

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Análisis del efecto de la expresión y activación de los receptores de Gonadotropinas (hFSHR y hLHR) sobre el Receptor membranal para estrógenos (GPER) en una línea celular de cáncer de ovario.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:
ISIS SANTOS PANIAGUA

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA.
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

COMITÉ TUTORAL:

DR. MARCO ALLÁN PÉREZ SOLIS.
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DR. JOSÉ GERARDO PERERA MARÍN (FMVZ-UNAM)

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortes
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Dra. Lucía Rangel Porta
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Dra. Cristina Aleida Olivares segura.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Dra. María del Carmen Méndez Herrera
Facultad de Medicina

Dra. Elsa de la Chesnaye Caraveo
Instituto Mexicano del Seguro Social

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al posgrado de Ciencias de la Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme las puertas al conocimiento.

A mi tutora Dra. Aleida Olivares Segura, por confiar en mí, brindarme la oportunidad de trabajar y aprender a su lado, por su enorme paciencia.

A mi Comité Tutorial al Dr. Marco allán Perez Solis y al Dr. José Gerardo Perera por el tiempo dedicado al revisión de este proyecto y a la discusión de su contenido.

Al Dr Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortés, Dra. Lucía Rangel Porta, Dra. Elsa Verónica de la Chesnaye Caraveo y Dra. María del Carmen Méndez Herrera, por ayudarme a mejorar el contenido de éste trabajo.

A la Dra. Laura Díaz Cueto, el Dr. Fabián Arechavaleta Velasco y la Dra. Patricia Casas González, por su asesoría para enriquecer el contenido de éste trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de la maestría (número de registro de becario: 492151)

Al Fondo de Investigación en Salud del IMSS, por la beca otorgada para la realización de la maestría (N° de registro: R-2012-3606-267) y a la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS (matricula de becario:99096716).

DEDICATORIA.

A mis padres Lucila e Isais, a mis hermanos Caridad, Saraí, Said, Yadira quienes, como una familia siempre unida, han estado acompañándome en esta aventura que es la vida, apoyándome, enseñándome, escuchándome, ayudándome y levantándome en su momento y que gracias a eso, pero sobre todo a su cariño y amor incondicional hoy sigo de pie, dispuesta a seguir luchando porque sé que siempre estarán a mi lado. Los amo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Ovario.....	3
1.1.1. Anatomía e Histología del ovario.....	3
1.1.2. Funciones del ovario.....	3
1.1.2.1. Gametogénesis.....	4
1.1.2.2. Función endócrina	6
1.2. CÁNCER DE OVARIO.....	6
1.2.1. Epidemiología del cáncer de ovario.....	6
1.2.2. Estadificación del cáncer de ovario	8
1.2.3. Clasificación histopatológica del cáncer de ovario	8
1.2.3.1. Tumores epiteliales ováricos	10
1.2.3.2. Tumores de células germinales.....	11
1.2.3.3. Tumores de los cordones sexuales.....	11
1.3. TRANSFORMACIÓN DEL EPITELIO SUPERFICIAL OVARICO (OSE)	13
1.3.1. Teoría de la ovulación incesante	13
1.3.2. Teoría de la inflamación	14
1.3.3. Teoría de las gonadotropinas	15
1.4. GONADOTROPINAS	16
1.4.1. Receptores de gonadotropinas.....	16
1.4.2. Receptores de gonadotropinas en el cáncer de ovario	18
1.4.3. Señalización de las gonadotropinas en el cáncer de ovario	19
1.5. ESTRÓGENOS.....	21
1.5.1. Receptores de estrógenos clásicos.....	22
1.5.2. Receptores de estrógenos en cáncer de ovario	23
1.6. RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ACOPLADO A PROTEÍNAS G (GPR30/GPER)	24
1.6.1. Señalización intracelular de GPER	26
1.6.2. GPER en el cáncer ovario.....	27
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo General	31
3.2. Objetivos Particulares.....	31
4. HIPÓTESIS	32

5. MATERIAL Y MÉTODOS	33
5.1. Cultivo celular	33
5.2. Preparaciones hormonales; Gonadotropinas recombinantes (r-hFSH y r-hLH)	33
5.3. Estimulo con gonadotropinas recombinantes	34
5.4. Cuantificación de AMPc	34
5.5. Extracción de RNA de los cultivos celulares	35
5.6. Transcripción reversa	36
5.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final	37
5.8. Secuenciación	37
5.9. Extractos protéicos e inmunodetección	38
5.9.1. Extracto protéico de GPER	38
5.9.2. Cuantificación de proteínas	39
5.9.3. Inmunodetección GPER	39
5.9.4. Extracto protéico de hFSHR y hLHR	40
5.9.5. Inmunodetección hFSHR y hLHR	40
5.9.6. Extractos nucleares	41
5.9.7. Inmunodetección de ER α y Ki-67	42
5.10. Ensayo de proliferación	43
5.11. Ensayo de viabilidad	44
5.12. Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS	46
6.1. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE GONADOTROPINAS EN LA LÍNEA CELULAR OVCAR-3	46
6.1.1. Expresión del RNAm de los receptores hFSHR y hLHR en la línea celular OVCAR-3	46
6.1.2. Inmunodetección de los receptores de hFSHR y hLHR en la línea celular OVCAR-3	46
6.1.3. La activación de los receptores con r-hFSH y r-hLH provocó una respuesta dosis dependiente en la acumulación de AMPc en las células OVCAR-3.	48
6.2. EXPRESION DEL RECEPTOR GPER EN LA LINEA CELULAR OVCAR-3	48
6.2.1. Integridad del RNA total obtenido de la línea celular OVCAR-3 con los estímulos de r-hFSH y r-hLH	49
6.3. REGULACIÓN DEL RECEPTOR GPER POR r-hFSH y r-hLH	50
6.3.1. La expresión del RNAm de GPER es regulada a la alta por la r-hFSH en la línea celular OVCAR-3	50
6.3.2. La expresión de la proteína del GPER es regulada a la alta por la r-hFSH en la línea celular OVCAR-3	51
6.3.3. La expresión del RNAm de GPER no esta regulada por r-hLH en la línea celular OVCAR-3. .	52
6.3.4. La expresión de la proteína del GPER es regulada a la baja por la r-hLH en la línea celular OVCAR-3	53
6.4. EXPRESIÓN DEL ERα, CON ESTÍMULO DE r-hFSH y r-hLH	54
6.4.1. El tratamiento con r-hFSH aumenta la expresión de la proteína ER α , mientras que la r-hLH disminuye su expresión a las 48 horas de estímulo.	54
6.5. PROLIFERACIÓN CELULAR CON EL ESTÍMULO DE r-hFSH y r-hLH	55
6.5.1. El tratamiento con r-hFSH provocó un incremento en la proliferación en las células OVCAR-3 a las 48 h de estímulo	55
6.5.2. El tratamiento con r-hLH provocó una disminución de la proliferación en las células OVCAR-3 a las 24 y 48 h de estímulo.	56

6.6	EXPRESION DE Ki-67 CON LOS ESTIMULOS DE r-hFSH y r-hLH	57
6.6.1.	El tratamiento con r-hFSH aumenta la expresión de la proteína del Ki-67, mientras que la r-hLH disminuye su expresión a las 48 h en la línea celular OVCAR-3.	57
6.7.	VIABILIDAD CELULAR DE OVCAR-3 CON LOS ESTIMULOS DE r-hFSH y r-hLH .	58
7.	DISCUSIÓN.....	59
8.	CONCLUSIONES.....	66
9.	REFERENCIAS.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación del cáncer de ovario de acuerdo a la FIGO	9
Tabla 2. Acciones de GPER.....	25
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Derivación de neoplasias ováricas	10
Figura 2. Transformación del OSE	14
Figura 3. Señalización de las gonadotropinas en el cáncer de ovario.....	21
Figura 4. Estructura de los ERs	22
Figura 5. Vías de señalización activadas por GPER y ERs.....	26
Figura 6. Patrón de expresión de los receptores de gonadotropinas en la línea celular OVCAR-3.....	47
Figura 7. Inmunodetección de los receptores de gonadotropinas	47
Figura 8. Acumulación de AMPc con el estímulo de r-hFSH y r-hLH en la línea celular OVCAR-3.....	48
Figura 9. Patrón de expresión de GPER en la línea celular OVCAR-3	49
Figura 10. Patrón de integridad del RNA obtenido de la línea celular OVCAR-3 estimulada con gonadotropinas.....	49
Figura 11. RT-PCR de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH	50
Figura 12. Inmunodetección de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH	51
Figura 13. RT-PCR de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH.....	52
Figura 14. Inmunodetección de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH ...	53
Figura 15. Inmunodetección del ER α en células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH y r-hLH	54
Figura 16. Ensayo de proliferación en las células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH.	55
Figura 17. Ensayo de proliferación en las células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH ...	56

Figura 18. Inmunodetección de Ki-67 en células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH y r-hLH	57
Figura 19. Análisis de viabilidad en la línea celular OVCAR-3 estimuladas con gonadotropinas recombinantes	58

ABREVIATURAS

AC Adenilato Ciclasa (Adenylate Cyclase)

ACTH Hormona Adrenocorticotropa (Adrenocorticotropic Hormone)

AKT Serina/Treonina Proteína Cinasa (Serine/Threonine Protein Kinase)

ASB Albúmina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)

BRCA1 Proteína de Cáncer de Mama 1 (Breast Cancer 1)

BRCA2 Proteína de Cáncer de Mama 2 (Breast Cancer 2)

cAMP Adenosín Monofosfato-3',5' Cíclico (3'-5'-cyclic Adenosine Monophosphate)

CG Gonadotropina Coriónica (Chorionic Gonadotropin)

CREB Proteína de Unión a Elemento Regulador de cAMP (cAMP Regulatory Element Binding Protein)

DBD Dominio de Unión al DNA (DNA-Binding Domain)

DR5 Receptor de Muerte 5 (Death Receptor 5)

E₂ 17β-estradiol

ErbB2 Receptor tirosina-cinasa erb-b2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2)

EGFR Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor)

EMT Transición Epitelio-Mesénquima (Epithelial-Mesenchymal Transformation)

EOC Cáncer Epitelial Ovárico (Ovarian Epithelial Cancer)

ER Receptor de Estrógenos (Estrogen Receptor)

ERE Elementos de Respuesta a Estrógenos (Estrogen Responsive Elements)

ERα Receptor de Estrógenos Alfa (Estrogen Receptor-Alpha)

ERβ Receptor de Estrógenos Beta (Estrogen Receptor-Beta)

FIGO Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (International Federation of Gynecology and Obstetrics)

FSH Hormona Folículo Estimulante (Follicle Stimulating Hormone)

GPCR Receptor Acoplado a Proteínas G (G Protein-Coupled Receptor)

GP1R/GPR30 Receptor de Estrógenos 1 Acoplado a Proteínas G (G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1)

GTP Guanosín Trifosfato (Guanosine Triphosphate)

hFSHR Receptor de la Hormona Folículo Estimulante Humana (Human Follicle Stimulating Hormone Receptor)

hLHR Receptor de la Hormona Luteinizante Humana (Human Luteinizing Hormone Receptor)

LBD Dominio de Unión al Ligando (Ligand Binding Domain)

LDH Lactato Deshidrogenasa (Lactate Dehydrogenase)

LH Hormona Luteinizante (Luteinizing Hormone)

MAPK Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MET Transición Mesénquima-Epitelio (Mesenchymal -Epithelial Transition)

MMPs Metaloproteasas (Matrix Metalloproteinases)

OSE Epitelio Superficial Ovárico (Ovarian Surface Epithelium)

PDCD6 Proteína de Muerte Celular Programada 6 (Programmed cell death protein 6)

PI3K Fosfoinositol 3-Cinasas (Phosphatidylinositide 3-Kinases)

PKA Cinasa A de Proteínas (Protein Kinase A)

PLC Fosfolipasa C (Phospholipase C)

PR Receptor de Progesterona (Progesterone Receptor)

r-hFSH FSH Humana Recombinante (Recombinant Human FSH)

r-hLH LH Humana Recombinante (Recombinant Human LH)

TGF α Factor de Crecimiento Transformante α (Transforming growth factor alpha)

TNF Factor de Necrosis Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

TNFSF10 Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL))

VEGF Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)

RESUMEN

El cáncer de ovario se presenta frecuentemente en mujeres posmenopáusicas. En esta etapa la patología se ha correlacionado con las concentraciones elevadas de gonadotropinas. Durante la menopausia o pos-menopausia la terapia de reemplazo con estrógenos se ha asociado con un aumento en el riesgo del cáncer de ovario ya que los estrógenos son un factor mitogénico. La acción biológica de los estrógenos es a través de sus receptores ER α , ER β y el receptor para estrógenos acoplado a proteínas G (GPER), el cual media señales no genómicas en una variedad de cánceres dependientes de estrógenos. En el cáncer epitelial de ovario (CEO) la sobre expresión de GPER se ha asociado con la proliferación celular, migración, invasión y con una menor supervivencia de las pacientes. La información sobre la regulación de GPER en este tipo de cáncer es muy escasa y controversial. **Objetivo:** Analizar el efecto de la activación de los receptores hFSHR y hLHR sobre la expresión de GPER y ER α así como en la proliferación en la línea celular de cáncer de ovario OVCAR-3. **Métodos:** La expresión de hFSHR, hLHR, ER α y GPER, se comprobó mediante RT-PCR e inmunodetección. La funcionalidad de los receptores de gonadotropinas se comprobó cuantificando el AMPc después de estimular las células. Todos los ensayos se hicieron utilizando dosis crecientes de las hormonas recombinantes (r-hFSH y r-hLH) a las 24 y 48 h, las cuales no causaron un efecto citotóxico. Para evaluar si existía regulación de las gonadotropinas sobre la expresión de GPER, la línea celular OVCAR-3 se estimuló con r-hFSH y r-hLH de manera independiente y se extrajo RNAm y proteína. Se evaluó la proliferación celular con el estuche XTT. **Resultados:** A las 48 h la r-hFSH incrementó el RNAm y la proteína de GPER, mientras que la r-hLH disminuyó la expresión de la proteína de GPER, no así el ARNm correspondiente. La expresión de ER α así como la proliferación celular mostraron el mismo comportamiento diferencial con ambas gonadotropinas. **Conclusión:** Las gonadotropinas regulan de manera diferencial tanto el GPER como el ER α e influyen en la proliferación de la línea celular OVCAR-3.

Palabras claves: Cáncer ovárico epitelial, gonadotropina, Receptor de Estrógenos 1 Acoplado a Proteínas G (GPER), Receptor de Estrógenos alfa (ER α), OVCAR-3.

ABSTRACT

Ovarian cancer takes place more frequently during post-menopause, stage in which this disease is associated with higher concentrations of gonadotropins. Estrogen replacement therapy during menopause has been associated with an increased ovarian cancer risk, because estrogens are considered mitogenic factors. The biological action of estrogen take place through their receptors: Estrogen Receptor- α (ER α), Estrogen Receptor- β (ER β) and G protein-coupled Estrogen Receptor (GPER), which mediate non-genomic signals in a variety of estrogen-dependent cancers. The overexpression of GPER on epithelial ovarian cancer has been associated with cell proliferation, migration, metastasis and decrease in survival of patients. Information about the regulation of GPER in this type of cancer is insufficient and controversial. **Aim:** To analyze the effect of the activation of both human Follicle-Stimulating Hormone Receptor (hFSHR) and human Lutropin Receptor (hLHR) on the expression of GPER and ER α , as well as on cell proliferation in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. **Methods:** The expression of hFSHR, hLHR, ER α and GPER was confirmed by RT-PCR and western blot. The functionality of the gonadotropins receptors was confirmed by quantitating cyclic AMP after stimulating the cells. All assays were performed using increasing doses of recombinant hormones (r-hFSH and r-hLH) at 24 and 48 hours, which did not cause any cytotoxic effect. To assess gonadotropins had a role in regulating the expression of GPER, the cell line OVCAR-3 was independently stimulated with r-hFSH and r-hLH, and mRNA and protein were isolated. Cell proliferation was evaluated by means of the XTT kit. **Results:** at 48 hours r-hFSH increased mRNA and protein levels of GPER whereas at 48 hours r-hLH only the protein levels but not mRNA which in fact were decreased. The expression of ER α and cell proliferation showed the same differential behavior with both gonadotropins. **Conclusion:** Gonadotropins differentially regulate GPER and ER α and directly influence cell proliferation in the OVCAR-3 cell line.

Keywords: epithelial ovarian cancer, gonadotropins, G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER), Estrogen Receptor Alpha (ER α),OVCAR-3.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ovario

1.1.1. Anatomía e Histología del ovario

Los ovarios son dos órganos ovoides aplanados en forma de almendra, sólidos y de color blanco-rosado, cada uno de los cuales mide de 2 a 3.5 cm de largo y de 1 a 1.5 cm de ancho y 1 cm de espesor. Están localizados adyacentes a la pared lateral de la pelvis y se encuentran fijados a la superficie posterior del ligamento ancho del útero a través de un pliegue peritoneal llamado mesovario. El tamaño y localización varían de acuerdo a la edad y etapa reproductiva en la que se encuentran las mujeres. Antes de la pubertad la superficie del ovario es lisa pero durante la vida fértil adquiere cada vez mayor cantidad de cicatrices y se torna irregular a causa de las ovulaciones consecutivas. En la menopausia, los ovarios involucionan a un cuarto del tamaño observado en el período fértil (1, 2).

