tumors. *Arch.Pathol.Lab.Med* 124, 563-569.
- Chomczynski,P., Sacchi,N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Chun,S.-Y., Billig,H., Tilly,J.L., Furuta,I., Tsafiri,A., Hsueh,A.J.W., 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135, 1845-1853.
- Church,G.M., Gilbert,W., 1984. Genome sequencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81, 1991-1995.
- Clark,B.J., Wells,J., King,S.R., Stocco,D.M., 1994. The purification, cloning and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J.Biol.Chem.* 269, 28314-28322.

- Clark,R.G., Holder,A.T., 1984. Ovarian-splenic autotransplantation: evidence that oestrogen does not inhibit hepatic somatomedin generation. *J.Endocrinol.* 103, 43-47.
- Clayton,R.N., Eccleston,L., Gossard,F., Thalbard,J.C., Morel,G., 1992. Rat granulosa cells express the gonadotrophin-releasing hormone gene: evidence from in-situ hybridization histochemistry. *J.Mol.Endocrinol.* 9, 189-195.
- Clayton,R.N., Harwood,J.P., Catt,K.J., 1979. Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282, 90-92.
- Clayton,R.N., Huhtaniemi,I.T., 1982. Absence of gonadotropin-releasing hormone receptors in human gonadal tissue. *Nature* 299, 56-59.
- Coirini,H., Flores,D., Vega,M.C., Gonzalez Deniselle,M.C., De Nicola,A.F., 1994. Binding of the anti-inflammatory steroid deflazacort to glucocorticoid receptors in brain and peripheral tissues. In vivo and in vitro studies. *J.Steroid Biochem.Molcc.Biol.* 49, 43-49.
- Cooke,I., O'Brien,M., Charnock,F.M., Groome,N., Ganesan,T.S., 1995. Inhibin as a marker for ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 71, 1046-1050.
- Coppes,M.J., Ye,Y., Rackley,R., Zhao,X.I., Liefers,G.J., Casey,G., Williams,B.R.G., 1993. Analysis of WT1 in granulosa cell and other sex cord-stromal tumors. *Cancer Res.* 53, 2712-2714.
- Cramer,D.W., Welch,W.R., 1983. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J.Natl.Cancer Inst.* 71, 717-721.
- Damoiseaux,J.G.M.C., Beijleveld,L.J.J., van Brenda Vriesman P.J.C., 1997. Multiple effects of cyclosporin A on the thymus in relation to T-cell development and autoimmunity. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 82, 197-202.
- Davis,J.S., West,L.A., Farese,R.V., 1986. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphates and diacylglycerol in rat granulosa cells: further evidence for the involvement of Ca^{2+} and protein kinase C in the action of GnRH. *Endocrinology* 118, 2561-2571.
- Davis,S., Burger,H.G., Robertson,D.M., Farnworth,P.G., Carson,R.S., Krozowsky,Z., 1988. Pregnant mare's serum gonadotropin stimulates inhibin subunit gene expression in the immature rat ovary: dose response characteristics and relationships to serum gonadotropins, inhibin and ovarian steroid content. *Endocrinology* 123, 2399-2407.
- De Bosscher,K., Shmitz,M.L., Vanden Berghe,W., Plaisance,S., Fiers,W., Haegeman,G., 1997. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappa B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94, 13504-13509.

- del Punta,K., Charreau,E., Pignataro,O.P., 1996. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137, 5337-5343.
- DePaolo,L.V., King,R.A., Carrillo,A.J., 1987. *In vivo* and *in vitro* examination of an autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 120, 272-279.
- DeSombre,E.R., Arbogast,L.Y., 1974. Effect of the antiestrogen CI628 on the growth of rat mammary tumors. *Cancer Res.* 34, 1971-1974.
- Dharmarajan,A.M., Goodman,S.B., Tilly,K.I., Tilly,J.L., 1994. Apoptosis during functional corpus luteum regression: evidence of a role for chorionic gonadotropin in promoting luteal cell survival. *Endocrine* 2, 295-303.
- Dharmarajan,A.M., Hisheh,S., Singh,B., Parkinson,S., Tilly,K.I., Tilly,J.L., 1999. Antioxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum in vitro: a novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology* 140, 2561
- Dong,K.-W., Yu,K.-L., Roberts,J.L., 1993. Identification of a major upstream transcription start site for the human progonadotropin-releasing hormone gene used in reproductive tissues and cell lines. *Mol.Endocrinol.* 7, 1654-1666.
- Dykema,J.C., Mayo,K.E., 1994. Two messenger ribonucleic acids encoding the common β B-chain of inhibin and activin have distinct 5'-initiation sites and are differentially regulated in rat granulosa cells. *Endocrinology* 135, 702-711.
- Eckstein,N., Eshel,A., Eli,Y., Ayalon,D., Naor,Z., 1986. Calcium-dependent actions of gonadotropin-releasing hormone agonist and luteinizing hormone upon cyclic AMP and progesterone production in rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 47, 91-98.
- Emons,G., Müller,V., Ortmann,O., Schultz,K.D., 1998. Effects of LHRH-analogs on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J.Steroid.Biochem.Molec.Biol.* 65, 199-206.
- Emons,G., Müller,V., Ortmann,O., Trautner,U., von Stuckrad,B., Schultz,K.D., Schally,A.V., 1996. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *International Journal of Oncology* 9, 1129-1137.
- Erämaa,M., Hildén,K., Tuuri,T., Ritvos,O., 1995. Regulation of inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) by activin A and expression of activin receptor mRNAs in cultured human granulosa-luteal cells. *Edocrinology* 136, 4382-4389.

- Erämaa,M., Ritvos,O., 1996a. Prostaglandin E2 induces inhibin alpha- and beta-subunit mRNA and secretion of dimeric inhibin A in cultured human granulosa-luteal cells. *Mol.Hum.Reprod* 2, 815-822.
- Erämaa,M., Ritvos,O., 1996b. Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 induce inhibin and activin beta B-subunit messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Fertility and Sterility* 65, 954-960.
- Esch,F.S., Shimasaki,S., Cooksey,K., Mercado,M., Mason,A.J., Ying,S., Ueno,N., Ling,N., 1987. Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rat ovarian inhibins. *Mol.Endocrinol.* 1, 388-396.
- Esquifino,A.I., Moreno,M.L., Agrasal,C., Villanúa,M.A., 1995. Effects of cyclosporine on ovarian function in sham-operated and pituitary-grafted young female rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 208, 397-403.
- Fahy,P.A., Wilson,C.A., Beard,A.J., Groome,N.P., Knight,P.G., 1995. Changes in inhibin-A (α - β A dimer) and total α inhibin in the peripheral circulation and ovaries of rats after gonadotrophin-induced follicular development and during the normal oestrous cycle. *J.Endocrinol.* 147, 271-283.
- Fang,J., Yin,W., Smiley,E., Wang,S., Bonadio,J., 1996. Molecular cloning of the mouse activin beta E subunit gene. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 21, 669-674.
- Farnworth,P.G., Robertson,D.M., de Kretser,D.M., Burger,H.G., 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.
- Fauci,A.S., Dale,D.C., Balow,J.E., 1976. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann.Intern.Med.* 84, 304-315.
- Fels,E., Foglia,V.G., 1960. El factor hipofisario en la tumorogenesis experimental del ovario. *Acta Physiol.Latinoamer.* 10, 28-30.
- Findlay,J.K., 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol.Reprod.* 48, 15-23.
- Findlay,J.K., Drummond,A.E., Britt,K.L., Dyson,M., Wreford,N.G., Robertson,D.M., Groome,N.P., Jones,M.E., Simpson,E.R., 2000. The roles of activins, inhibins and estrogens in early committed follicles. *Mol Cell Endocrinol* 163, 81-87.
- Foreman,D.F., Wilder,M., 1995. Inhibin is present in the corpus luteum of pseudopregnant rats and can interact with progesterone to inhibit resumption of estrous cycles. *Endocr.Res.* 21, 595-614.
- Fraser,H.M., Lunn,S.F., 1993. Does inhibin have an endocrine function during the menstrual cycle? *Trends Endocrinol.Metab.* 4, 187-194.

- Fraser,H.M., Lunn,S.F., Cowen,G.M., Saunders,P.T., 1993. Localization of inhibin/activin subunit mRNAs during luteal phase in the primate ovary. *J.Mol.Endocrinol.* 10, 257
- Fricke,P.M., al-Hassan,M.J., Roberts,A.J., Reynolds,L.P., Redmer,D.A., Ford,J.J., 1997. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. *Domestical Animals Endocrinology* 14, 171-180.
- Fritz,S., Grünert,R.A., Stocco,D.M., Hales,D.B., Mayerhofer,A., 2001a. StAR protein is increased by muscarinic receptor activation in human luteinized granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 171, 49-51.
- Fritz,S., Wessler,I., Breitling,R., Rossmanith,W.G., Ojeda,S.R., Disson,G.A., Amsterdam,A., Mayerhofer,A., 2001b. Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86, 354
- García-Bunuel,R., Brandes,D., 1976. Luteoma of pregnancy: ultrastructural features. *Hum.Pathol.* 7, 205-214.
- Gonzalez-Robaina,I.J., Alliston,T.N., Buse,P., Firestone,G.L., Richards,J.S., 1999. Functional and subcellular changes in the A-kinase-signalling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Molecular Endocrinology* 13, 1318-1337.
- Goubau,S., Bond,C.T., Adelman,J.P., Misra,V., Hynes,M.F., Schultz,G.A., Murphy,B.D., 1992. Partial characterization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcript in the rat ovary. *Endocrinology* 130, 3098-3100.
- Granot,I., Dekel,N., 1994. Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone. *J.Biol.Chem.* 269, 30502-30509.
- Grazul-Bilska,A.T., Redmer,D.A., Bilski,J.J., Jablonka-Shariff,A., Doraiswamy,V., Reynolds,L.P., 1998. Gap junctional proteins, connexin 26, 32, and 43 in sheep ovaries throughout the estrous cycle. *Endocrine* 8, 269-279.
- Groome,N.P., Illingworth,P., O'Brien,M., Pai,R., Rodger,F., Mather,J., McNeilly,A.S., 1996. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 81, 1401-1405.
- Grosse,J., Bulling,A., Brucker,C., Berg,U., Amsterdam,A., Mayerhofer,A., Gratzl,M., 2000. Synaptosome associated protein of 25 kDa (SNAP-25) in oocytes and steroid producing cells of the rat and human ovary: Molecular analysis and regulation by gonadotrophins. *Biol.Reprod.* 63, 643-650.