Histológicamente en el ovario se localizan dos regiones diferentes, la corteza y la médula, la médula o región medular, está localizada en el centro del ovario y contiene el tejido conjuntivo laxo, un conjunto de vasos sanguíneos tortuosos de gran tamaño, vasos linfáticos y nervios, la segunda es la corteza o región cortical, que rodea a la médula. En el estroma de la corteza están distribuidos los folículos ováricos de diversos tamaños, cada uno con un solo oocito. La superficie del ovario está recubierta por una capa de epitelio simple cuboide, el cual recibe el nombre de epitelio superficial del ovario y está formado por células cuboides que en algunas partes son casi planas. Debajo de este epitelio hay una capa de tejido conjuntivo colágeno denso irregular, la túnica albugínea, que lo separa de la corteza subyacente (3).

1.1.2. Funciones del ovario

Los ovarios tienen dos funciones interrelacionadas, la producción de óvulos fertilizables (foliculogénesis) y la síntesis de hormonas para la reproducción

(esteroidogénesis). La foliculogénesis comienza cuando ningún folículo ha madurado ni abandonado la reserva ovárica y culmina con la producción de un solo folículo dominante durante cada ciclo menstrual (4, 5). La esteroidogénesis se refiere a la producción de esteroides sexuales principalmente la producción de estrógenos, cuya función es mantener el buen funcionamiento del sistema reproductor (6).

1.1.2.1. Gametogénesis

Al comienzo de la cuarta semana del desarrollo embrionario las células primordiales germinales (PGC, primordial germ cell) migran del epitelio celómico a las crestas gonadales. Cuando la diferenciación sexual ocurre, las PGC continúan proliferando en el ovario embrionario y se convierten en ovogonias. En la semana veinte de la gestación hay alrededor de 7 millones de ovogonias las cuales, entran a la profase meiótica, evento que marca el fin de la producción de células germinales. Cerca de la vigésima cuarta semana de gestación, ahora las células germinales son llamadas oocitos, las cuales han pasado por las primeras cuatro fases de la meiosis I y se encuentran arrestadas en diploteno. Los oocitos se encuentran rodeados por una capa de células epiteliales pregranulosas, formando así los folículos primordiales.

La disminución de las reservas ováricas ocurre durante la vida fetal. Durante la vigésima cuarta semana de gestación el número de oocitos disminuye drásticamente, de tal forma que cada ovario tiene en entre 250,000-500,000 folículos arrestados en diploteno. (7)

Durante la pubertad grupos pequeños de folículos primordiales experimentan un crecimiento y una maduración de tipo cíclico. En general la primera ovulación no ocurre hasta después de pasado un año de la menarca. Luego se establece un patrón cíclico de maduración folicular y ovulación que continua en paralelo con el ciclo menstrual. Lo normal es que un solo oocito alcance la madurez completa y sea liberado del ovario durante cada ciclo menstrual. Los folículos ováricos están formados por un oocito y la capa de epitelio circundante y desde el punto de vista histológico se puede identificar de acuerdo con su estado de desarrollo:

Folículos primordiales (etapa inicial del desarrollo folicular). Son los más predominantes en el ovario. El oocito se encuentra rodeado por una sola capa de células foliculares planas. La superficie externa de estas células está separada del tejido conjuntivo por una lámina basal.

Folículos Primarios (primera etapa en el desarrollo del folículo en crecimiento). El oocito aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas proliferan, se tornan cúbicas y luego cilíndricas. Las células foliculares adquieren un aspecto granular y ahora son llamadas células de la granulosa, que proliferan por división mitótica dando origen a la formación de un epitelio estratificado que rodea al oocito. Conforme las células de la granulosa proliferan, las células estromales perifoliculares forman una vaina de células conjuntivas, conocida como teca folicular, justo por fuera de la lámina basal. La teca folicular se diferencia en dos capas, interna y externa.

La teca interna es la capa de células secretoras muy vascularizadas completamente diferenciadas, las cuales poseen una gran cantidad de receptores de hormona luteinizante (LH). En respuesta a la estimulación por la LH sintetizan y secretan los andrógenos que son los precursores de los estrógenos.

La teca externa es la capa más superficial de células del tejido conjuntivo, contiene células musculares lisas, fibroblastos y haces de fibras colágenas.

Folículos secundarios. (Se caracterizan por tener un antro lleno de líquido). Existen varios factores que son necesarios para el crecimiento oocítico y folicular dentro de los cuales se encuentra la hormona folículo estimulante (FSH), factores de crecimiento etc. Cuando el folículo alcanza un tamaño de unos 200 μm , entre las capas de la granulosa empiezan a aparecer, pequeñas zonas irregulares llenas de líquido folicular (rico en ácido hialúronico), las cuales se fusionan y forman una cavidad única en forma de semiluna llamada antro, conformando así el folículo secundario o folículo antral.

Folículo maduro o de Graff (contiene el oocito secundario maduro) tiene un tamaño de 10mm o más, las células de la teca interna adquieren las características ultraestructurales de células productoras de esteroides. La LH estimula las células de la teca interna para que secreten andrógenos, que sirven como precursores de los estrógenos. En respuesta a la FSH las células de la granulosa catalizan la conversión de los andrógenos en estrógenos que a su vez, las estimulan para que proliferen y aumente el tamaño del folículo. Una combinación de cambios hormonales y efectos enzimáticos produce la liberación del oocito secundario en la mitad del ciclo menstrual (ovulación). Después de la ovulación comienza la fase lútea, fase que termina hasta el primer día del ciclo siguiente (8).

1.1.2.2. Función endócrina

En cuanto a la función endócrina, los ovarios secretan dos grupos principales de hormonas esteroideas; los estrógenos y los progestágenos. La función de los estrógenos, además de los múltiples efectos sistémicos, es ejercer una gran variedad de acciones críticas en el ovario. Tanto las células de la granulosa como de la teca son sitios de acción de los estrógenos. Los estrógenos regulan varias hormonas hipofisarias e hipotalámicas las cuales a su vez controlan las funciones ováricas, promueven el desarrollo folicular el cual culmina en la ovulación, incrementan la expresión de receptores para gonadotropinas e incrementan las uniones tipo *Gap* en las células de la granulosa, e inhiben la apoptosis de las células de granulosa (9). Es importante mencionar la acción de los andrógenos en el desarrollo folicular, ya que son los precursores de los estrógenos y ejercen una variedad de efectos mediados por receptores en las células de la granulosa. Los andrógenos poseen la capacidad de promover la actividad de la aromatasa estimulada por las gonadotropinas (10).

1.2. CÁNCER DE OVARIO

1.2.1. Epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario representa un importante problema de salud en México y

en el mundo. En el mundo se diagnostican 238,700 nuevos casos, de los cuales 151,900 mujeres mueren por año, ocupando así el quinto lugar en mortalidad a nivel mundial (11). Los países que tienen una mayor frecuencia son los europeos, Estados Unidos de América (EUA) y Canadá; seguidos por México, Colombia, Uruguay y Australia. En EUA, la sociedad Americana de Cáncer estimó que para el año 2013 se diagnosticarían cerca de 22,240 nuevos casos, con 14,030 defunciones, posicionando a este país con respecto al cáncer de ovario en el noveno lugar en frecuencia y la principal causa de muerte con respecto a los tumores malignos del aparato reproductivo (12). En México el cáncer de ovario ha mostrado un comportamiento sostenido con un incremento anual de 1.4% hasta el 2011 (13). Representa el 4.5% de las neoplasias ginecológicas posicionándolo como la novena causa de muerte con respecto a los tumores malignos en la mujer y la tercera causa de muerte por tumores malignos ginecológicos. El cáncer epitelial ovárico representa el 80-90% de los tumores ováricos malignos, de los cuales del 5 a 10% se encuentran dentro de los síndromes hereditarios. Se ha determinado que existen al menos dos grupos de mujeres con una predisposición genética para desarrollar cáncer de ovario. La mayoría son mujeres que pertenecen a familias con casos de cáncer de ovario y de mama que presentan mutaciones en los genes supresores de tumores BRCA 1 y BRCA 2 (14). La sobrevida a 5 años en mujeres con cáncer de ovario oscila entre el 20 y 30%. Algunos factores de riesgo que se presentan en el cáncer de ovario son; edad mayor a 60 años, menarca temprana, menopausia tardía, nuliparidad, infertilidad, entre otros; por el contrario, el uso de anticonceptivos orales, el embarazo y la lactancia son factores que reducen el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer (15, 16).

El cáncer de ovario se diagnostica generalmente en etapas avanzadas después de que la neoplasia se ha diseminado, debido principalmente a la falta de síntomas específicos en etapas tempranas, como la falta de un método de detección específico. La ubicación anatómica de los ovarios no permite sospechar de la presencia de la enfermedad en etapas tempranas, los síntomas más comúnmente referidos en etapas avanzadas son: malestar y distensión abdominal (más comunes), seguidos de sangrado vaginal, síntomas gastrointestinales y urinarios.

1.2.2. Estadificación del cáncer de ovario

Para la clasificación por etapas (estadios) de la enfermedad, el sistema que más se utiliza es el propuesto por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), la cual se basa en los hallazgos quirúrgico-patológicos y en la extensión de la enfermedad, clasificándose en estadios I, II, III y IV (Tabla 1).

1.2.3. Clasificación histopatológica del cáncer de ovario

La clasificación histogenética de los tumores ováricos consta de tres grandes categorías de acuerdo con las estructuras anatómicas en las cuales los tumores presumiblemente se originaron; a) Tumores del epitelio superficial, b) Tumores de células germinales y c) Tumores del estroma ovárico que incluye a los cordones sexuales (Figura 1) (17). Cada categoría incluye un número de subtipos y existe la combinación de subtipos los cuales son poco frecuentes y se conocen como tumores mixtos (18, 19). Las células tumorales pueden presentar diferente grado de diferenciación y en base a eso se clasifican en 4 grados: Grado I (bien diferenciado), Grado II (moderadamente diferenciado), Grado III (pobremente diferenciado), Grado IV (indiferenciado). En el caso de que estén involucradas estructuras glandulares y papilares relativas al área de crecimiento del tumor sólido se puede clasificar en 3 grados; Grado 1 corresponde a <5%, Grado 2 del 5-50% y Grado 3 >50% (20).

www.sgo.org/wp-content/uploads/2012/09/FIGO-Ovarian-Cancer-Staging_1.10.14.pdf

Tabla 1. Estadificación del cáncer de ovario de acuerdo a la FIGO (2014) www.sgo.org

ESTADIO	DESCRIPCIÓN
	Estadio I: Tumor limitado a los ovarios
IA	Tumor limitado a un ovario Cápsula intacta No hay tumores en la superficie ovárica Sin células malignas en lavados peritoneales
IB	Tumor limitado a ambos ovarios Cápsula intacta No hay tumores en la superficie ovárica Sin células malignas en ascitis y lavados peritoneales
IC	Tumor en uno o ambos ovarios: IC1 Derrame quirúrgico IC2 Ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie ovárica IC3 Células malignas en ascitis o lavados peritoneales
	Estadio II: Tumor en uno o ambos ovarios con extensión pélvica o cáncer peritoneal primario
IIA	Extensión y/o implantes en el útero y/o trompas de falopio Sin células malignas en ascitis y lavados peritoneales
IIB	Extensión a otros órganos pélvicos
	Estadio III: Tumor en uno o ambos ovarios, con implantes peritoneales fuera de la pelvis y/o metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales
IIIA	Positivo en nódulos linfáticos retroperitoneales y/o metástasis microscópica fuera de la pelvis IIIA1 Positivo solo en nódulos linfáticos retroperitoneales IIIA1 (i) Metástasis ≤ 10 mm IIIA1 (ii) Metástasis > 10 mm IIIA2 Microscópico fuera de la pelvis (arriba del borde) afectando el peritoneo ± positivo a nódulos linfáticos retroperitoneales.
IIIB	Metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis ≤ 2 cm ± positivo a nódulos linfáticos retroperitoneales. Incluye extensión a la cápsula de hígado/bazo.
IIIC	Metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis > 2 cm ± positivo a nódulos linfáticos retroperitoneales. Incluye extensión a la cápsula de hígado/bazo
	Estadio IV: Metástasis distante excluyendo metástasis peritoneal
IVA	Efusión pleural con citología positiva
IVB	Metástasis en el parénquima del hígado y/o bazo Metástasis en órganos extra-abdominales (nódulos linfáticos inguinales y nódulos linfáticos fuera de cavidad abdominal)

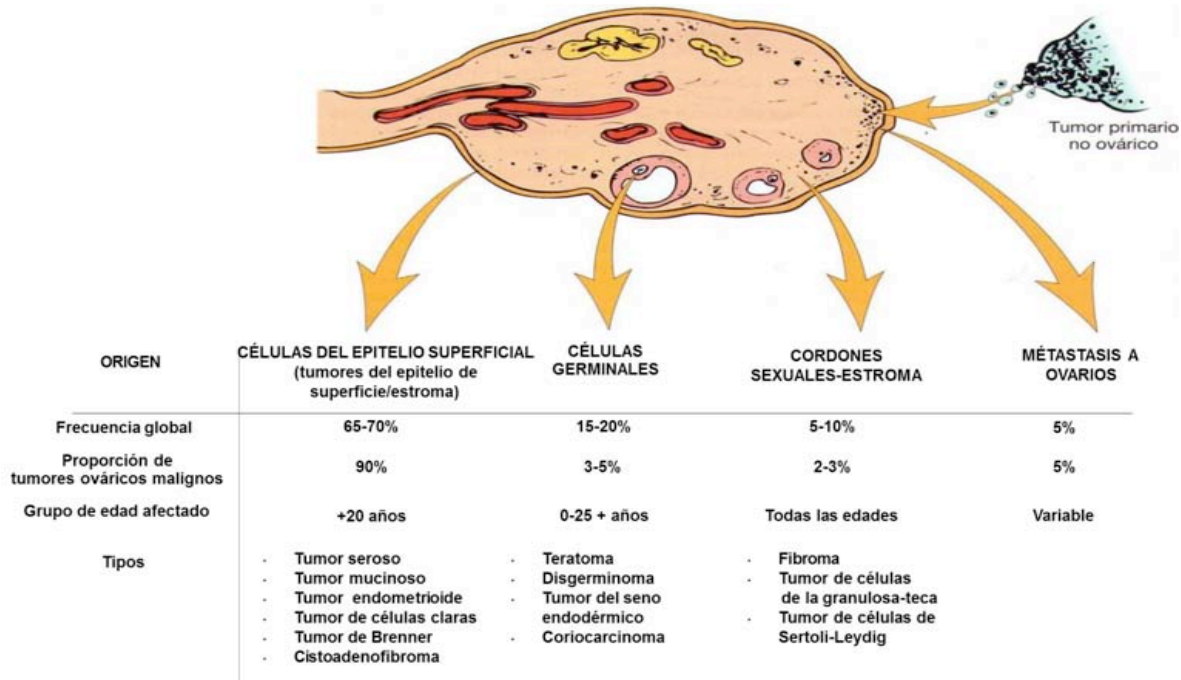


Figura 1. Derivación de varias neoplasias ováricas y algunos datos sobre su frecuencia y distribución por edad. *Tomado de Kumar y cols (21).*

1.2.3.1. Tumores epiteliales ováricos

De acuerdo a su nivel proliferativo e invasivo se clasifican en *benignos*, *limítrofes* y *malignos*. Los tumores *benignos* presentan proliferación celular escasa y un comportamiento no invasivo, los *limítrofes* tienen un bajo potencial de malignidad ya que la proliferación celular es abundante pero sin tener comportamiento invasivo y por último se clasifican como *malignos* cuando hay abundante proliferación e invasión. La mayoría de los tumores ováricos malignos son de tipo epitelial y representan aproximadamente el 60% de todos los tumores ováricos y aproximadamente el 90% de los tumores malignos de ovario, este tipo de tumores puede ser agrupados con base en la morfología celular del tumor, por lo tanto y de acuerdo a las características de las células, los tumores epiteliales de ovario se clasifican en: serosos (más comunes), mucinosos, endometrioides y los menos comunes; células claras, transicionales o de Brenner, indiferenciados y mixtos (18, 19). Este tipo de tumores epiteliales se presentan principalmente en mujeres de edad media a avanzada y son raros en mujeres jóvenes particularmente antes de la pubertad.

- *Tumores serosos*: formados por células que se asemejan a las del revestimiento interno de las trompas de Falopio. Los tumores serosos malignos constituyen un tercio de todos los tumores serosos de ovario y aproximadamente la mitad de todas las neoplasias malignas de ovario.
- *Tumores mucinosos*: formado por células que se asemejan a las del epitelio endocervical (Tipo endocervical o mülleriano) o, más frecuentemente a las del epitelio intestinal (Tipo intestinal).
- *Tumores endometrioides*: formado por células que se asemejan a las del revestimiento interno del útero (endometrio). Pueden estar asociados con la presencia aberrante de endometrio fuera del útero (endometriosis) y con crecimiento excesivo (hiperplasia) o cáncer de endometrio.
- *Tumores de células clara*: formados por células claras las cuales contienen abundante glicógeno en el citoplasma.
- *Tumores de células transicionales o de Brenner*: Son adenofibromas infrecuentes en los que el componente epitelial consiste en nidos de células transicionales similares a las que revisten la vejiga.