- Gründker,C., Gündhert,A.R., Westphalen,S., Emons,G., 2002. Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *European Journal of Endocrinology* 146, 1-14.
- Gründker,C., Schlotawa,L., Viereck,V., Emons, 2001a. Protein kinase C-independent stimulation of activator protein-1 and c-Jun N-terminal kinase activity in human endometrial cancer cells by the LHRH agonist triptorelin. *Eur.J. Endocrinol.* 145, 651-658.
- Gründker,C., Völker,P., Emons,G., 2001b. Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein α -mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 142, 2369-2380.
- Haisenleder,D.J., Cox,M.E., Parsons,S.J., Marshall,J.C., 1998. Gonadotropin-releasing hormone pulses are required to maintain activation of mitogen-activated protein kinase: role in stimulation of gonadotrope gene expression. *Endocrinology* 139, 3104-3111.
- Han,X.-B., Conn,P.M., 1999. The role of protein kinases A and C pathways in the regulation of mitogen-activated protein kinase activation in response to gonadotropin-releasing hormone receptor activation. *Endocrinology* 140, 2241-2251.
- Harwood,J.P., Clayton,R.N., Catt,K.J., 1980. Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. I. Properties and inhibition of luteal cell function. *Endocrinology* 107, 407-413.
- Hayes,M.C., Scully,R.E., 1987. Stromal luteoma of the ovary: a clinicopathological analysis of 25 cases. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 6, 313-321.
- Hedger,M.P., Drummond,A.E., Robertson,D.M., Risbridger,G.P., de Kretser,D.M., 1989. Inhibin and activin regulate [3 H] thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 61, 133-138.
- Hickey,G.J., Krasnow,J.S., Beattie,W.G., Richards,J.S., 1990. Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Mol.Endocrinol.* 4, 3-12.
- Hildebrandt,R.H., Rouse,R.V., Longacre,T.A., 1997. Value of inhibin in the identification of granulosa cell tumors of the ovary. *Hum.Pathol.* 28, 1387-1395.
- Hillier,S.G., Whitelaw,P.F., Smyth,C.D., 2001. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100, 51-54.
- Hockl,P., Sorianoello,E., Chamson-Reig,A., Campo,S., Groome,N., Libertun,C., and Lux-Lantos,V., 2000, Inhibins and FSH in the early development of an experimental ovarian tumor: Abstract book p.60, p. 60(Abstract)

- Hojo,M., Morimoto,T., Maluccio,M., Asano,T., Morimoto,K., Lagman,M., Shimbo,T., Suthanthiran,M., 1999. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397, 530-534.
- Hotten,G., Neidhardt,H., Schneider,C., Pohl,J., 1995. Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta C chain. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 608-613.
- Imai,A., Takagi,H., Horibe,S., Fuseya,T., Tamaya,T., 1996. Couplin of gonadotropin-releasing hormone receptor to Gi protein in human reproductive tract tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 81, 3249-3253.
- 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.
- Johnson,M.S., Lutz,E.M., MacKenzie,C.J., Wolbers,W.B., Robertson,D.N., Holland,P.J., Mitchell,R., 2000. Gonadotropin-releasing hormone receptor activation of extracellular signal-regulated kinase and tyrosine kinases in transfected GH3 cells and in α T3-1 cells. *Endocrinology* 141, 3087-3097.
- Joshi,R., Dunaif,A., 1995. Ovarian disorders of pregnancy. *Endocrinol.Metab.Clin.North Am.* 24, 153-169.
- Kananen,K., Rilianawati, Pauku,T., Markkula,M., Rainio,E.-M., Huhtamiemi,I., 1997. Suppression of gonadotropins inhibits gonadal tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin α -subunit promoter/Simian virus 40 T-antigen fusion gene. *Endocrinology* 138, 3521-3531.
- Kang,S.K., Cheng,K.W., Nathwani,P.S., Choi,K.-C., Leung,P.C.K., 2000a. Autocrine role of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in ovarian cancer cell growth. *Endocrine* 13, 297-304.
- Kang,S.K., Choi,K., Cheng,K.W., Nathwani,P.S., Auersperg,N., Leung,P.C.K., 2000b. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology* 141, 72-80.
- Kang,S.K., Tai,C.-J., Cheng,K.W., Leung,P.C.K., 2002a. Gonadotropin-releasing hormone activates mitogen-activated protein kinase in human ovarian and placental cells. *Mol Cell Endocrinol* 170, 143-151.
- Kang,S.K., Tai,C.-J., Nathwani,P.S., Choi,K.-C., Leung,P.C.K., 2002b. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142, 671-679.
- Kimura,A., Ohmichi,M., Kurachi,H., Ikegami,H., Hayakawa,J., Tasaka,K., Kanda,Y., Nishio,Y., Jikihara,H., Matsuura,N., Murata,Y., 1999. Role of mitogen-activated poetin kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-

- releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res.* 59, 5133-5142.
- Kiriakidou,M., McAllister,J.M., Sugawara,T., Strauss,J.F.3., 1996. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 81, 4122-4128.
- Knecht,M., Amsterdam,A., Catt,K.J., 1981. The regulatory role of cyclic AMP in hormone-induced of granulosa cell differentiation. *J Biol Chem* 256, 10628-10633.
- Kogo,H., Kudo,A., Park,M.K., Mori,T., Kawashima,S., 1995. In situ detection of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor mRNA expression in the rat ovarian follicles. *The Journal of Experimental Zoology* 272, 62-68.
- Kol,S., Ruutiainen-Altman,K., Ben-Shlomos,I., Payne,D.W., Ando,M., Adashi,E.Y., 1997. The rat ovarian phospholipase A₂ system: gene expression, cellular localization, activity characterization, and interleukin-1 dependence. *Endocrinology* 138, 322-331.
- Koreman,S.G., Stevens,R.H., Carpenter,L.A., Robe,M., Niswender,G.D., Sherman,B.M., 1974. Estradiol, radioimmunoassay without chromatography: procedure, validation and normal values. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 38, 718-720.
- Kotsuji,F., Winters,S.J., Keeping,H.S., 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.
- Kraus,S., Naor,Z., Seger,R., 2001. Intracellular signaling pathways by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch.Med.Res* 32, 499-509.
- Kreda,S.M., Sumner,M., Fillo,S., Ribeiro,C.M., Luo,G.X., Xie,W., Daniel,K.W., Shears,S., Collins,S., Wetsel,W.C., 2001. α_1 -Adrenergic receptors mediate LH-releasing hormone secretion through phospholipases C and A₂ in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 142, 4839-4851.
- Krsmanovic,L.Z., Martinez-Fuentes,A.J., Arora,K.K., Mores,N., Navarro,C.E., Chen,H.C., Catt,K.J., 1999. Autocrine regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 140, 1423-31.
- Krsmanovic,L.Z., Stojilkovic,S.S., Mertz,L.M., Tomic,G., Catt,K.J., 1993. Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 3908-3912.
- Kubo,T., Shimasaki,S., Kim,H., Li,D., Erickson,G.F., 1998. Activin induced inhibin alpha subunit production by rat granulosa cells requires endogenous insulin-like growth factor-I. *Biol.Reprod.* 58, 712-718.

- Kuphal,D., Janovick,J.A., Kaiser,U.B., Chin,W.W., Conn,P.M., 1994. Stable transfection of GH3 cells with rat gonadotropin-releasing hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid results in expression of a receptor coupled to cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent prolactin release via a G-protein. *Endocrinology* 135, 315-320.
- Lahav,M., West,L.A., Davis,J.S., 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.
- Lanuza,G., Groome,N., Barañao,L., Campo,S., 1999. Dimeric inhibin A and B production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells. *Endocrinology* 140, 2549-2554.
- Lapolt,P.S., Piquette,G.N., Sincich,C., Hsueh,A.J.W., 1990. Regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 127, 823-831.
- Lappohn,R.E., Burger,H.G., Bouma,J., Bangah,M., Krans,M., 1992. Inhibin as a marker for granulosa cell tumor. *Acta Obstetrica Gynecologica Scandinavica Supplements* 71, 61-65.
- Latouche,J., Crumeyrolle-Arias,M., Jordan,D., Kopp,N., Augendre-Ferraante,B., Ceddard,L., Haour,F., 1989. GnRH receptor in human granulosa cells: anatomical localization and characterization by autoradiographic study. *Endocrinology* 125, 1739-1741.
- Leung,P.C.K., Steele,G.L., 1992. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr.Rev.* 13, 476-498.
- Leung,P.C.K., Wang,J., 1989. The role of inositol lipid metabolism in the ovary. *Biol.Reprod.* 40, 703-708.
- Li,D., Kubo,T., Kim,H., Shimasaki,S., Erickson,G.F., 1998. Endogenous insulin-like growth factor-I is obligatory for stimulation of rat inhibin alpha subunit expression by follicle-stimulating hormone. *Biol.Reprod.* 58, 219-225.
- Libertun,C., 1980, Radioinmunoanálisis. Buenos Aires, Lopez Libreros,
- Limonta,P., Moretti,R.M., Montagnani Marelli,M., Dondi,D., Parenti,M., Motta,M., 1999. The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology* 140, 5250-5256.
- Lin,D., Sugawara,J., Strauss,J.F.3., Clark,B.J., Stocco,D.M., Saenger,P., Rogol,A., Miller,W.L., 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science.* 267, 1828-1831.