1.2.3.2. Tumores de células germinales

Son tumores ováricos formados por células que se cree que son derivadas de células germinales primordiales. Estos tumores representan una cuarta parte de todos los tumores ováricos pero sólo del 3-7% son malignos. Más de la mitad de todas las neoplasias que se desarrollan en niñas y adolescentes son de origen germinal. Dentro de los tumores de células germinales se encuentran los siguientes subtipos: disgerminomas, tumores del saco vitelino, carcinoma embrional, coriocarcinomas y teratomas.

1.2.3.3. Tumores de los cordones sexuales

Son tumores ováricos que se cree que se originan de las células de la teca,

células del estroma, células de la granulosa y sus homólogos de los cordones sexuales testiculares, las células de Sertoli y Leydig. Estos tumores frecuentemente están asociados con manifestaciones endocrinas. Representan aproximadamente el 8% de los tumores ováricos y aproximadamente el 7% de estos son malignos. Dentro de los tumores de cordones sexuales se encuentran los siguientes subtipos: tumores de las células de la granulosa, tecomas, fibromas, tumores de células de Sertoli, tumores de células de Sertoli-Leydig y tumores de células esteroideas.

Recientes estudios morfológicos, inmunohistoquímicos y genético moleculares han llevado a desarrollar un nuevo paradigma de la patogénesis y origen del cáncer epitelial ovárico. El paradigma esta basado en un modelo “dualista” de carcinogénesis que divide el cáncer epitelial de ovario (EOC) en 2 grandes categorías, designadas Tipo I y Tipo II. Los tumores Tipo I (confinados al ovario), son diagnosticados en estadio I generalmente, se desarrollan de tumores limítrofes y de endometriosis, este grupo esta compuesto de carcinomas de bajo grado de tipo seroso y endometroide, carcinomas de células claras, mucinosos y transicionales (Brenner). Tienen un comportamiento poco activo y poco agresivo, son genéticamente estables carecen de mutaciones en el gen *TP53* y cada tipo histológico exhibe un perfil genético molecular distintivo (22). El Tipo I se caracteriza por presentar mutaciones específicas en los genes *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A* Y *PPP2RIA* (23). Este tipo de tumores se detectan fácilmente examinación pélvica y/o ultrasonido transvaginal, constituyen solo el 25% de los cánceres de ovario y representan aproximadamente el 10% de las muertes causadas por esta neoplasias. En contraste, el grupo designado como Tipo II, incluye carcinomas intraepiteliales de las trompas de falopio los cuales, son altamente agresivos, e inestables genéticamente, presentan mutaciones en *TP53* en el 80% de los casos y tienen alteraciones moleculares en el gen *BRCA* ya sea por mutación del mismo o por metilación de su promotor; se desarrollan rápidamente y casi siempre se detectan es estadios avanzados (III o IV), este tipo de tumores incluyen el carcinoma seroso de alto grado, el carcinoma no diferenciado y los tumores mesodérmicos mixtos (carsinosarcoma). Representan aproximadamente el 75% de los cánceres de ovario y son responsables de aproximadamente el 90% de las muertes por esta enfermedad (22, 23).

1.3. TRANSFORMACIÓN DEL EPITELIO SUPERFICIAL OVARICO (OSE)

Se ha planteado que la mayoría de los cánceres epiteliales de ovario se originan de la transformación de las células epiteliales de la superficie del ovario, (OSE por sus siglas en inglés, Ovarian Surface Epithelium). El OSE esta formado por una monocapa de células inmediatas a la túnica albugínea de la cual se separan por su lamina basal. Esta monocapa celular rodea al ovario y esta en continuidad con el mesotelio peritoneal, con el cual comparte un origen embriológico común. Su desarrollo ocurre durante eventos tempranos de la embriogénesis y se deriva del epitelio celómico que recubre a las crestas gonadales (24, 25). Las células del OSE tienen una morfología que varía de un epitelio cúbico a un epitelio escamoso, presenta microvellosidades y cilios, cuentan con la presencia de desmosomas y uniones estrechas incompletas, así como la expresión de integrinas y cadherinas las cuales mantienen su organización en monocapa (26). El OSE tiene la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares en respuesta a señalizaciones ambientales, expresa proteínas típicas de células epiteliales y marcadores de células mesoteliales y mesénquimales y de células pluripotenciales. El conjunto de estas propiedades, le confieren al OSE la plasticidad de efectuar las transiciones epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) y mesénquima-epitelio (MET por sus siglas en inglés) como mecanismos que le permiten moverse durante el proceso de regeneración para reparar la herida después del daño ocasionado por la ruptura folicular. Existe la teoría de que cuando el OSE disminuye su capacidad para producir EMT puede transformarse hacia fenotipos epiteliales complejos, lo cual pudiera ocasionar una deformación metaplásica y posteriormente una transformación maligna (24, 27). Existen tres teorías inter-relacionadas que tratan de explicar la etiología del cáncer epitelial de ovario espontáneo, en donde no existe el componente hereditario, y abordan la transformación del OSE (Figura 2).

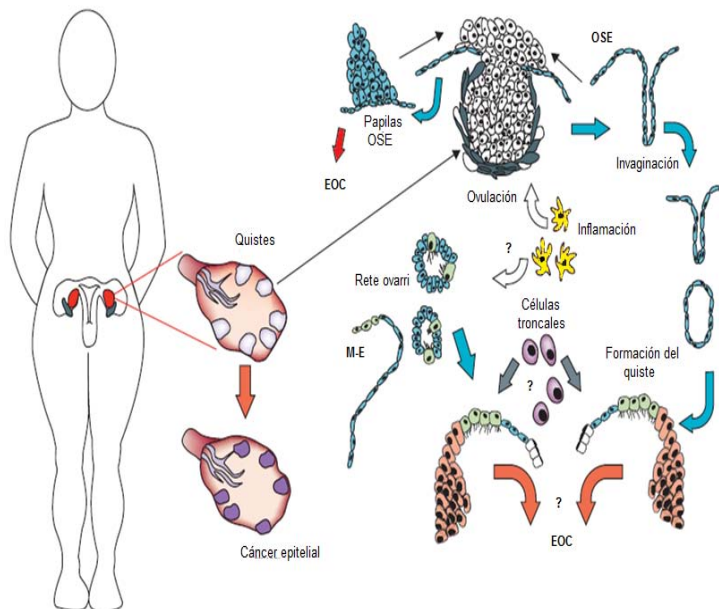
1.3.1. Teoría de la ovulación incesante

Esta teoría postula que la ovulación ininterrumpida o incesante puede predisponer a ciertas mujeres a la transformación maligna de las células epiteliales de la superficie del ovario (28). El daño constante en el epitelio ovárico durante la ovulación y la proliferación subsecuente para la reparación pos-ovulatoria del mismo, incrementan la

posibilidad de que ocurran mutaciones genómicas durante la replicación, generando la malignidad del OSE. Por mencionar algunas de estas alteraciones puede ocurrir que las células destinadas a sustituir las células perdidas o de reparación estén alteradas genéticamente con DNA no reparado, tener reacción positiva a Ki-Si indicando actividad mitótica o bien alteración en los genes supresores de tumor y oncogenes implicados en cáncer de ovario, así como una expresión de p53 menor en los quistes de inclusión que en las células epiteliales de superficie y sobre-expresión de *c-myc* en los quistes de inclusión). Los cambios mutagénicos también pueden facilitarse por la presencia de hormonas, mediadores inflamatorios y/o factores de crecimiento involucrados en el proceso ovulatorio fisiológicamente controlado (29).

1.3.2. Teoría de la inflamación

La tercer teoría sugiere que los procesos inflamatorios y los cambios en el potencial de óxido-reducción en el lugar donde se lleva a cabo la ovulación y reparación del OSE pueden ocasionar la transformación de las células y aumentar el riesgo de EOC el cual, podría aumentar si se asocia con la exposición a talco o asbesto,



endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica y paperas (30).

Figura 2. Durante la re-epitelización pos-ovulatoria, las células del OSE se dividen y migran para cubrir la lesión ovulatoria (flechas negras). La hiperplasia y transformación del OSE a adenocarcinoma puede ocurrir como resultado de varios factores, incluyendo los incrementos en las concentraciones de las gonadotropinas (flecha roja). La oleada preovulatoria de LH induce un aumento de la expresión de citocinas e invasión de macrófagos y monocitos (células amarillas), llevando a la diferenciación de células foliculares a células lúteas. La ovulación también estimula la formación de invaginaciones y quistes de inclusión. Las células del quiste pueden diferenciarse a células con características Mülllerianas y proliferar bajo el efecto

continuo de estimulación hormonal y de citocinas hasta llegar a ser ciliadas (células verdes) o secretoras (células naranja). Eventualmente, esas células acumulan aberraciones genéticas. Los túbulos rete ovarii de el hilo del ovario, pueden sufrir la transición Mesotelio a OSE (M-E) y también contener células ciliadas y secretoras que pueden crecer para formar quistes. La razón por la cual las células en ambos tipos de quiste pueden llegar a ser cancerosas es aún desconocida. El papel propuesto para las células ováricas madre o progenitoras (células púrpura) en la carcinogénesis epitelial de ovario aún no es claro. Tomado de Hennessy y cols (30)

1.3.3. Teoría de las gonadotropinas

Esta teoría postula que la exposición de las células epiteliales de superficie a altos niveles circulantes de gonadotropinas hipofisarias incrementa la posibilidad de malignización. Aunque los datos epidemiológicos no son del todo determinantes para apoyar esta teoría existe evidencia epidemiológica indirecta. En primer lugar la edad media para desarrollar cáncer epitelial ovárico (EOC por sus siglas en inglés) es de 60 años y aproximadamente el 70% de las pacientes con esta enfermedad son mujeres post-menopáusicas. Los niveles circulantes de gonadotropinas alcanzan sus picos máximos en la perimenopausia y permanecen elevados durante la edad postmenopáusica, la estimulación continua al epitelio superficial de ovario, da como resultado la acumulación de cambios genéticos y el desarrollo de carcinogénesis. Además en humanos se ha encontrado la expresión de los receptores de las gonadotropinas en células de superficie ovárica (31, 32) y en una gran proporción de cánceres epiteliales de ovario. Por otro lado, durante la gestación y la administración de anticonceptivos orales, situaciones donde están suprimidos los niveles circulantes de gonadotropinas, existe una reducción en el desarrollo de cáncer de ovario. Los mecanismos por los cuales las gonadotropinas pueden contribuir a la carcinogénesis son todavía desconocidos (26). El tratamiento con terapia de reemplazo con estrógenos por tiempo prolongado es un factor de riesgo para desarrollar EOC, mujeres que toman antiestrógenos para estimular la ovulación aumenta el riesgo de EOC por un mecanismo de retroalimentación positivo que incrementa la producción local de estrógenos, las mujeres que toman anticonceptivos orales tienen bajo riesgo de desarrollar EOC posiblemente como resultado de un mecanismo de retroalimentación negativa que suprime la producción local de estrógenos a través de las gonadotropinas. Las células epiteliales de superficie ovárica normal expresan receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos (33). En conclusión ambas gonadotropinas y las hormonas esteroideas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario pueden estar implicados en la carcinogénesis ovárica.

1.4. GONADOTROPINAS

La hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) desempeñan un papel esencial regulando la función gonadal tanto en humanos como en otras especies animales (34, 35). Las células de la granulosa en el ovario y las células de Sertoli en el testículo son las células blanco para la acción de la FSH siendo predominantemente estos dos tipos celulares los que expresan de manera natural este receptor (36, 37). Las células blanco para la LH son las células de Leydig en el testículo y diversos tipos celulares en el ovario, en los que la LH regula las concentraciones locales y sistémicas de los esteroides sexuales (38). En el ovario, la FSH es el principal factor que promueve el crecimiento y desarrollo del folículo, una de sus funciones es estimular el proceso de aromatización, en el cual los andrógenos son transformados en estrógenos en las células de la granulosa (39). Además, la FSH también participa en la prevención de la atresia folicular y estimula la síntesis de diversos factores no-esteroidogénicos, promueve la división celular, la estimulación de la proliferación celular y la inducción de la síntesis de receptores tanto para LH como FSH en células de la granulosa (40-42).

1.4.1. Receptores de gonadotropinas

La FSH y la LH, son glicoproteínas hipofisarias estructuralmente similares, formadas por dos subunidades denominadas subunidad α y subunidad β unidas entre sí por fuerzas no covalentes. La subunidad α es idéntica entre estas glicoproteínas y está conformada siempre por la misma secuencia de aminoácidos para una misma especie (35, 44), mientras que la β es única para cada una de ellas y les confiere su especificidad biológica. Los receptores de gonadotropinas pertenecen a una subfamilia de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), específicamente a la subfamilia "A" de receptores tipo rodopsina/ β adrenérgico (45-47). El receptor FSHR une a FSH específicamente, mientras que el LHR une a dos hormonas glicoprotéicas; la LH y la gonadotropina coriónica (CG). Los receptores humanos (h) de la LH (hLHR) y de la FSH (hFSHR) consisten de una cadena única de aminoácidos que posee un gran

dominio amino terminal extracelular, siete regiones transmembranales conectadas entre sí por asas intra y extracelulares y un dominio carboxilo terminal intracelular. Ambos receptores se encuentran localizados en la superficie celular, son glicoproteínas que en su forma madura presentan un peso molecular de 80-82 kDa (hFSHR) (48) y 85-95 kDa (hLHR) (49) y provienen de la maduración de sus respectivas glicoproteínas precursoras de 62 kDa para hFSHR (48) y 68-73 kDa para hLHR (50) que se encuentran localizadas en el retículo endoplásmico. La unión de FSH a su receptor puede activar diferentes vías de señalización, en la vía clásica el hFSHR causa la activación de las proteínas heterotriméricas G_s . La subunidad α de G_s se une a GTP y se disocia. Éste complejo activa a la adenilato ciclasa (AC), lo que conduce a la síntesis de AMPc, éste activa a la cinasa A de proteínas (PKA) y provoca la fosforilación de CREB (cAMP regulatory element binding protein) con la consecuente activación de la transcripción (37). Estudios recientes han demostrado que la transducción de señales mediada por el sistema FSH/FSHR involucra otras cascadas de señalización que incluyen las vías RAF/MEK1,2/ERK1,2; PKA/MEK3,6/p38MAPK; AMPc-GEF/PI3K/PDK/PKB-SGK y AMPc/ Ca^{2+} , así como la activación de genes principalmente regulados por estrógenos (51-53). La activación de estas diferentes cascadas de señalización es dependiente del contexto celular.

Para el receptor de hLHR se han descrito dos vías de señalización dependientes de proteínas G, Adenilato Ciclasa (AC) y fosfolipasa C (54, 55). En la actualidad ha sido bien documentado el papel del AMPc como mediador de las acciones de LH/GC en la esteroidogénesis, sin embargo existe poca información disponible sobre las acciones de LH/GC que pueden ser mediadas por la activación de la PLC. Debido a que la activación de la PLC requiere altas concentraciones de LH/GC se ha propuesto que esta vía es solo activada en mujeres durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual y durante el embarazo (54). Por último ha sido demostrado que las vías de las MAPK cinasas se activan en células que expresan el receptor para LH de manera endógena o en células transfectadas con el receptor (56, 57).

1.4.2. Receptores de gonadotropinas en el cáncer de ovario

La teoría de las gonadotropinas descrita anteriormente, sugiere que los altos niveles de LH y FSH pueden tener un efecto estimulador sobre el OSE promoviendo la transformación neoplásica. Este ambiente hipergonadotrópico se presenta en la mayoría de las mujeres con EOC ó en mujeres que han recibido tratamiento para inducir la ovulación (58, 59). Durante la menopausia, cuando la función del ovario cesa, se da un aumento notable en los niveles de gonadotropinas que se mantienen elevados en mujeres posmenopáusicas (60), como resultado de la falta de retroalimentación negativa de los esteroides ováricos. En un promedio de 2 ó 3 años después de la menopausia los niveles de gonadotropinas se incrementan aproximadamente de 10 a 20 veces (50-100mUI/ml) los de FSH y de 3 a 4 veces (20-50mUI/ml) los de LH en relación a los niveles presentes en edad reproductiva. Por otro lado, el uso de terapia de reemplazo con estrógenos o su combinación con progesterona durante la menopausia se ha asociado con un aumento en el riesgo del cáncer de ovario (61, 62). Esto parece ser contradictorio con la hipótesis de las gonadotropinas, debido a que los estrógenos y la progesterona disminuyen los niveles de LH y FSH, sin embargo cabe señalar que los estrógenos son un factor mitogénico y estimulan el crecimiento de células de cáncer de ovario *in vitro* (63). De tal forma que la teoría de las gonadotropinas por sí sola no puede conciliar todos los datos epidemiológicos en la investigación de la etiología o la progresión del cáncer. Pero existe evidencia epidemiológica de que las gonadotropinas están al menos parcialmente involucradas en la tumorigénesis o progresión del cáncer. Asimismo, en el cáncer ovárico epitelial se ha demostrado que la expresión del RNAm y de la proteína para receptores de gonadotropinas se identifican en las células epiteliales superficiales de ovario (OSE) normales y en células de cáncer epitelial ovárico (EOC) así como en las fimbrias (64-66) y su expresión disminuye conforme incrementa el grado del tumor (67, 68), lo cual sugiere que se debe a una regulación a la baja de los receptores, inducida por su ligando en respuesta a una exposición prolongada de los mismos (69, 70). Un estudio reciente muestra que los pacientes con EOC que expresan el hFSHR pero no el hLHR tienen un peor pronóstico de supervivencia, mientras que los pacientes cuyos tumores expresan el hLHR pero no el de hFSHR tienen una mejor supervivencia en general (71),

por lo que se plantea que los diferentes receptores pueden influir en la progresión del tumor del ovario de manera diferente.