- Lin,X., Janovick,J.A., Conklin,D., 1998. Mutations at the consensus phosphorylation sites in the third intracellular loop of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor: effect on receptor ligand binding and signal transduction. *Biol.Reprod.* 59, 1470-1476.
- Liscovitch,M., Amsterdam,A., 1989. Gonadotropin-releasing hormone activates phospholipase D in ovarian granulosa cells. *J.Biol.Chem.* 264, 11762-11767.
- Lison,L., 1976, Datos enumerativos. Comparación de proporciones. In: *Estadística aplicada a la biología experimental*. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, pp. 307-327.
- Loveland,K., McFarlane,J., de Kretser,D.M., 1996. Expression of activin beta C subunit mRNA in reproductive tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* 17, 61-65.
- Lund,S.A., Murdoch,J., Van Kirk,E.A., Murdoch,W.J., 1999. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biol.Reprod.* 61, 388-392.
- Lux,V.A.R., Tesone,M., Larrea,G.A., Libertun,C., 1984. High correlation between prolactinemia, 125-I hLH binding and progesterone secretion by an experimental luteoma. *Life Sci.* 35, 2345-2352.
- Lux-Lantos,V.A.R., Thyssen,S.M., Chamson-Reig,A., Libertun,C., 1995. Effect of a gonadotropin releasing hormone analog on an experimental ovarian tumor: direct and indirect actions. *Life Sci.* 57, 291-300.
- Maekawa,A., 1990, Tumors of the Ovary. In: Turusov, V. and Mohr, U. (eds.), *Pathology of Tumours in Laboratory Animals*. IARC Scientific Publications, Lyon, pp. 473-497.
- Makarevich,A., Sirotkin,A., Chrenek,P., Bulla,J., Hetenyi,L., 2000. The role of IGF-1, cAMP/protein kinase A and MAP-kinase in the control of steroid secretion, cyclic nucleotide production, granulosa cell proliferation and preimplantation embryo development in rabbits. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 73, 123-133.
- Massicotte,J., Borgus,J.P., 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.
- Matzuk,M., Finegold,M., Su,J., Hsueh,A.J.W., Bradley,A., 1992. α inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360, 313-319.
- Mayerhofer,A., Garfield,R.E., 1995. Immunocytochemical analysis of the expression of gap junction protein 43 in the rat ovary. *Molecular Reproduction and Development* 41, 331-338.

- Mayo,K.E., 1994. Inhibin and activin. Molecular aspects of regulation and function. *Trends Endocrinol.Metab.* 5, 407-415.
- Meunier,H., Cajander,S., Roberts,V., Rivier,C., Sawchenko,P., Hsueh,A.J.W., Vale,W., 1988. Rapid changes in the expression of inhibin α , β A and β B subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol.Endocrinol.* 2, 1352-1363.
- Minaretzis,D., Jakubowski,M., Mortola,J.F., Pavlou S.N., 1995. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 80, 430-434.
- Minegishi,T., Leung,P.C.K., 1985. Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates arachidonic acid release in rat granulosa cells. *Endocrinology* 117, 2001-2007.
- Minegishi,T., Wang,J., Leung,P.C.K., 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.
- Mizutani,T., Sonoda,Y., Minegishi,T., Wakabayashi,K., Miyamoto,K., 1997. Molecular cloning, characterization and cellular distribution of rat steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the ovary. *Life Sci.* 61, 1497-1506.
- Mukherjee,A., Urban,J., Sassone-Corsi,P., Mayo,K.E., 1998. Gonadotropins regulate inducible cyclic adenosine 3',5'-monophosphate early repressor in the ovary: implications for inhibin alpha subunit gene expression. *Mol.Endocrinol.* 12, 785-800.
- Murphy,P., Alexander,P., Senior,P.V., Fleming,J., Kirkham,N., Taylor,I., 1988. Mechanisms of organ selective tumour growth by bloodborne cancer cells. *British Journal of Cancer* 57, 19-31.
- Naor,Z., Catt,K.J., 1981. Mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone: involvement of phospholipid turnover in luteinizing hormone release. *J.Biol.Chem.* 256, 2226-2229.
- Naor,Z., Outhiriaradjou,B., Seger,R., 2000. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol.Metab.* 11, 91-99.
- Nelson,S.E., McLean,M.P., Jayatilak,P.G., Gibori,G., 1992. Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology* 130, 954-966.
- Netiv,E., Liscovitch,M., Naor,Z., 1991. Delayed activation of phospholipase D by gonadotropin-releasing hormone in a clonal pituitary gonadotrope cell line (α T3-1). *FEBS Lett.* 295, 107-109.

- Nicholson,R.I., Turkes,W.A., Dyas,L., Plowman,P.N., Williams,M., Blamey,R.W., 1985. Endocrinological and clinical aspects of LHRH action (ICI 118630) in hormone dependent breast cancer. *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* 23, 834-847.
- Niswender,G.D., Juengel,J.L., McGuire,W.J., Belfiore,C.J., Wiltbank,M.C., 1994. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol.Reprod.* 50, 239-247.
- Niswender,G.D., Juengel,J.L., Silva,P.J., Rollyson,M.K., McIntush,E.W., 2000. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol.Rev.* 80,
- Niswender,G.D., Midgley,A.R., Monroe,S.E., Reichert,L.E., 1968. Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH-131-l. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 128, 807-811.
- Nogales,F.F., Concha,A., Plata,C., Ruiz-Avila,I., 1993. Granulosa cell tumor of the ovary with diffuse true hepatic differentiation simulating stromal luteinization. *Am J Surg Pathol* 17, 85-90.
- Ochsenbein,A.F., Sierro,S., Odermatt,B., Pericin,M., Karrer,U., Hermans,J., Hemmi,S., Hengartner,H., Zinkernagel,R.M., 2001. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411, 1058-1064.
- Oda,S., Nishimatsu,S., Murakami,K., Ueno,N., 1995. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun* 210, 581-588.
- Ogawa,K., Kurohmaru,S., Shiota,K., Takahashi,M., Nishida,T., Hayashi,Y., 1991. Histochemical localization of inhibin and activin alpha, beta A and beta B subunits in rat gonads. *J.Vet.Med.Sci.* 53, 207-212.
- 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.
- Oikawa,M., 1991. Detection of gonadotropin releasing hormone (GnRH) messenger RNA in the ovary and cloning of LH, chorionic gonadotropin (CG) receptor. *Hokkaido Igaku Zasshi* 66, 749-757.
- Oikawa,M., Dargan,C., Ny,T., Hsueh,A.J., 1990. Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymiosin- α messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 127, 2350-2356.
- Olofsson,J.I., Conti,C.C., Leung,P.C.K., 1995. Homologous and heterologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in preovulatory rat granulosa cells. *Endocrinology* 136, 974-980.