Para investigar el papel de los receptores para gonadotropinas en la progresión tumoral, se han analizado los efectos de la sobre-expresión del hFSHR en diferentes tipos celulares; células epiteliales inmortalizadas (OSE) o tumores epiteliales ováricos benignos y en una línea celular de cáncer de ovario en estadios avanzados SKOV-3. En esos estudios muestran que existe un incremento en la expresión de varios oncogenes incluyendo, *EGFR*, *v-erb-b2*, *ERBB2*, *c-Myc*. Adicionalmente, las células de EOC que expresan el receptor para FSH, muestran una alta capacidad invasiva. Estos resultados sugieren que el hFSHR activa vías oncogénicas y facilita el fenotipo invasivo y proliferativo, incluso en ausencia de FSH (72, 73). En contraste la sobre-expresión de hLHR en células de cáncer de ovario SKOV-3, incrementa la expresión de *ERBB2*, la cual se incrementa aún más por la adición de LH, sin embargo, la proliferación y motilidad de esas células altamente invasivas se redujo, por lo que se plantea que la regulación a la alta de *ERBB2* por LH, es un estímulo insuficiente de crecimiento e invasión en esas células (74).

1.4.3. Señalización de las gonadotropinas en el cáncer de ovario

Son diferentes vías de señalización las que han sido implicadas en la proliferación, invasión y en la expresión de genes y proteínas inducidas por LH y FSH, en células OSE, así como en células de cáncer de ovario (Figura 3). Está bien establecido que el AMPc es un segundo mensajero en la señalización mediada por el receptor de LH en células normales y en algunas células OSE malignas; 1) AMPc/PKA promueve la fosforilación de proteínas involucradas en la esteroidogénesis. El efecto anti-apoptótico de LH se ha relacionado con esta vía, indicando que la activación de AMPc por LH lleva a la sobrevivencia de las células de cáncer de ovario, asimismo las gonadotropinas regulan a la baja a la N-cadherina en células OSE por la misma vía. Sin embargo, en células OSE inmortalizadas las gonadotropinas regulan la expresión de *EGFR* por la vía AMPc/EPAC, la cual no es a través de PKA 2) La señalización de la PKC puede ser inducida por proteínas G acopladas a fosfolipasa C (PLC). Existe evidencia de que

ambos LHR y FSHR pueden acoplarse a la AC y PLC activando PKA y PKC. La PKC δ es la principal isoenzima que media la señalización inducida por LH y FSH resultando en un incremento en la proliferación y migración en las líneas celulares OV207 y OVCAR-3 (75). 3) MAPKs (ERKs, p38, y JNKs/SAPKs) cinasas de proteínas activadas por mitógenos, dando como respuesta celular la proliferación, diferenciación y apoptosis. Dos tipos de receptores pueden activar la cascada de las MAPKs; receptores de tirosina cinasa (76) y GPCRs (77). La FSH activa la cascada de las MAPKs en células normales, OSE inmortalizadas así como en células de cáncer de ovario OVCAR-3 (78). La nula producción de AMPc después del estímulo con FSH en las OSE inmortalizadas sugirió que la PKA no está involucrada en la señalización de las MAPKs inducida por FSH en estas células (78). Hecho que fue confirmado por la detección de calcio como segundo mensajero en las células EOC cuando se estimularon con LH y FSH llevando a la activación de ERK1/2 independientemente de AMPc (75). La vía de ERK1/2 también está involucrada en la expresión de survivina inducida por LH. Dentro del contexto del cáncer de ovario el estímulo con FSH y LH activan de manera predominante la vía de ERK1/2 y hacen de esta vía un blanco atractivo de estudio. 4) Se ha demostrado que esta vía PI3K/AKT está involucrada en el proceso de la invasión estimulada por gonadotropinas en células de cáncer de ovario y ambas gonadotropinas pueden promover la fosforilación de AKT (79). La FSH regula a la alta la expresión de VEGF y de survivina en células de cáncer de ovario. Asimismo, la LH también regula a la alta VEGF vía PI3K/AKT/mTOR, la cual puede inhibirse por metformina (80). Todas estas evidencias han permitido sugerir que las gonadotropinas pueden participar en la tumorigénesis además ambas hormonas pueden contribuir a incrementar la señalización de AKT facilitando así el comportamiento oncogénico.

La motilidad de las células cancerosas es un requisito para la metástasis. Las enzimas claves involucradas en la invasión incluyen a las MMPs, dentro de estas la MMP-2, se considera como uno de los factores clave para la iniciación de este proceso (81). Recientemente se ha descrito que las gonadotropinas activan la proteólisis en líneas celulares de cáncer de ovario y pueden así contribuir a la invasión y metástasis incrementando la expresión de MMP-2 y MMP-9 vía PKA y

PI3K (79). Además en las células de cáncer de ovario, la migración esta incrementada con el tratamiento de LH y FSH vía PKC δ /MAPK, ciclo-oxigenasa y Notch 1. Estos resultados sugieren que las gonadotropinas en células de cáncer de ovario, activan múltiples vías que inducen la migración y pueden incrementar la extensión de la metástasis, además regulan la expresión de genes relacionados con la oncogénesis.

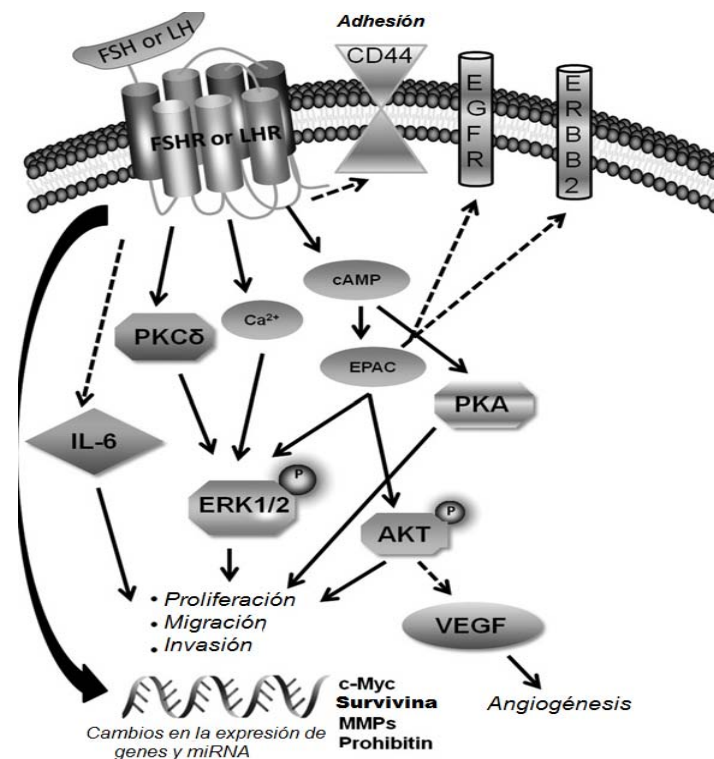


Figura 3. Señalización de gonadotropinas en el cáncer de ovario.
Tomado de Mertens-Walker, 2012 (82).

1.5. ESTRÓGENOS

El estradiol [17 β -estradiol (E₂)] es un esteroide sexual que juega un papel importante en la función reproductiva, en el desarrollo y crecimiento de las glándulas mamarias durante la pubertad, en el embarazo y lactancia así como en la proliferación celular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (83). En el ovario el E₂ se produce principalmente en las células de la granulosa de los folículos ováricos en respuesta a las acciones combinadas de la FSH y la LH (41).

1.5.1. Receptores de estrógenos clásicos

Los efectos inducidos por los estrógenos están mediados principalmente por dos tipos de receptores nucleares, los receptores de estrógenos (ER por sus siglas en inglés Estrogen Receptor) alfa y beta (ER α 595 aa; PM 66-70 kDa y ER β 530 aa; PM 53-59 kDa), los cuales actúan como factores de transcripción activados por el ligando (84). Estructuralmente, los receptores de estrógenos α y β contienen en las regiones amino y carboxilo terminal las funciones de activación transcripcional denominadas **AF-1** (no dependiente del ligando) y **AF-2** (dependiente del ligando), comparten una alta homología estructural (96%) en su dominio de unión al DNA (**DBD**), responsable de la unión de los ERs a los ERE; la región bisagra (**D**), separa al **DBD** del dominio de unión al ligando (**LBD**) (85) Figura 4.

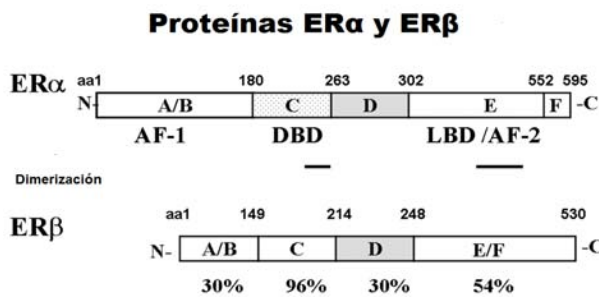


Figura 4. Estructura de los dos subtipos de ERs, el porcentaje de homología en la secuencia de aminoácidos entre los dos subtipos se muestra debajo del ER β , Tomado de Fox, (85).

Una vez que el E₂ se une con su receptor se desencadena una sucesión de cambios bioquímicos y estructurales en la molécula del receptor, incluyendo transiciones conformacionales provocadas por fosforilación en residuos de serina específicos, así como su homo ó heterodimerización. El receptor activo se transloca al núcleo celular e interacciona con secuencias específicas del DNA, localizadas en las regiones de los promotores de genes blanco de la acción de los estrógenos, conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE), reclutándose entonces factores reguladores de la transcripción que se expresan dependiendo del contexto celular y la regulan de manera positiva (co-activadores) o negativa (co-represores) (86). Las vías activadas por los ER incluyen el incremento de calcio intracelular (87), estimulación de la AC y transcripción génica regulada por AMPc (88) y la activación de algunas proteínas cinasas activadas por mitógenos (89). Dentro de los efectos

estrogénicos mediados por estos receptores nucleares, se encuentran los efectos mitogénicos mediados por una variedad de genes involucrados en la proliferación celular y que juegan un papel primordial en la génesis de neoplasias mamarias malignas (85, 90).

Las hormonas esteroides pueden actuar a través de dos mecanismos de acción; un efecto genómico retardado y un efecto no genómico rápido. La señalización rápida desencadenada por los esteroides es mediada por receptores específicos que generalmente se encuentran en la membrana plasmática. La naturaleza de esos receptores es de gran interés y los datos acumulados hasta el momento sugieren que son receptores acoplados a proteínas G. La participación de estos receptores con los esteroides y la señalización corriente abajo que desencadenan han llevado a concluir que son receptores de esteroides extranucleares dentro de los cuales se encuentra el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30/GPER) (91).

1.5.2. Receptores de estrógenos en cáncer de ovario

Los receptores ER α y ER β tienen una localización tejido-específica y niveles de expresión particulares, en el ovario normal, el ER β se expresa predominantemente en células de la granulosa, células de la teca, epitelio superficial y cuerpo lúteo (92-95).

Se ha descrito que la expresión de los ERs en el cáncer ovárico de tipo epitelial se caracteriza por presentar un predominio del ER α (aproximadamente 60%) y sus niveles son generalmente más altos que los encontrados en los ovarios normales o en tumores benignos (92, 96-98). La mayoría de los estudios apoyan el escenario en el que el ER α llega a ser el dominante en el cáncer de ovario, lo cual puede ser una sobre-expresión de este receptor o un crecimiento selectivo de las células positivas a ER α (99).

Por otro lado también existen varios estudios que se han enfocado a dilucidar el papel que juega el ER β en el cáncer de ovario y se ha descrito por

ejemplo que la sobre-expresión del ER β en la línea celular de adenocarcinoma ovárico (PEO14) provoca una reducción del 50% en su capacidad proliferativa (98). Además, se ha observado que existe una correlación inversa entre la expresión de ER β y el grado del cáncer, lo cual indica que la expresión de ER β disminuye conforme el estadio del cáncer avanza (100). Varios estudios realizados con tejidos de cáncer de mama, sugieren que la mayoría de los tumores positivos a ER contienen ambos subtipos. La expresión del ER β junto con el ER α favorece respuestas positivas a la terapia endócrina en la mayoría de los estudios, de tal forma que se plantea que la pérdida de la expresión de ER β puede ser una característica de la transformación maligna (85). En conclusión, ambos receptores a estrógenos (α y β) se encuentran presentes en las células epiteliales superficiales normales del ovario, así como en tumores y líneas celulares de cáncer de ovario. Además, de que el incremento en la expresión de ER α y la disminución en la expresión de ER β parece ser una característica que se presenta en tumores malignos de ovario, colon, pulmón, próstata y mama al ser comparados con tumores benignos (101, 102). Se ha descrito la participación de los receptores ER α y ER β durante el proceso de la metástasis de los tumores ováricos, el cual se da a través de la regulación diferencial de genes reguladores de la EMT (103).

1.6. RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ACOPLADO A PROTEÍNAS G (GPR30/GPER)

Actualmente se tiene identificado un receptor membranal que tiene la capacidad de transducir señales rápidas dependientes de estrógenos (104). Estructuralmente este receptor tiene una homología promedio de 26.6% con otros receptores de la familia GPCR, principalmente con los siete dominios transmembranales. Posee tres sitios potenciales de N-glicosilación localizados en la región amino terminal extracelular, además de los 11 residuos de cisteína que contiene (105), estas características lo incluyen en la familia de los GPCRs por lo que inicialmente este receptor fue denominado como GPR30 y recientemente fue renombrado como GPER por sus siglas en inglés (G protein-coupled estrogen receptor) por el *International Union of Pharmacology* (106). El GPER es una proteína de 375 aminoácidos con un

peso molecular de aproximadamente 42 kDa, traducida por el gen localizado entre las bandas 21 y 22 del brazo corto del cromosoma 7 humano. El GPER, se identificó inicialmente como un receptor huérfano (107, 108); posteriormente se demostró que este receptor membranal estaba involucrado en efectos no genómicos del E₂ en células que no expresan los receptores clásicos para este esteroide (109), hecho que fue confirmado cuando se analizaron las vías de transducción que desencadena GPER en células de cáncer de mama triple negativas (110). La expresión de GPER se ha localizado en la membrana celular en mayor medida en membranas intracelulares predominantemente del retículo endoplásmico (91) lo cual depende principalmente de las condiciones fisiológicas y del tipo celular. Existen un gran número de compuestos diferentes al E₂ que se unen a los receptores de estrógenos clásicos y se ha demostrado que también pueden unirse o activar a GPER, dentro de los que se encuentran el tamoxifeno, ICI182,780, genisteína, xenoestrógenos y fitoestrógenos, asimismo existen ligandos selectivos para GPER como su agonista G-1 y su antagonista G-15 (111). En la actualidad se ha estudiado parte de las funciones de GPER en diversos sistemas fisiológicos y patológicos, los cuales se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Acciones de GPER Modificado de (91, 109, 111, 112).

	ACCIONES DE GPER
Sistema Nervioso	Atenúa la señalización del receptor de serotonina en el núcleo paraventricular, reduciendo así la respuesta a oxitocina y ACTH, por lo que se sugiere que GPER tiene efectos en desordenes del comportamiento
Sistema Reproductivo	Fisiología: Desarrollo de la glándula mamaria. Maduración del oocito. Crecimiento celular endometrial y contracción del miometrio. Regulación del arresto meiótico del ovocito en peces. Estimulación de la formación del folículo primordial en el ovario de hamster, Regula vías de proliferación y apoptosis en la espermatogénesis Cáncer: Mama, Ovario, Testículo, Endometrio.
Sistema Cardiovascular	Mantiene el tono vascular, la presión sanguínea y el crecimiento de células vasculares
Metabolismo y Obesidad	La deficiencia de GPER está asociada a obesidad abdominal, posible efecto en la diferenciación de adipocitos

1.6.1. Señalización intracelular de GPER

El E_2 se une al GPER con una alta afinidad ($K_d \sim 3-6 \text{ nmol/L}$) (104), aproximadamente 10 veces más que al $ER\alpha$ ($K_d \sim 0.5 \text{ nmol/L}$). La estimulación de GPER con su ligando natural E_2 , provoca una cascada de señalización, la cual inicia con la activación de las proteínas G, las cuales disparan múltiples efectores incluyendo la activación de la AC (producción de AMPc) que resultan en la fosforilación de la proteína tirosina cinasa Src, lo que a su vez conlleva a la activación de las metaloproteasas de matriz (MMPs), provocando la liberación de HB-EGF (anti Heparin Binding Epidermal Growth Factor) las cuales llevan a cabo la autofosforilación del EGFR iniciando la señalización de las MAPK cinasas (MAPKs) y PI3K cinasas (PI3Ks) lo cual resulta en la expresión de factores de transcripción tales como *c-fos*, llevando a la expresión de genes blanco cuyos promotores no contienen EREs, induciendo la proliferación de células independientemente de $ER\alpha$, provocando así respuestas celulares rápidas (107, 108, 111, 113), Figura 5. GPER regula genes estrógeno dependientes implicados en la proliferación y migración celular, como ciclina D2 (114), factor de crecimiento IGF-1 (115), colagenasa, Bcl-2 (116), survivina y el factor de transcripción FOS/JUN (117). También se ha reportado que la activación de proteínas G dependientes de estrógenos activan vías rápidas de señalización dando como resultado la liberación de calcio intracelular y óxido nítrico, la participación de GPER en estas vías de transducción, han permitido sugerir que su expresión y/o activación puede jugar un papel importante en el proceso de la carcinogénesis.