- Omata,K., Abraham,N., Schwartzman,M., 1992. Renal cytochrome P-450-arachidonic acid metabolism: localization and hormonal regulation in SHR. *Am J.Physiol.* 262, F591-F599
- Orlicky,D.J., Fisher,L., Dunscomb,N., Miller,G.J., 1992. Immunohistochemical localization of PGF2 α receptor in the rat ovary. *Prostaglandins* 46, 223-229.
- Oyler,G.A., Higgins,G.A., Hart,R.A., Battenberg,E., Billingsley,M., Bloom,F.E., Wilson,M.C., 1989. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neural subpopulations. *J.Cell Biol.* 109, 3039-3052.
- O'Shaughnessy,P.J., Gray,S.A., 1995. Gonadotropin-dependent and gonadotropin-independent development of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels in the mouse ovary. *Endocrinology* 136, 2060-2065
- Palmquist Evans,M., Webb,M.J., Gaffey,T.A., Katzmman,J.A., Suman,V.J., Hu,T.C., 1995. DNA ploidy of ovarian granulosa cell tumors. *Cancer* 75, 2295-2298.
- Pellegrini,I., Lebrun,J.-J., Ali,S., Kelly,P.A., 1992. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol.Endocrinol.* 6, 1023-1031.
- Peng,C., Fan,N.C., Ligier,M., Väänänen,J., Leung,P.C.K., 1994. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 135, 1740-1746.
- Pieper,D.R., Richards,J.S., Marshall,J.C., 1981. Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology* 108, 1148-1155.
- Pinter,J.H., Janovick,J.A., Conn,P.M., 1999. Gonadotropin-releasing hormone receptor concentration differentially regulates intracellular signaling pathways in GGH3 cells. *Pituitary* 2, 181-190.
- Piontkewitz,Y., Sundfeldt,K., Hedin,L., 1997. The expression of c-myc during follicular growth and luteal formation in the rat ovary in vivo. *J.Endocrinol.* 152, 395-406.
- Popkin,R., Bramley,T.A., Currie,A., Shaw,R.W., Baird,D.T., Fraser,H.M., 1983. Specific binding of luteinizing hormone releasing hormone to human luteal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 114, 750-756.
- 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.
- Ranta,T., Knecht,M., Kody,M., Catt,K.J., 1982. GnRH receptors in cultured rat granulosa cells: mediation of the inhibitory and stimulatory actions of GnRH. *Mol Cell Endocrinol* 27, 233-240.

- Rao,R.B., Slotman,B., 1991. Endocrine Factors in Common Epithelial Ovarian Cancer. *Endocrine Reviews* 12, 14-26.
- Reiss,N., Llevi,L.N., Shacham,S., Harris,D., Seger,R., Naor,Z., 1997. Mechanism of mitogen-activated protein kinase activation by gonadotropin-releasing hormone in the pituitary α T3-1 cell line: differential roles of calcium and protein kinase C. *Endocrinology* 138, 1673-1682.
- Richards,J.S., Hickey,G.J., Chen,S., Shively,J.E., Hall,P.F., Gaddy-Kurten,D., Kurten,R., 1987. Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity and aromatase mRNA in rat ovaria follicles and corpora lutea. *Steroids* 50, 393-409.
- Richards,J.S., Williams,J.L., 1976. Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH). Regulation by LH and PRL. *Endocrinology* 99, 1571-1581.
- Risbridger,G.P., Schmitt,J.F., Robertson,D.M., 2001. Activins and inhibins in endocrine and other tumors. *Endocrine Reviews* 22, 836-858.
- Rishi,M., Howard,L.N., Bratthauer,G.L., Tavassoli,F.A., 1997. Use of monoclonal antibody against human inhibin as a marker for sex cord-stromal tumors of the ovary. *Am.J.Surg.Pathol.* 21, 583-589.
- 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, 195-198.
- Roberts,V., Barth,S., El-Roeij,A., Yen,S.C.C., 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.
- Robertson,D.M., Hayward,S., Irby,D.C., Jacobsen,J., Clark,L., McLachlan,R.I., de Kretser,D.M., 1988. Radioimmunoassay of rat serum inhibin: Changes after PMSG stimulation and gonadectomy. *Mol Cell Endocrinol* 58, 1-8.
- Rodway,M.R., Baimbridge,K.G., Yuen,B.H., Leung,P.C.K., 1991. Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on cytosolic free calcium ion concentrations in rat luteal cells. *Endocrinology* 129, 889-895.
- Rondinone,C.M., Schillaci,R., Castillo,M.B., Roldán,A., 1991. Inhibitory Effect of 11 - hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione (Δ HOP) on lymphocyte proliferation. *Clin.Expt.Immun.* 86, 311-314.
- Rondinone,C.M., Schillaci,R., Lantos,C.P., Roldán,A., 1989. Appearance and persistence of 11-hydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione (Δ HOP) effect "in vivo". *Acta Physiol.Pharmacol.Latinoamer.* 39, 181-188.