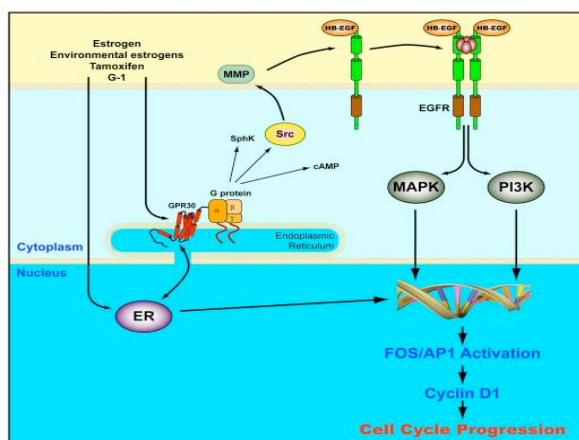


Figura 5. Vías de señalización activadas por GPER y receptores de estrógenos clásicos. Los estrógenos, tamoxifen y G-1 son permeables a la célula y tienen acceso a los ERs y/o GPER. La unión del ligando a los ERs clásicos lleva a la activación transcripcional directa. La estimulación de GPER activa proteínas G, las cuales disparan múltiples efectores que resultan en la activación de Src y cinasa de esfingosina provocando la activación de las MMPs que a su vez transactivan los EGFRs que provocan la activación de las MAPKs y de la PI3K estimulando la expresión de factores de transcripción como *c-fos* lo que lleva a la expresión de genes blanco cuyos promotores no contienen elementos de respuesta a estrógenos. Los efectos combinados de estas señales y eventos transcripcionales conllevan a la progresión del ciclo celular y a la proliferación celular (tomado de Prossnitz (118)).

1.6.2. GPER en el cáncer ovario

El GPER se expresa en diferentes tejidos normales, incluyendo el corazón, arterias, vasos sanguíneos, hígado, pulmón, intestino, cerebro, placenta, próstata, tejido adiposo, mama, útero y ovario (112, 119) así como en neoplasias, tales como adenocarcinoma de mama, ovario y en líneas celulares inmortalizadas de cáncer de mama, tiroides, endometrio y coriocarcinoma (108). La sobre-expresión de GPER en algunas neoplasias como mama y endometrio se ha asociado con un alto grado de malignidad, agresividad e invasión (108, 120) y con tasas de baja sobrevida en pacientes con dichas neoplasias (121-123). En el cáncer de ovario existe controversia en cuanto a la relación de su sobreexpresión con la sobrevida de las pacientes ya que un estudio lo correlaciona de manera positiva (124) y en otro no se encontró ninguna relación (125). Dicha discrepancia en los resultados puede ser atribuida a las técnicas utilizadas en cada uno de ellos y a los procedimientos para agrupar los tejidos para el posterior análisis del RNAm y la detección de la proteína GPER. En el cáncer de ovario, específicamente, la activación del GPER por análogos selectivos (como el G-1) estimula el crecimiento celular (107). En la línea celular BG-1 de cáncer ovárico (derivada de adenocarcinoma en estadio III), el E₂ y el G-1 inducen la expresión de *c-fos*, pS2, y ciclinas A, D1 y E, mientras que el E₂ además modula la transcripción dependiente de ER α y la expresión del receptor de progesterona (PR Progesterone receptor). Asimismo ambos ligandos estimulan la proliferación de dos diferentes líneas celulares de cáncer de ovario en una forma dependiente de EGFR, sugiriendo que el GPER es parte de la vía de señalización no genómica del E₂. Tanto el ER α como GPER son requeridos mutuamente para los efectos pleiotrópicos de E₂ y G-1, las evidencias que lo demuestran son; a) La regulación a la alta de *c-fos* por ambos ligandos, la cual es sensible a ICI 182,780, b) El silenciamiento de la expresión de ER α y GPER por oligonucleótidos antisentido específicos elimina la estimulación de *c-fos* y la activación de ERK y la consecuentemente proliferación celular inducida por ambos ligandos (126).

Es importante mencionar que los mecanismos de acción de los receptores de gonadotropinas LH y FSH y el GPER convergen en la transactivación, activación y

transcripción de las mismas proteínas y genes, como el EGFR, MAPKs y ciclina D1 (109). Asimismo, existe una relación entre las gonadotropinas y la producción de estrógenos en células de la granulosa y la modulación de crecimiento celular dependiente de esteroides (127). En el cáncer de células epiteliales del ovario, el tratamiento con E₂ regula la respuesta tumoral a través de mecanismos que involucran al factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y posiblemente a otros factores de crecimiento y citocinas (128). Recientemente nuestro grupo de trabajo encontró que la estimulación del hFSHR por su agonista natural induce la activación transcripcional de genes sensibles a los estrógenos en células L (derivadas de tejido adiposo y areolar subcutáneo de ratón) transfectadas de manera estable con el cDNA del hFSHR (129). Los mecanismos involucrados incluyen la activación de la cascada de señalización de PKA y en menor grado las mediadas por las cinasas activadas por mitógenos ERK 1/2 y p38. Además se detectó que existe proliferación de las células L cuando son expuestas a E₂, efecto que se potencializó con la adición de FSH y se bloqueó con el antiestrógeno ICI182,720 (52). Estos datos indican que, efectivamente la proliferación celular podría ser un evento regulado adicionalmente por la expresión de genes sensibles a estrógenos, pero a través de mecanismos independientes del ligando para los receptores de estrógenos nucleares. Un mecanismo alternativo podría ser que las gonadotropinas regulen a la alta la expresión de otro tipo de receptor de estrógenos como podría ser GPER, involucrado en el crecimiento y proliferación celular. Existen dos evidencias que muestran que las gonadotropinas regulan la expresión del GPER. Wang en el 2007, se reportó que en el ovario de hámster, la expresión de GPER es dependiente del estadio folicular ocurriendo una disminución en la expresión del receptor después del aumento de gonadotropinas, por el contrario la estimulación con gonadotropinas en el mismo sistema, regula a la alta la expresión de GPER. Lo cual puede sugerir que existen otros factores que pueden ser responsables para esta disminución (130). En segundo lugar en un estudio muy reciente, por primera vez se identificó la expresión de GPER en células de la granulosa humanas, se estimularon con LH y FSH a diferentes dosis y solo altas concentraciones de LH fueron capaces de incrementar la expresión del receptor GPER, por otro lado ambas gonadotropinas provocaron un incremento en la

expresión del RNAm así como de la proteína de los receptores de estrógenos ER β , y de los receptores de progesterona A y B (131).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo y progresión del cáncer epitelial de ovario se ha asociado a altas concentraciones circulantes de LH y FSH, especialmente en mujeres posmenopáusicas o en mujeres que han recibido tratamiento para inducir la ovulación. El receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) media señales no genómicas del estradiol en una variedad de cánceres vinculados con estrógenos. GPER juega un papel importante en el cáncer de ovario ya que participa en la proliferación celular, migración e invasión de células de cáncer de ovario, sin embargo la información sobre la regulación de GPER en este tipo de cáncer es muy escasa y controversial. Por lo anterior planteamos lo siguiente: la activación de los sistemas hFSH-hFSHR y hLH-hLHR puede contribuir a la regulación de la expresión del GPER y $ER\alpha$ e influir en la proliferación celular del cáncer y esto a su vez, contribuir a la etiología y/o progresión de neoplasias epiteliales de tejido ovárico. Dado el alto índice de malignidad y el pobre pronóstico del cáncer de ovario, el estudio de los mecanismos que regulan la expresión del GPER, representan un blanco terapéutico que podría contribuir para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento en el cáncer de ovario.

3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo General

Analizar la activación de los receptores de gonadotropinas (hFSHR y hLHR) sobre la expresión del receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) así como sobre el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) en relación a la proliferación en la línea celular de cáncer de ovario OVCAR-3.

3.2. Objetivos Particulares.

- Determinar la expresión de los receptores endógenos de hFSHR y hLHR y estudiar el efecto de su activación en la línea celular de adenocarcinoma ovárico OVCAR-3.
- Analizar los efectos de la exposición a diferentes dosis de r-hFSH y r-hLH sobre la expresión del RNAm y de la proteína de GPER en la línea celular OVCAR-3 y comparar el efecto con los no estimulados.
- Analizar los efectos de la exposición a diferentes dosis de r-hFSH y r-hLH sobre la expresión de la proteína del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) en la línea celular OVCAR-3 y comparar el efecto con los no estimulados.
- Analizar si existe relación del efecto encontrado con el estímulo de gonadotropinas sobre la inducción de la proliferación en la línea celular OVCAR-3.

4. HIPÓTESIS

La activación de los receptores hFSHR y hLHR a través de sus ligandos naturales provocará una regulación diferencial de la expresión de los receptores de estrógenos GPER y ER α , asociados a la proliferación en la línea celular OVCAR-3.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cultivo celular

Para el desarrollo de este estudio se utilizó la línea celular OVCAR-3 (ATCC, HTB-161) derivada de epitelio de adenocarcinoma ovárico humano. Esta línea expresa el receptor para estrógenos alfa ($ER\alpha$) y el receptor de membrana GPER. Las células se cultivaron en cajas de polipropileno de 75 cm² (Corning NY, EUA) que contenían medio RPMI 1640 (Gibco) a pH 7.4, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin (Gibco NY, EUA). Este cultivo celular se mantuvo a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂. De forma paralela y bajo condiciones similares de cultivo, las células fetales de riñón humano HEK-293 silvestres se cultivaron y sirvieron como control negativo para la expresión de GPER, hFSHR y hLHR; así mismo las células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con el cDNA de los receptores para FSH y LH humano, se sembraron y sirvieron como control positivo para la expresión de los receptores de FSH y LH. Finalmente, la línea celular MCF-7, proveniente de tejido mamario neoplásico se utilizó como control positivo para la expresión del $ER\alpha$. El extracto de cerebro de rata se utilizó como control positivo para el receptor GPER.

5.2. Preparaciones hormonales; Gonal (r-hFSH) y Luveris (r-hLH)

Los diferentes cultivos celulares empleados para este estudio se estimularon con LH o FSH humana de origen recombinante. Dichas preparaciones comerciales se generaron en células de ovario de hámster (CHO) modificadas genéticamente. La FSH humana recombinante (r-hFSH; Gonal-*f*, Merck, Serono, Bari, Italia) 75 UI/vial, equivalente a 5.5 µg de r-hFSH, se utilizó en el rango de 0 a 500 ng/ml. Por su parte la LH humana recombinante (r-hLH) (Lutropina alfa, Luveris, Merck, Serono, Aubonne, Suiza) 75 UI/vial, equivalente a 3.4 µg de r-hLH en el rango de 0 a 200 ng/ml. Las diferentes dosis se prepararon con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) sin rojo de fenol (RPMI-1640 Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) y sin suero

fetal bovino. Las dosis ensayadas están dentro del rango reportado en la literatura (131, 132).

5.3. Estímulo con gonadotropinas recombinantes

Para determinar el efecto de las gonadotropinas humanas recombinantes sobre la expresión del ARNm y la síntesis del receptor de membrana GPER, 1.5×10^6 células OVCAR-3 se sembraron en cajas de 60 mm (Corning NY, EUA) que contenían 2 ml de medio RPMI-1640. Veinticuatro horas después, las células se lavaron con amortiguador salino de fosfatos 0001M (PBS), pH 7.4, e inmediatamente se les agregó medio RPMI sin rojo de fenol, suplementado con SFB 10% tratado previamente con carbón-dextrán (Hyclone, South Logan, UT, EUA), 2 mM de L glutamina (Gibco) y antibióticos. Después de 24 horas de ayuno las células recibieron el estímulo de r-hFSH (0, 50, 100, 200 y 500 ng/ml) o r-hLH (0, 25, 50, 100, 200 ng/ml) durante 24 ó 48 horas. Con el fin de mimetizar la secreción pulsátil de las gonadotropinas, las células se re-estimularon cada 24 horas con preparaciones hormonales frescas. Las células testigo se conservaron bajo las mismas condiciones de cultivo en ausencia de cada una de las gonadotropinas.

5.4. Cuantificación de AMPc

Con el propósito de evaluar la funcionalidad de los receptores para gonadotropinas (hFSHR y hLHR) en las células OVCAR-3, se determinó la cantidad de AMPc producido después del tratamiento con estas hormonas. Para ello, 3×10^5 células se sembraron en placas de 24 pozos (Corning) en un volumen de 300 μ l de RPMI complementado. Los ensayos con cada una de las dosis antes mencionadas se realizaron por triplicado, siguiendo la metodología descrita en la sección anterior. Para este ensayo, el medio de estímulo RPMI sin rojo de fenol se complementó con el inhibidor de fosfodiesterasas 3-isobutil-1metilxantina (MIX, Sigma) a una concentración de 0.125mM. La concentración de AMPc total se determinó después

de 48 horas de incubación a 37°C, el AMPc total (intra y extracelular) fue cuantificado siguiendo la metodología antes descrita (133). El radioinmunoensayo desarrollado incluyó como trazador al 2-0-monosuccinil tirosil-metil éster de AMPc (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA) radiomarcado con NaI¹²⁵ (Amersham International Limite, Reino Unido) mediante el método de Cloramina-T (134). Como estándar se empleó AMPc (Sigma, 81c-0220) y el anticuerpo primario correspondió al AMPc CV-27, comprado al National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Bethesda, MD, EUA) que se utilizó a una dilución final de 1:70,000 en acetato de sodio 50mM, albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1 %, pH 6.1. Para incrementar la sensibilidad del ensayo las muestras se acetilaron agregando 25 µl de trietilamina y ácido acético anhídrido en una proporción 2:1 v/v. El tubo de reacción en cada ensayo se incubó a 4°C durante 24 horas, la reacción se paró colocando en cada tubo de reacción dos ml de etanol frío, seguida de una centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Una vez concluido este paso, el contenido de cada tubo se decantó y la fracción inmunoprecipitada se contó en un espectrómetro para radiaciones gamma (Packard Instrument Company, II, EUA). La sensibilidad del ensayo fue de 2 fmol/tubo. Todas las muestras de un mismo experimento se analizaron en el mismo lote para evitar variaciones interensayo. La variación intraensayo fue menor al 7%. Los ensayos de RIA se repitieron tres veces.

5.5. Extracción de RNA de los cultivos celulares

El ARN total de las distintas líneas celulares empleadas en este estudio se obtuvo a partir de 1×10^6 células/pozo, para ello y por duplicado se sembró esta cantidad de células en cajas de 6 pozos (Corning). Siguiendo el procedimiento del tiempo de incubación y dosis con gonadotropinas recombinantes como se describió en la sección de “Estímulo con gonadotropinas” y una vez concluido el tiempo de estímulo, se realizó la extracción de ARN de la cantidad de células contenidas en cada pozo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante (135). Todos los pasos de extracción se llevaron a cabo a 4°C utilizando material estéril y libre de RNAsas. En breve, para cada pozo que contenía un millón de células se le

agregó 1 ml de Trizol, esta mezcla se recuperó y se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, inmediatamente se colocaron 0.3 ml de cloroformo, la mezcla se agitó durante 30 seg y se centrifugó a 13,000 rpm durante 40 min. Al termino la fase acuosa se recuperó en un tubo de 2 ml y se le agregó 1 ml de isopropanol frío (almacenado a -20°C) agitando 5 veces el tubo. El precipitado formado se concentró por centrifugación (13,000 rpm/1h). El botón celular se lavó 2 veces con etanol al 75%, preparado con agua-DEPC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). El RNA se resuspendió en agua libre de nucleasas (Thermo-Scientific) y la concentración se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. La pureza de todas las muestras se estimó por la relación A_{260}/A_{280} siendo aproximadamente de 1.8. La integridad del RNA se comprobó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.6. Transcripción reversa

EL DNA complementario (cDNA) se obtuvo a partir de 1 µg de ARN extraído de cada una de las líneas celulares (OVCAR-3, MCF-7, HEK-293, HEK-293-hFSHR y HEK-293-hLHR). Para ello, la cantidad de ARN se procesó siguiendo las especificaciones del estuche comercial de RT-PCR (Phusion de Thermo Scientific). En breve, la reacción de transcripción reversa (RT) se inició con la incubación del RNA total (1µg) con 100 ng del Oligo (dT) como iniciador, 10 mM de la mezcla de nucleótidos (dNTP's) a 65°C durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se colocó en hielo y se le adicionaron 2 µl de la enzima transcriptasa reversa (M-MuLV RNase H⁺ Reverse Transcriptase (M-MuLV RT), la reacción de transcriptasa reversa se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones [25°C, 10' → 40°C, 30' → 85°C, 5' → 4°C]. Los cDNAs obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

5.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

El cDNA obtenido de la RT se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando; 1.0 unidad de enzima taq DNA polimerasa (Amplificasa, BioTecMol, México D.F.), 100 ng de cDNA proveniente de la RT, 0.2 mM de dNTP's, 1 mM de MgCl₂, 0.1 pmol de los oligonucleótidos complementarios [(GPER, hFSHR, hLHR, ER α , Actina y GAPDH, Tabla 3)] en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones para la amplificación correspondieron a: 94°C, 5' \rightarrow 30X [94°C, 30" \rightarrow 60-64°C, 45" \rightarrow 72°C, 30"] \rightarrow 72°C, 5' \rightarrow 4°C. El producto generado se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar.