- Ronen-Fuhrmann,T., Timberg,R., King,S.R., Hales,K.H., Hales,D.B., Stocco,D.M., Orly,J., 1998. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 139, 303-315.
- Rosado,E., Schwartz,Z., Sylvia,V.L., Dean,D.D., Boyan,B.D., 2002. Transforming growth factor-beta 1 regulation of growth zone chondrocytes is mediated by multiple interacting pathways. *Biochim.Biophys.Acta* 1590, 1-15.
- Russell,D.H., Matrisian,L., Kibler,R., Larson,D.F., Poulos,B., Magun,B.E., 1984. Prolactin receptors on human lymphocytes and their modulation by cyclosporine. *Biochem Biophys Res Commun* 121, 899-906.
- Sabharwal,P., Varma,S., 1996. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor I as an autocrine and paracrine growth factor. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 81, 2663-2669.
- Sakakibara,H., 1989. Gene expression of gonadotropin releasing hormone in the rat ovary. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 41, 1817-1822.
- Schally,A.V., Comaru-Schally,A.M., Nagy,A., Kovacs,M., Szepeshazi,K., Plonowski,A., Varga,J.L., Halmos,G., 2001. Hypothalamic hormones and cancer. *Front.Neuroendocrinol.* 22, 248-291.
- Schonborn,I., Minguillon,C., Reles,A., Bartel,U., Lichtenegger,W., 1996. Significance of PCNA proliferating fraction for prognosis of ovarian carcinoma. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 56, 357-364.
- Sekar,N., Lavoie,H.A., Veldhuis,J.D., 2000. Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 141, 3983-3992.
- Shacham,S., Cheifetz,M.N., Lewy,H., Ashkenazi,I.E., Becker,O.M., Seger,R., Naor,Z., 1999. Mechanism of GnRH receptor signalling: from the membrane to the nucleus. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 60, 79-88.
- Sheil,A.G.R., 1992. Development of malignancy following renal transplantation in Australia and New Zealand. *Transplantation Proceedings* 24, 1275-1279.
- Sigal,N.H., Dumont,F.J., 1992. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu.Rev.Immunol.* 10, 519-560.
- Sim,P.J., Wolbers,W.B., Mitchell,R., 1995. Activation of MAP kinase by the LHRH receptor through a dual mechanism involving protein kinase C and a pertussis toxin-sensitive G protein. *Mol Cell Endocrinol* 112, 257-263.

- Smith,M.A., Vale,W.W., 1981. Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on cytodex beads. *Endocrinology* 108, 752-759.
- Sokal,R.R. and Rohlf,F.J., 1995, *Biometry*. New York, Freeman,W.H. and Co,
- Somers,J.P., Benyo,D.F., Little-Ihrig,L., Zeleznik,A.J., 1995. Luteinization in primates is accompanied by loss of a 43-kilodalton adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein isoform. *Endocrinology* 136, 4762-4768.
- Sommersberg,B., Bulling,A., Salzer,U., Fröhlich,U., Garfield,R.E., Amsterdam,A., Mayerhofer,A., 2000. Gap junction communication and connexin 43 gene expression in rat granulosa cells: Regulation by FSH. *Biol.Reprod.* 63, 1661-1668.
- Sorianello,E., Fritz,S., Beyer,C., Hales,D., Mayerhofer,A., Libertun,C., Lux-Lantos,V., 2002. Development of an experimental ovarian tumor: immunocytochemical analysis. *Eur.J, Endocrinol.* in press,
- Stanislaus,D., Janovick,J.A., Brothers,S., Conn,P.M., 1997. Regulation of Gq/11 α by the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol.Endocrinol.* 11, 738-746.
- Stanislaus,D., Pinter,J.H., Janovick,J.A., Conn,P.M., 1998a. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol* 144, 1-10.
- Stanislaus,D., Ponder,S., Ji,T.H., Conn,P.M., 1998b. Gonadotropin-releasing hormone receptor couples to multiple G proteins in rat gonadotrophs and in GGH3 cells: evidence from palmitoylation and overexpression of G proteins. *Biol.Reprod.* 59, 579-586.
- Stillman,R.J., Williams,R.F., Lynch,A., Hodgen,G.D., 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, 823-828.
- Stocco,D.M., 2001. Star protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Ann.Rev.Physiol.* 63, 193-213.
- Stocco,D.M., Clark,B.J., 1997. The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 62, 29-36.
- Stojilkovic,S.S., Reinhart,J., Catt,K.J., 1994. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr.Rev.* 15, 462-499.
- Sundaresan,S., Colin,I.M., Pestell,R.G., Jameson,J.L., 1996. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C. *Endocrinology* 137, 304-311.