NOMBRE	OLIGONUCLÉOTIDOS	pb
hFSHR	Sentido: 5' GCAAAGATTCTGCTGGTTCTG 3' Antisentido: 5' TTAGTTTTGGGCTAAATGACTTAG 3'	270
hLHR	Sentido: 5' AATTGCTATGTTGCCCTTGTCG 3' Antisentido: 5' TGAAGAAGGCCACACATTGAGA 3'	134
GPER	Sentido: 5' AACCCAGGTACCCAGAGAGTG 3' Antisentido: 5' CCTGGCATTGTGTCAGACAGGAA 3'	224
ERα	Sentido: 5' AACTTGCTCTTGGACAGGAACC 3' Antisentido: 5' ATGTGTACTACTCCAGAATTAAGC 3'	163
GAPDH	Sentido: 5' GCTCTCTGCTCCTCCTGTTTC 3' Antisentido: 5' ACGACCAAATCGTTGACTC 3'	115
β-ACTINA	Sentido: 5' CCATCATGAAGTGTGACGTTG 3' Antisentido: 5' ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA 3'	180

5.8. Secuenciación

Los fragmentos de PCR purificados se secuenciaron con el estuche BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems California, EUA), para ello, se

utilizaron 600 ng del DNA purificado, 2 μ l de BigDye® Terminator v3.1 y 2 μ l de amortiguador de secuenciación (Applied Biosystems™) y 0.8 pmol/ μ l del oligonucleótido correspondiente a cada uno de los receptores. Las condiciones de la PCR fueron 25X [96°C, 10" → 58°C, 5" → 60°C, 4'] → 4°C. La purificación de las reacciones se realizó utilizando columnas DyeEX® (QIAGEN Hilden, Alemania), posteriormente las muestras se deshidrataron en una centrifuga de vacío durante 15 min. La electroforesis en capilar se realizó en un secuenciador automático 3100 ABI PRISM (Applied Biosystem™) en el cual, para cada dideoxinucleótido (A, T, C o G) corresponde un fluorocromo diferente, esto se realizó en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

5.9. Extractos protéicos e inmunodetección

5.9.1. Extracto protéico de GPER

Para la inmunodetección de GPER se sembraron 1.5×10^6 células OVCAR-3 en cajas de 60mm, siguiendo la metodología descrita en la sección de "Estimulo con gonadotropinas" y se incubaron durante 24 y 48 horas. Concluido el tiempo de estímulo, se procedió a la extracción de las proteínas, para ello se utilizó el amortiguador de lisis RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*), compuesto por 1% Igepal, 0.4 Deoxycolato, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM EDTA, 0.14M NaCl y 0.01M PMSF. A este amortiguador se le colocaron dos mezclas de inhibidores de proteasas (*Complete mini* de Roche; Diagnostics, Mannheim, Alemania y Proteoblock de Fermentas). El procedimiento de extracción de proteínas se realizó a 4°C. En breve, las células se lavaron 2 veces con PBS 0.01M frío e inmediatamente se colocó el amortiguador de lisis y las células se desprendieron de la caja mediante un raspado; el lisado se colocó en tubos de 1.5 ml y se agitó vigorosamente en vórtex cada 2 min hasta completar 10 min. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. El precipitado se decantó y el sobrenadante se conservó a -70°C hasta su análisis.

5.9.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína en los diferentes extractos de los cultivos celulares se determinó por medio del método de Bradford. Se utilizó como patrón de referencia a la albumina sérica bovina en las concentraciones: 2, 4, 8, 12, 16 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Esta técnica se basa en el cambio de coloración del Azul de Coomassie G250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con los residuos de aminoácidos básicos (principalmente la arginina) y aromáticos provocando un cambio de coloración del rojo al azul, el cual se cuantifica a una absorbancia de 590 nm (136). Cada una de las muestras se cuantificó por duplicado.

5.9.3. Inmunodetección GPER

Una vez determinada la concentración de proteína de los distintos extractos celulares, 60 μg proteína se analizaron por electroforesis SDS-Poliacrilamida al 10%. Para ello, el homogenizado protéico se desnaturalizó calentándolo a 37°C durante 30 min en presencia de β -Mercaptoetanol. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membrana PVDF (Immobilon®-FL Massachusetts EUA), utilizando una cámara de transferencia Mini-Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA) a 20 V durante 90 min. La membrana se bloqueó con amortiguador de bloqueo (*bloking buffer*, Li-COR, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y al termino se incubaron con los anticuerpos primarios, anti GPER generado en conejo a una dilución 1:650 (Abcam, Cambridge, MA) y anti-GAPDH generado en ratón a una dilución 1:10,000; (Millipore, Temecula CA, EUA) diluidos en amortiguador de bloqueo (Li-COR), durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Al terminó la membrana se lavó 4 veces con amortiguador tris salino (TBS) que contenía 0.1% de Tween-20 (TBS-T) con cambios cada 5 min. Finalmente, la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios acoplados a IgG de conejo (IR Dye™-800-conjugated anti-rabbit) y a IgG de ratón (IR Dye™-680-conjugated anti-mouse) a una dilución 1:15,000. Estos anticuerpos se diluyeron en TBS-T. La incubación de anticuerpos secundarios fue durante 1 hora a TA

con agitación y protegidos de la luz. Al término, se repitieron los lavados con amortiguador de fosfatos 0.01M (PBS) que contenía 0.1% de Tween-20 (PBS-T). Las proteínas específicas se visualizaron con el sistema de imagen infrarrojo Odyssey™CLx (Gene Company, EUA). Como control positivo de la expresión de GPER se utilizó extracto de cerebro de ratón y como control negativo extracto de células HEK-293. La expresión de GAPDH se utilizó como control interno para mostrar que la concentración de las muestras fuera igual. Para confirmar los resultados, cada experimento se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones.

5.9.4. Extracto protéico de hFSHR y hLHR

Para la inmunodetección de los receptores hFSHR y hLHR en la línea celular OVCAR-3 se sembraron 1.5×10^6 células/caja de 60 mm las cuales se incubaron por 24 horas. Posteriormente se procedió a la extracción de proteínas totales utilizando amortiguador de lisis pasivo (Promega) 1X adicionado con [Igepal 0.01%, EDTA 5mM pH 8.0, Tris-HCl 10 mM pH 8.8, NaCl 140mM, y mezcla de inhibidores de proteasas “*complete mini* 1X (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)]. El procedimiento de extracción de proteínas se realizó a 4°C. En primer lugar las células se lavaron 2 veces con PBS 0.01M frío e inmediatamente se les agregó el amortiguador de lisis pasivo. Las células se desprendieron de la caja utilizando un raspador y el lisado se colocó en tubos de 1.5 ml y se agitaron vigorosamente en vórtex cada 2 min hasta completar 10 min. Posteriormente, para recuperar el sobrenadante el lisado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se conservó a -70°C hasta su análisis.

5.9.5. Inmunodetección hFSHR y hLHR

Una vez determinada la concentración de proteína de cada uno de los extractos protéicos, 110 µg proteína se analizaron por electroforesis SDS-Poliacrilamida al 7.5%. Para ello las proteínas se desnaturalización en presencia de β - Mercaptoetanol. Una vez concluida la electroforesis las proteínas se transfirieron a

membranas de PVDF (Amersham GE, Healthcare UK) mediante transferencia húmeda bajo las siguientes condiciones 120 mA durante 2 h, 30 min a 4°C. Inmediatamente la membrana se bloqueó con TBS-T conteniendo 5% de leche baja en grasa (SVELTY) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti hFSHR generado en conejo (dilución 1:1000; Abcam ab65975) y anti hLH generado en ratón (dilución 1:500; AVIVA SYSTEMS BIOLOGY) durante una hora en agitación a TA. Después de 4 lavados de 5 min con TBS-T, se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano en TBS-T (dilución 1:10,000; Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora con agitación a TA, concluido el tiempo de la incubación, se repitieron los lavados con TBS-T. La señal se desarrolló utilizando el estuche de detección por quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Las membranas se analizaron en el escáner de quimioluminiscencia LI-COR C-DiGit. Como controles positivos se utilizaron extracto de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con hFSHR y extractos de células OVCAR-3 transfectadas transitoriamente con hLHR; como control negativo se utilizaron extractos de células NCI-H144 (células de origen de adenocarcinoma papilar de pulmón).

5.9.6. Extractos nucleares

Para la inmunodetección de ER α , se sembraron 3.0×10^6 células OVCAR-3 en cajas de 100mm, siguiendo la metodología descrita en la sección de “Estimulo con gonadotropinas” y se incubaron durante 24 y 48 horas. Concluido el tiempo de estímulo, se procedió a la extracción de proteínas nucleares utilizando la metodología de Schreiber (137) con algunas modificaciones. Las células se enjuagaron con PBS 0.01M frío, posteriormente se lisaron con un amortiguador hipotónico (amortiguador A) el cual contiene; HEPES 10 mM pH 7.6, cloruro de magnesio 1.5 mM, cloruro de potasio 10 mM, NP-40 0.5%, fluoruro de sodio 1 mM, ditiotreitolo 0.5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y “Complete mini 1X Roche. Las células se desprendieron de la caja utilizando un raspador y el lisado se colocó en tubos de 1.5 ml, durante 15 minutos. Los lisados se

mantuvieron con agitación constante a una temperatura de 4°C. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 7,000 rpm por 1 min a TA; trascurrido el tiempo, el sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en amortiguador B el cual contiene: RIPA, “*complete mini*” 1X, fluoruro de sodio 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM. Los núcleos se lisaron durante 30 minutos a 4°C con agitaciones vigorosas cada 5 minutos, posteriormente para recuperar el sobrenadante, los lisados se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm a 4°C y se conservaron a -70°C hasta su análisis.

5.9.7. Inmunodetección de ER α y Ki-67

Después de cuantificar la concentración de proteínas de los extractos nucleares, 80 μ g de proteína se analizaron por electroforesis SDS-Poliacrilamida al 7.5%. Para ello, las muestras se desnaturalizaron calentándolas a 37°C durante 15 min en presencia de β -Mercaptoetanol para posteriormente separarlas en los geles. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham GE, Healthcare UK) por medio de transferencia húmeda bajo las siguientes condiciones: 120 mA durante 2 h a 4°C. Inmediatamente la membrana se bloqueó con TBS-T que contenía 4% de leche baja en grasa durante 1 h con agitación a TA. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti ER α D8H8 generado en conejo (dilución 1:2000; Cell Signaling, Danvers, MA EUA) y anti Pol II H-224 generado en conejo (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology) ó anti Ki-67 generado en conejo (dilución 1:500; Millipore) diluidos en la misma solución de bloqueo durante toda la noche con agitación a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBS-T durante 10 min y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo una IgG anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research, Baltimore, EUA) para la detección de las tres proteínas, a una dilución de 1:15000 en TBS-T para el ER α y TBS-T con leche al 5% para la Pol II, durante 1 h a TA. Por último se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Las proteínas se detectaron utilizando el estuche de quimioluminiscencia [SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, (Thermo Fisher Scientific, EUA)]. Las membranas se analizaron en el escáner de quimioluminiscencia LI-COR C-DiGit. Como controles

positivos de la presencia de ER α , se utilizaron extractos nucleares de células MCF-7 y para Ki-67 se utilizaron extractos nucleares de las células Hela. Como control negativo para ambas proteínas se utilizaron extractos de células HEK-293. Finalmente se realizó el análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

5.10. Ensayo de proliferación

Para determinar el posible efecto de las gonadotropinas r-hFSH y r-hLH sobre la proliferación celular en OVCAR-3 se llevó a cabo el ensayo colorimétrico que se basa en la detección de la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial y la conversión de la sal de tetrazolio XTT (color amarillo) hacia formazán (color naranja) como resultado de la actividad metabólica celular, lo que permite la determinación del porcentaje de células vivas. Para ello, 2×10^4 células/pozo en cajas de 96 pozos (Corning) se sembraron en un volumen 100 μ l de medio RPMI. Las células contenidas en cada pozo recibieron el mismo tratamiento con gonadotropinas y de forma similar se incubaron y se conservaron como se describió en la sección de "Estimulo con gonadotropinas". Concluido el tiempo de estímulo de 24 y 48 horas, a cada pozo se le adicionaron 50 μ l de la solución XTT (concentración final de 0.3 mg/ml) en una relación 50:1 con el reactivo acoplador de electrones (ej. 5 ml de reactivo XTT con 0.1 ml de acoplador), posteriormente la placa se incubó durante 90 minutos en una atmósfera de 5% de CO $_2$ a 37°C para permitir la formación de la solución de formazán, la cual se leyó en un lector de placas a una absorbancia de 490 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm. El incremento en el número de células vivas resulta de un incremento en la actividad general de la deshidrogenasa mitocondrial en las muestras. Este incremento directamente correlaciona con la cantidad de formazán reducido, siendo la absorbancia directamente proporcional al número de células vivas. Se realizaron tres experimentos, cada uno con cuatro replicas. La proliferación se determinó con el estuche comercial Cell Proliferation Kit II, XTT de Roche (Diagnostics, GmbH, Mannheim Alemania).

5.11. Ensayo de viabilidad

Para determinar el posible efecto tóxico de las gonadotropinas humanas sobre los cultivos de OVCAR-3 se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad basado en la detección de la actividad de la enzima citosólica, lactato deshidrogenasa (LDH), liberada al medio de cultivo por células lisadas. La conversión de la sal de tetrazolio INT (color salmón) hacia formazán (color rojo) se utilizó como medida de viabilidad celular. Para ello, se sembraron 2×10^4 células en cajas de 96 pozos (Corning) en un volumen de 100 μ l de medio RPMI. Las células contenidas en cada pozo recibieron el mismo tratamiento con gonadotropinas y de forma similar se incubaron y se conservaron como se describió en la sección de “Estimulo con gonadotropinas”. Una vez finalizado el tiempo de incubación se tomaron 50 μ l de cada uno de los pozos y se transfirieron a pozos limpios, posteriormente, las células contenidas en cada pozo se lisaron agregando 5 μ l de una solución de lisis (10X, Tritón X-100 9% v/v en agua), seguido de una incubación durante 10 min en una atmosfera húmeda con 5% CO₂ a 37°C. Por último, los pozos que contenían tanto las células como el medio de cultivo recibieron 50 μ l de la solución substrato, que al reaccionar con el medio de cultivo produce el cambio de coloración antes mencionado; esta reacción se detuvo con la adición de 50 μ l de la solución de ácido acético 1M. Por último la placa se leyó en un lector a una absorbancia de 490 nm. Se realizaron 3 experimentos cada uno con tres replicas. La viabilidad se determinó con el estuche comercial, CytoTox 96 Non-Radioactive (Promega Corp; EUA).

5.12. Análisis estadístico.

Para evaluar las diferencias en la viabilidad y la proliferación celular, se tomaron en cuenta las absorbancias a 490nm, para la acumulación de AMPc se tomaron las concentraciones obtenidas en el RIA. Las bandas específicas de los inmunoblots de GPER, RE α , Ki-67, GAPDH (constitutivo de extractos celulares) y POLII (constitutivo de extractos nucleares), se sometieron a un análisis semicuantitativo en un sistema de análisis de imágenes “Imagen Studio 2.1” (LI-COR, Biosciences). Asimismo se realizó el análisis de las bandas de RNAm, utilizando el programa NIH ImageJ.

Para valorar si existían diferencias estadísticamente significativas, 3 ó 5 experimentos independientes se analizaron utilizando una prueba de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Dunnett's para dos muestras. Para todas las pruebas estadísticas definidas se consideró como límite para establecer la presencia de diferencias significativas, los valores de $p < 0.05$. Como estadística descriptiva se utilizó el promedio y el error estándar. Utilizando el programa estadístico Sigma Plot 12.3.

6. RESULTADOS

6.1. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE GONADOTROPINAS EN LA LÍNEA CELULAR OVCAR-3

6.1.1. Expresión del RNAm de los receptores hFSHR y hLHR en la línea celular OVCAR-3

El patrón de expresión del RNAm de los receptores de gonadotropinas en la línea celular OVCAR-3 se muestra en la figura 7. Se detectaron las bandas correspondientes al transcripto del hFSHR en 294 pb, Figura 6B) y para el transcripto del hLHR en 134 pb, Figura 6C). Las bandas obtenidas se purificaron y secuenciaron para confirmar su identidad. Los resultados obtenidos se compararon con la base de datos del Gene Bank, el receptor de FSH humano (hFSHR) correspondió con el ID S599000 y el receptor de LH humano (hLHR) correspondió con el ID S57793.1.

6.1.2. Inmunodetección de los receptores de hFSHR y hLHR en la línea celular OVCAR-3

En la línea celular OVCAR-3 se detectaron ambos receptores de gonadotropinas. Se detectaron las bandas de proteína correspondientes en un peso de 80 kDa para hFSHR y de 85 kDa para hLHR, con una señal débil pero correspondiente al peso descrito. Se llevaron a cabo dos tipos de inmunoblots utilizando por una parte segundos anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano y por otro lado segundos anticuerpos fluorescentes, obteniendo los mismos resultados. Como control positivo (+) del hFSHR se utilizó extracto de línea celular HEK-293 transfectadas de manera estable con el cDNA del hFSHR (HEK-hFSHR) y para hLHR se utilizó como (+) extracto de línea celular OVCAR-3 transfectadas de manera transitoria con el cDNA del hLHR (OVCAR-3-hLHR) para ambos inmunoblots se utilizó como control negativo (-) extracto de la línea celular NCI-441 de origen de adenocarcinoma de pulmón humano y como constitutivo se utilizó la proteína GAPDH. En la figura 7, se muestran los inmunoblots con los anticuerpos fluorescentes.

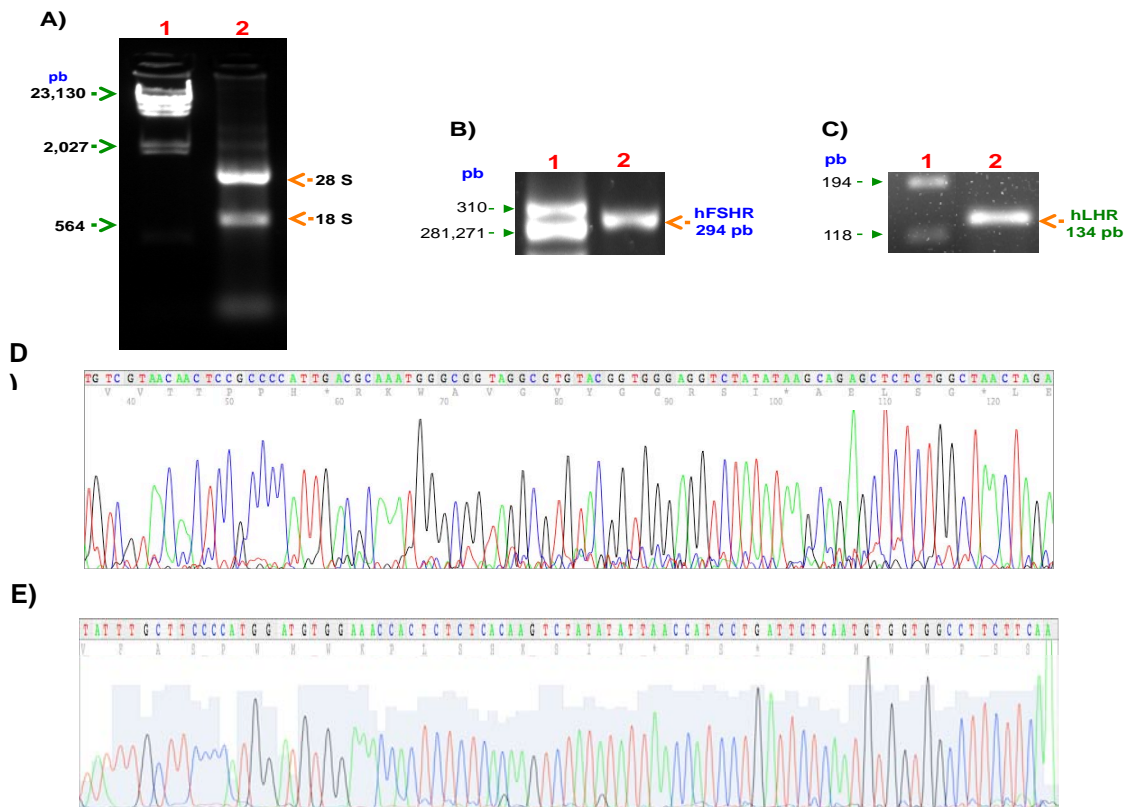


Figura 6. **A)** Integridad del RNA total obtenido de las células OVCAR-3. 1) Marcador Lambda digerido con *Hind* III, 2) RNA total extraído de OVCAR-3; **B y C)** Amplificación por PCR de hFSHR y hLHR en OVCAR-3, 1) Marcador Phy X174, 2) Productos de la PCR que muestran la amplificación del hFSHR y hLHR respectivamente. Sección de los electroferogramas de las secuencias de los receptores de gonadotropinas obtenidos de la línea celular OVCAR-3. **D)** hFSHR **E)** hLHR.

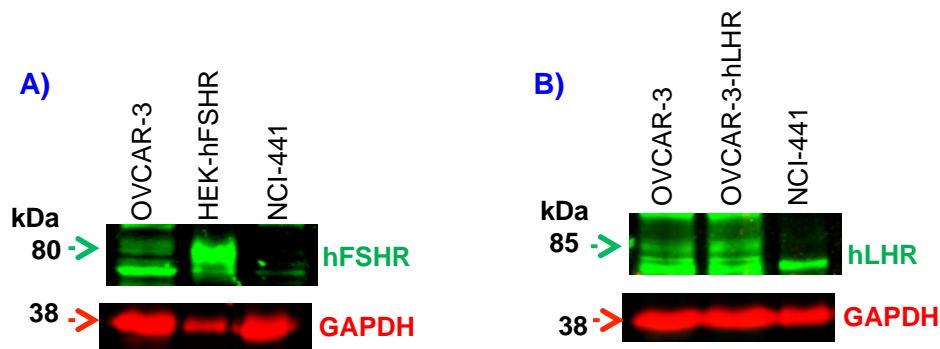


Figura 7. Inmunodetección de los receptores de gonadotropinas. **A)** Detección de la banda correspondiente al hFSHR en un peso aproximado de 80 kDa. Primer carril; línea celular **OVCAR-3**, segundo carril control (+), tercer carril control (-). **B)** Detección de la banda correspondiente al hLHR con un peso aproximado de 85 kDa. Primer carril; línea celular **OVCAR-3**, segundo carril; control (+), tercer carril control (-).

6.1.3. La activación de los receptores con r-hFSH y r-hLH provocó una respuesta dosis dependiente en la acumulación de AMPc en las células OVCAR-3.

La activación de los receptores de gonadotropinas por sus ligandos naturales generaron la producción de AMPc dependiente de la dosis a las 48 horas de estímulo. La acumulación de AMPc con las dosis de r-hFSH fueron (4675 ± 55 ; 5058 ± 37 ; 6266 ± 100 ; 4697 ± 66 , respectivamente) vs el control (4165 ± 90) y de r-hLH (5877 ± 51 ; 7389 ± 181 ; 9268 ± 24 ; 9042 ± 218 ; 10978 ± 206 , respectivamente) vs el control (5877 ± 51). Tanto con LH como con FSH se detectó un incremento significativo ($p < 0.001$) Figura 8.

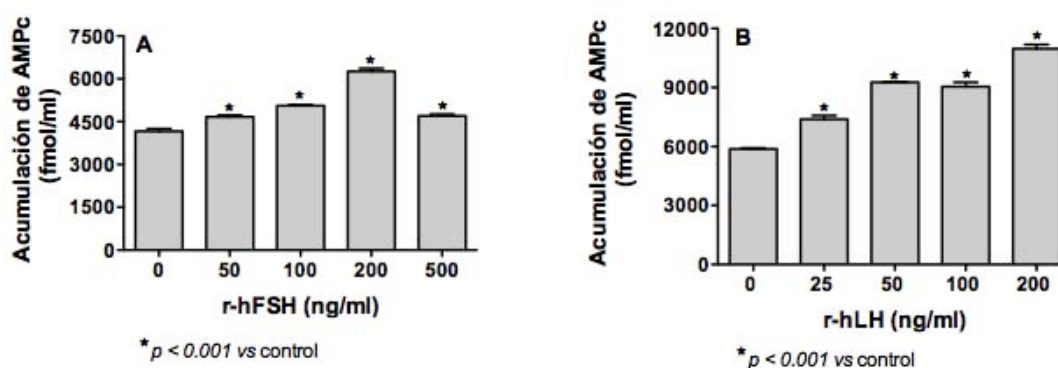


Figura 8. Acumulación de AMPc con el estímulo de r-hFSH y r-hLH en las células OVCAR-3. Las células fueron estimuladas con r-hFSH (panel A) y r-hLH (panel B) durante 48 h. Cada una de las dosis fue capaz de inducir la acumulación de AMPc de manera dosis-dependiente.

6.2. EXPRESION DEL RECEPTOR GPER EN LA LINEA CELULAR OVCAR-3

Se identificó una banda de 224 pb correspondiente al transcrito para GPER. El DNA se purificó y secuenció para confirmar su identidad con la base de datos del Gene Bank, el receptor de GPER humano correspondió con el ID NM_001505.2 Figura 9.

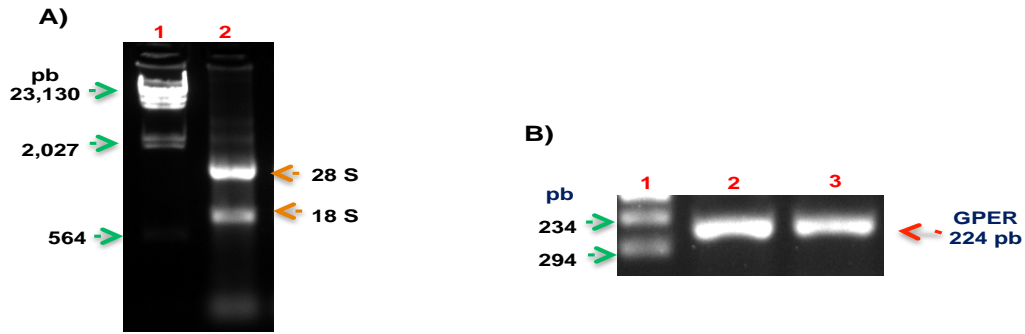


Figura 9. A) Integridad del RNA total obtenido de las células OVCAR-3. 1) Marcador Lambda digerido con *Hind* III, 2) RNA total extraído de OVCAR-3, **B)** Amplificación por PCR de GPER. 1) Marcador Phy X174, 2) OVCAR-3 y 3) MCF-7.

6.2.1. Integridad del RNA total obtenido de la línea celular OVCAR-3 con los estímulos de r-hFSH y r-hLH

Patrón de integridad del RNA total obtenido de las células OVCAR-3 estimuladas con ambas gonadotropinas. Como control (+) se utilizó la línea celular MCF-7 y como control (-) las células HEK-293. Figura 10.

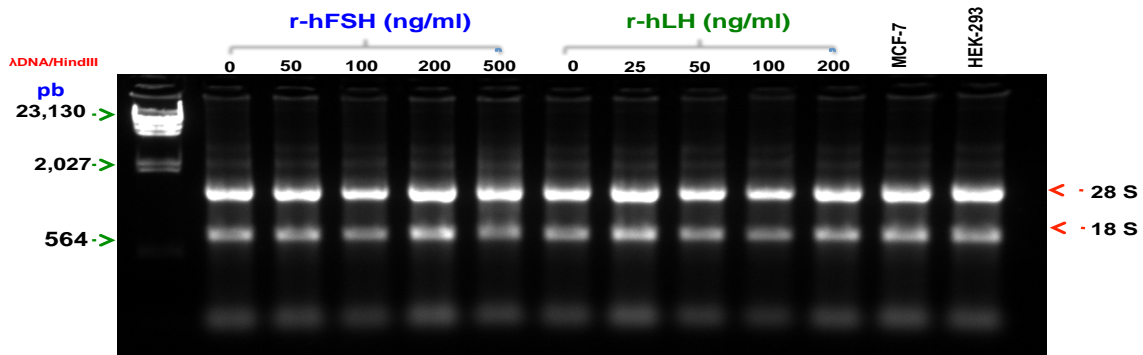


Figura 10. Patrón de integridad del RNA total obtenido de las células OVCAR-3. Figura representativa de tres experimentos independientes.

6.3. REGULACIÓN DEL RECEPTOR GPER POR r-hFSH y r-hLH

6.3.1. La expresión del RNAm de GPER es regulada a la alta por la r-hFSH en la línea celular OVCAR-3.

Efecto de la r-hFSH sobre la expresión del RNAm correspondiente a GPER de 3 experimentos independientes. Encontramos que con todas las dosis a las 24 horas de estímulo, no existió un aumento significativo ($p=0.082$) del porcentaje de expresión del RNAm a dosis de 50 ng/ml (106.0 ± 5.65); 100 ng/ml (85.0 ± 4.24); 200 ng/ml (105.5 ± 4.95) y 500 ng/ml (90.0 ± 2.82) vs control (100%). Sin embargo a las 48 horas, sí se un observó aumento progresivo el cual es estadísticamente significativo ($p=0.001$) en la expresión del RNAm con todas las dosis; 50 ng/ml (111.0 ± 1.0), 100 ng/ml (119.0 ± 0), 200 ng/ml (122.5 ± 2.5) y 500 ng/ml (124.0 ± 2.0) vs el control (100%) Figura 11.

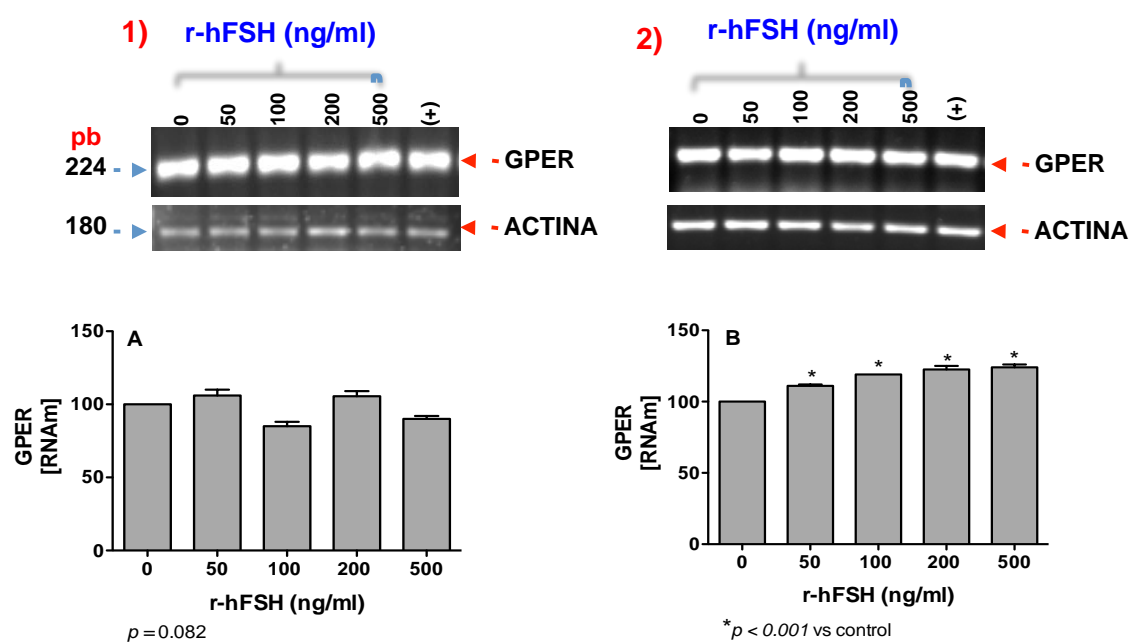


Figura 11. RT-PCR de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH. **1)** PCR representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH durante 24 h. **A)** Promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. **2)** PCR representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH durante 48 h. **B)** Promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. Control (+) (HEK-293-hFSHR) y control (-) HEK-293. * Diferencia significativa vs el control (100%).

6.3.2. La expresión de la proteína del GPER es regulada a la alta por la r-hFSH en la línea celular OVCAR-3.

Efecto de la r-hFSH en la síntesis de la proteína de GPER en la línea celular OVCAR-3. Encontramos que a las 24 horas de estímulo en 5 experimentos independientes con todas las dosis, no existió diferencia estadísticamente significativa ($p=0.06$) del porcentaje de expresión de proteína al compararlas con el control; 50 ng/ml (97.2 ± 22.46), 100 ng/ml (96.0 ± 19.59), 200 ng/ml (126.2 ± 22.93) y 500 ng/ml (129.6 ± 22.27) vs control (100%). Sin embargo, a las 48 horas sí se observó un aumento estadísticamente significativo ($p=0.001$) en la expresión de la proteína de GPER con las dosis de 50 ng/ml (138.0 ± 10.17), 100 ng/ml (138.0 ± 7.96) y 200 ng/ml (156.0 ± 8.59) vs el control (100%); mientras que la dosis de 500 ng/ml no fue estadísticamente significativa (125.2 ± 3.56) Figura 12.