- Takekoshi,K., Ishii,K., Nanmoku,T., Shibuya,S., Kawakami,Y., Isobe,K., Nakai,T., 2001. Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC-dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology* 142, 4861-4871.
- Tannetta,D.S., Feist,S.A., Bleach,E.C., Groome,N.P., Evans,L.W., Knight,P.G., 1998. Effects of active immunization of sheep against an amino terminal peptide of the inhibin alpha C subunit on intrafollicular levels of activin A, inhibin A and follistatin. *J.Endocrinol.* 157, 157-168.
- Tate,S., Suganuma,N., Furuhashi,M., Ando,T., Asada,Y., Kondo,I., Kikkawa,F., Tomoda,Y., 1996. Direct effects of estradiol and tamoxifen on gene expressions of inhibin alpha- and beta A-subunits in rat granulosa cells in vitro. *Endocr.J* 43, 621-628.
- Tetsuka,M., Hillier,S.G., 2001. Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* 61, 233-239.
- Uilenbroek,J.Th.J., Durlinger,A.L., Tebar,M., Kramer,P., van Schaik,R.H., Wierikx,C.D., De Jong,F.H., 1998. Temporal changes in inhibin subunit mRNAs during stria of follicles in the rat. *J.Endocrinol.* 159, 331-340.
- Uilenbroek,J.Th.J., Tiller,R., De Jong,F.H., 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.
- Umhauer,S., Ruch,R.J., Fanning,J., 2000. Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 182, 999-1000.
- Vale,W., Bilezikjian,L.M., and Rivier,C., 1994, Reproductive and other roles of inhibins and activins. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. Ltd., New York, pp. 1861-1878.
- Valenca,M.M., Johnston,C.A., Ching,M., Negro-Vilar,A., 1987. Evidence for a negative ultrashort feedback mechanism operating on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Endocrinology* 121, 2256-2259.
- Van Nierkerk,C.C., Ramaekers,F.C., Hanselaar,a.G., Alderweireldt,J., Poels,L.G., 1993. Changes in expression of differentiation markers between normal ovarian cells and derived tumors. *Am.J.Pathol.* 142, 157-177.
- Vom Saal,F.S. and Finch,C.E., 1986, Reproductive senescence: Phenomena and mechanisms in mammals and selected vertebrates. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd., New York, pp. 2351-2413.

- Watanabe,H., Tanaka,S., Akino,T., Hasegawa-Sasaki,H., 1990. Evidence for coupling of different receptors for gonadotropin-releasing hormone to phospholipases C and A2 in cultured rat luteal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 328-334.
- Waterhouse,J., 1976, Cancer incidence in five continents. Lyons, IARC Scientific Publications, p. 15
- Webley,G.E., Marsden,P.L., Knight,P.G., 1994. Differential control of immunoreactive α -inhibin and progesterone production by marmoset luteal cells in vitro: evidence for a paracrine action of α -inhibin on basal and gonadotropin-stimulated progesterone production. *Biol.Reprod.* 50, 1394-1402.
- Whitelaw,P.F., Eidne,K.A., Sellar,R., Smith,C.D., Hillier,S.G., 1995. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology* 136, 172-179.
- Whiting,P.H., Simpson,J.G., Davidson,R.J.L., Thomson,A.W., 1983. Pathological changes in rats receiving cyclosporin A at immunotherapeutic dosage for 7 weeks. *Br.J.exp.Path.* 64, 437-444.
- Willemsen,W., Kruitwagen,R., Bastiaans,B., Hanselaar,T., Rolland,R., 1993. Ovarian stimulation and granulosa-cell tumour. *The Lancet* 341, 986-988.
- Williams,A.T., 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.
- Woodruff,T.K., Besecke,L.M., Groome,N., Draper,L.B., Schwartz,N.B., 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.
- Woodruff,T.K., D'Agostino,JB., Schwartz,N., Mayo,K.E., 1988. Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science*. 239, 1296-1299.
- Woodruff,T.K., Meunier,H., Jones,P.B.C., Hsueh,A.J.W., Mayo,K.E., 1987. Rat inhibin: molecular cloning of α - and β -subunit complementary deoxyribonucleic acids and expression in the ovary. *Mol.Endocrinol.* 1, 561-568.
- Woody,M.A., Welniak,L.A., Sun,R., Tian,Z.G., Henry,M., Richards,S., Raziuddin,A., Longo,D.L., Murphy,W.J., 1999. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. *Exp.Hematol.* 27, 811-816.
- Yamashita,K., Yamoto,M., Shikone,T., Minami,S., Nakano,R., 1999. Immunohistochemical localization of inhibin and activin subunits in human epithelial ovarian tumors. *Am J Obstet Gynecol* 180, 316-322.

- Yen,S.S.C., 1980. The polycystic ovary syndrome. *Clin.Endocrinol.* 12, 177-208.
- Yohkaichiya,T., O'Connor,A., de Kretser,D.M., 1991. Circulating immunoreactive inhibin, gonadotropin, and prolactin levels during pregnancy, lactation, and postweaning estrous cycle in the rat. *Biol.Reprod.* 44, 6-12.
- Yoshimura,Y., 1998. Insulin-like growth factors and ovarian physiology. *J.Obstet.Gynaecol.Res.* 24, 305-323.
- Yu,P.Y., Eisner,G.M., Yamaguchi,I., Mouradian,M.M., Felder,R.A., Jose,P.A., 1996. Dopamine D1A receptor regulation of phospholipase C isoform. *J.Biol.Chem.* 271, 19506-19508.
- Yuan,W., Giudice,L.C., 1997. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 82, 3148-3155.
- Zheng,L., Stojilkovic,S.S., Hunyady,L., Krsmanovic,L.Z., Catt,K.J., 1994. Sequential activation of phospholipase C and phospholipase D in agonist-stimulated gonadotrophs. *Endocrinology* 134, 1446-1454.
- Zinkernagel,R.M., Ehl,S., Aichele,P., Oehen,S., Kündig,T., Hengartner,H., 1997. Antigen localisation regulates immune response in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunological Reviews* 156, 209