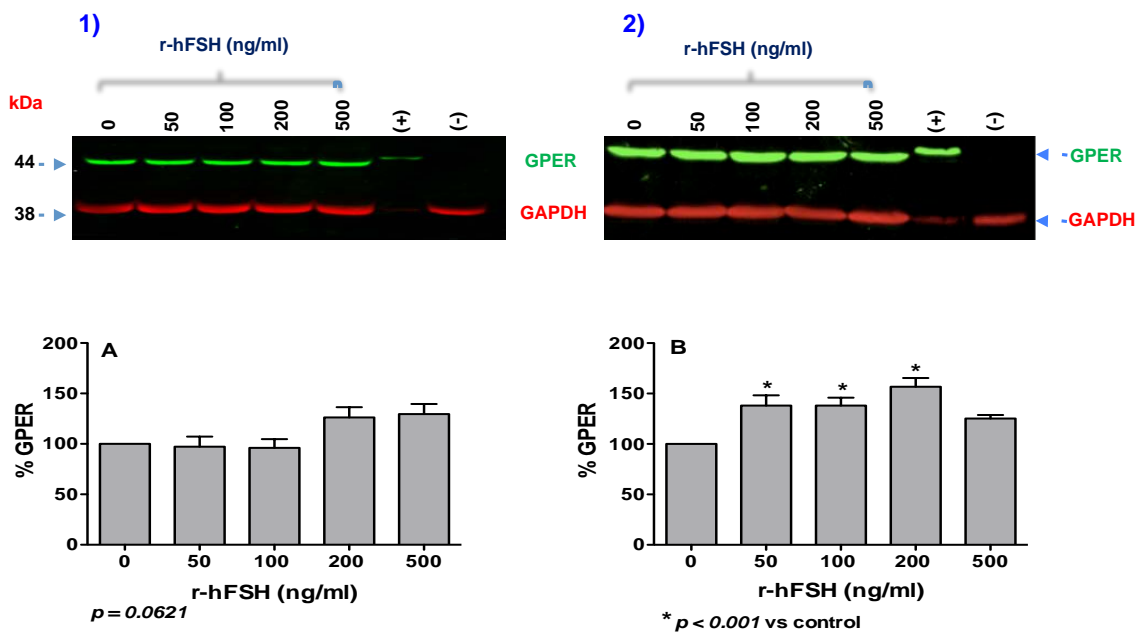


Figura 12. Inmunodetección de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH. **1)** Inmunoblot representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH durante 24 h. **A)** Análisis densitométrico, promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. **2)** Inmunoblot representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH durante 48 h. **B)** Promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. Control (+) cerebro de ratón y control (-) células HEK-293. * Diferencia significativa vs el control (100%).

6.3.3. La expresión del RNAm de GPER no esta regulada por r-hLH en la línea celular OVCAR-3.

Efecto de la r-hLH sobre la expresión del RNAm de GPER de 3 experimentos independientes en la línea celular OVCAR-3. Encontramos que con todas las dosis tanto a las 24 como a las 48 horas de estímulo, no existió un aumento estadísticamente significativo ($p=0.074$ y $p=0.222$ respectivamente) del porcentaje de expresión del RNAm de GPER; 24 horas dosis de 25 ng/ml (112.80 ± 0.43), 50 ng/ml (98.70 ± 11.46), 100 ng/ml (104.01 ± 5.87) y 200 ng/ml (68.83 ± 12.79) vs control (100%). Dosis a las 48 horas 25 ng/ml (109.96 ± 0.89), 50 ng/ml (92.95 ± 4.19), 100 ng/ml (108.815 ± 2.99) y 200 ng/ml (106.84 ± 7.81) vs control (100%) Figura 13.

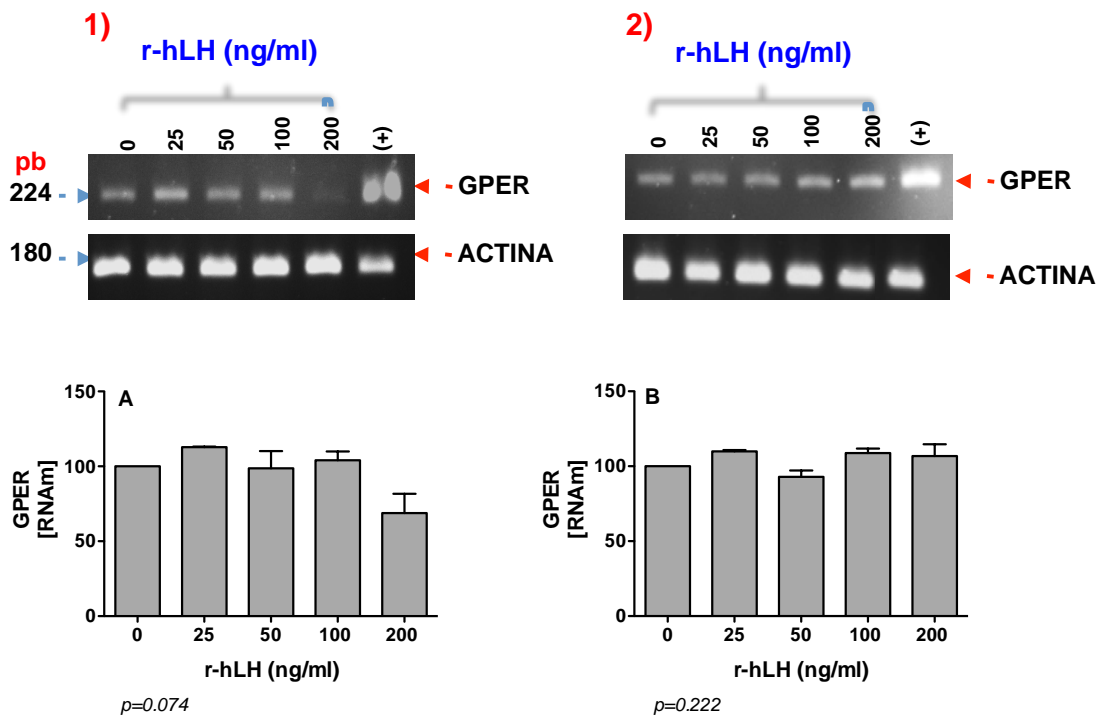


Figura 13. RT-PCR de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH. **1)** PCR representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH durante 24 h. **A)** Análisis desitométrico, promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. **2)** PCR representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH durante 48 h. **B)** Promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. Control (+) (HEK-293-hLHR) y control (-) HEK-293. * Diferencia significativa vs el control (100%).

6.3.4. La expresión de la proteína del GPER es regulada a la baja por la r-hLH en la línea celular OVCAR-3.

Efecto de la r-hLH en 3 experimentos independientes en la línea celular OVCAR-3, sobre la expresión proteica de GPER. Se encontró que con todas las dosis a las 24 horas de estímulo, no existió un aumento significativo ($p=0.0974$) del porcentaje de expresión de proteína; dosis de 25 ng/ml (95.45 ± 7.19), 50 ng/ml (96.0 ± 19.59), 100 ng/ml (96.86 ± 4.49) y 200 ng/ml (97.37 ± 0.50) vs control (100%). Sin embargo, a las 48 horas si se observó disminución significativa ($p=0.002$) en la expresión de la proteína de GPER en las dosis de 50 ng/ml (81.83 ± 1.40), 100 ng/ml (78.40 ± 5.55) y 200 ng/ml (75.15 ± 1.12) vs el control (100%); mientras que la dosis de 25 ng/ml no se observó ningún incremento 89.35 ± 1.43 . Figura 14.

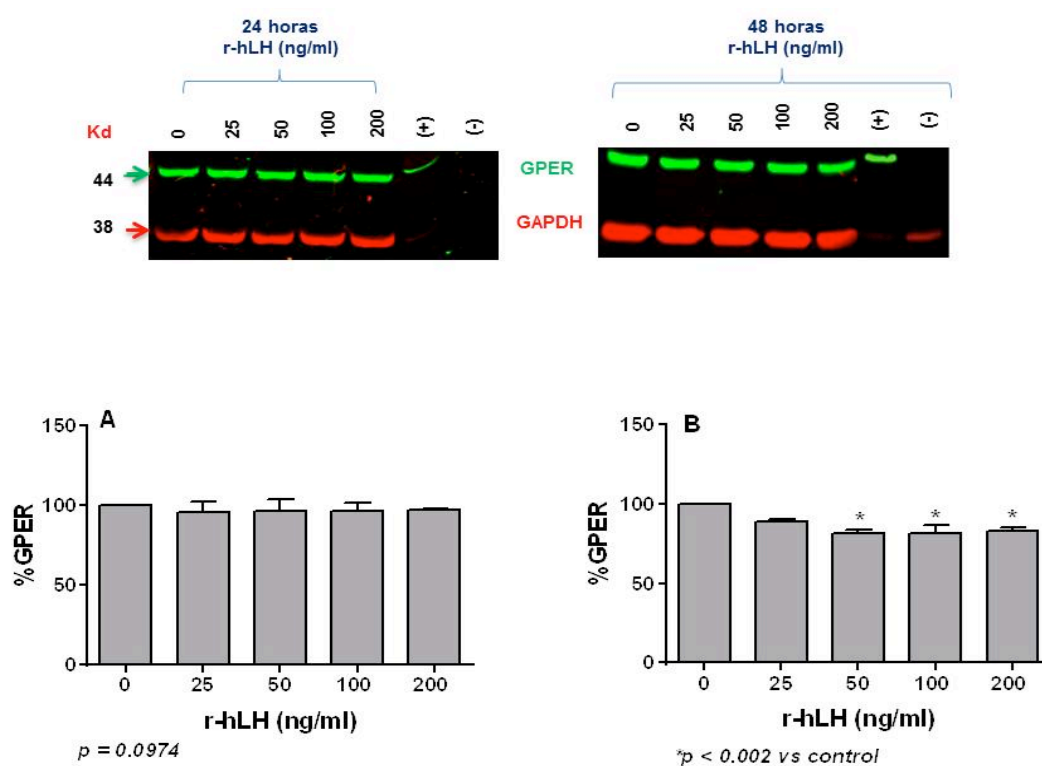


Figura 14. Inmunodetección de GPER en células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH. **1)** Inmunoblot representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH durante 24 h. **A)** Promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. **2)** Inmunoblot representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH durante 48 h. **B)** Promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. Control (+) cerebro de ratón y control (-) HEK-293. * Diferencia significativa vs el control (100%).

6.4. EXPRESIÓN DEL ER α , CON ESTÍMULO DE r-hFSH y r-hLH

6.4.1. El tratamiento con r-hFSH aumenta la expresión de la proteína ER α , mientras que la r-hLH disminuye su expresión a las 48 horas de estímulo.

Efecto de la expresión de ER α en células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH y r-hLH a las 48 horas en 3 experimentos independientes. Se observó que la r-hFSH a las 48 horas de estímulo aumenta la expresión de la proteína ER α el cual, es significativo ($p=0.003$) con la dosis de 200 ng (183.0 ± 4.0) vs el control (100%), mientras que para la dosis de 100 ng/ml (126.0 ± 8.0) no se observó ningún incremento. En cuanto al estímulo con r-hLH a las 48 horas de estímulo se observó una disminución en la expresión de proteína ER α el cual es estadísticamente significativo ($p=0.038$) con la dosis de 200 ng/ml (55.0 ± 0.0) vs el control (100%), mientras que en la dosis de 100 ng/ml (70.5 ± 19.09) no se observó disminución en la expresión Figura 15.

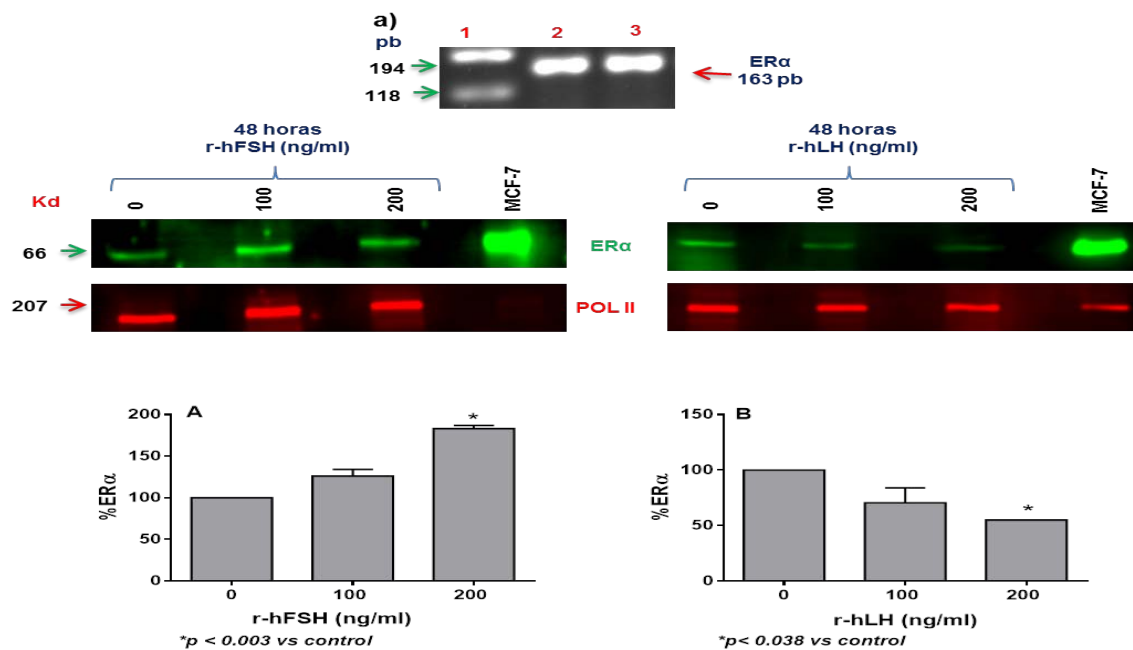


Figura 15. Inmunodetección del ER α en células OVCAR-3 estimuladas con ambas gonadotropinas durante 48 h. **1)** Inmunoblot representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH, **2)** Inmunoblot representativo de células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH. **A, B)** Promedios \pm EE de 3 experimentos independientes. Control (+) línea celular MCF-7. * Diferencia significativa vs el control (100%). a) Amplificación por PCR de ER α . 1) Marcador Phy X174, 2) OVCAR-3 y 3) control (+) línea celular MCF-7.

6.5. PROLIFERACIÓN CELULAR CON EL ESTÍMULO DE r-hFSH y r-hLH

6.5.1. El tratamiento con r-hFSH provocó un incremento en la proliferación en las células OVCAR-3 a las 48 horas de estímulo.

Efecto de la r-hFSH sobre la proliferación de la línea celular OVCAR-3, en 3 experimentos independientes. Encontramos que con todas las dosis a las 24 horas de estímulo, no existió un aumento estadísticamente significativo ($p=0.389$) del porcentaje de proliferación celular; dosis de 50 ng/ml (116.96 ± 10.01); 100 ng/ml (105.65 ± 3.76); 200 ng/ml (98.75 ± 6.53) y 500 ng/ml (99.49 ± 4.21) vs control (100%). Sin embargo a las 48 horas si se observó aumento significativo ($p=0.002$) en la proliferación celular con las dosis de 50 ng/ml (113.61 ± 4.67) y 100 ng/ml (114.71 ± 3.87) vs el control (100%). Este incremento en la proliferación celular no se observó con las dosis de 200 ng/ml (102.60 ± 2.90) y 500 ng/ml (99.31 ± 2.14) Figura 16.

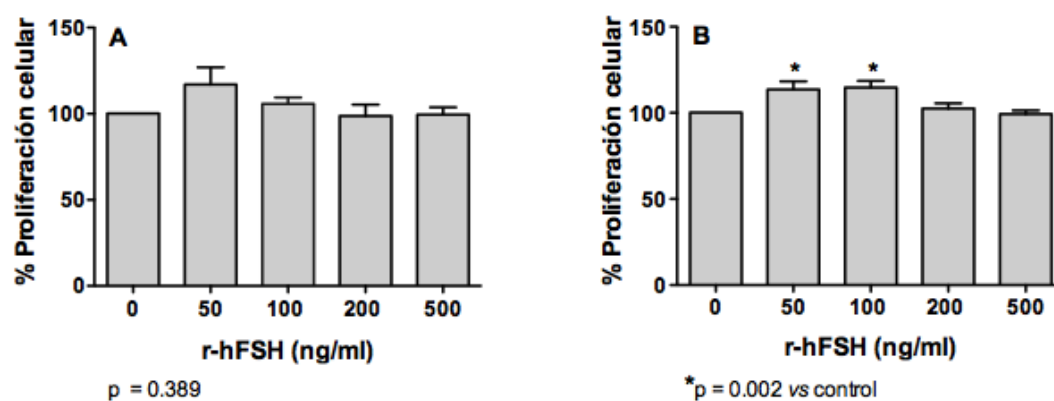


Figura 16. Ensayo de proliferación en las células OVCAR-3 con el estuche XTT. Las células fueron estimuladas con r-hFSH durante 24 h (panel A) y 48 h (panel B). El efecto de la r-hFSH provocó un incremento significativo a las 48 h de estímulo con las dosis de 50 y 100 ng/ml.

6.5.2. El tratamiento con r-hLH provocó una disminución de la proliferación en las células OVCAR-3 a las 24 y 48 horas de estímulo.

Después de los estímulos con r-hLH en 3 experimentos independientes en la línea celular OVCAR-3, encontramos que a las 24 horas de estímulo, si hubo una disminución estadísticamente significativa ($p=0.009$) de la proliferación celular a partir de las dosis: 50 ng/ml (86.80 ± 4.37); 100 ng/ml (85.44 ± 4.61); 200 ng/ml (80.86 ± 3.88) vs el control (100%). Asimismo a las 48 horas, también se observó una disminución estadísticamente significativa ($p<0.001$) en la proliferación celular a partir de la dosis: 50 ng/ml (83.45 ± 4.26); 100 ng/ml (86.07 ± 3.31) y 200 ng/ml (80.06 ± 3.65) vs el control (100%). En ambos tiempos de estímulo con 25 ng/ml no se observó decremento en la proliferación celular (89.27 ± 2.46 ; 94.62 ± 1.49 respectivamente). Figura 17.

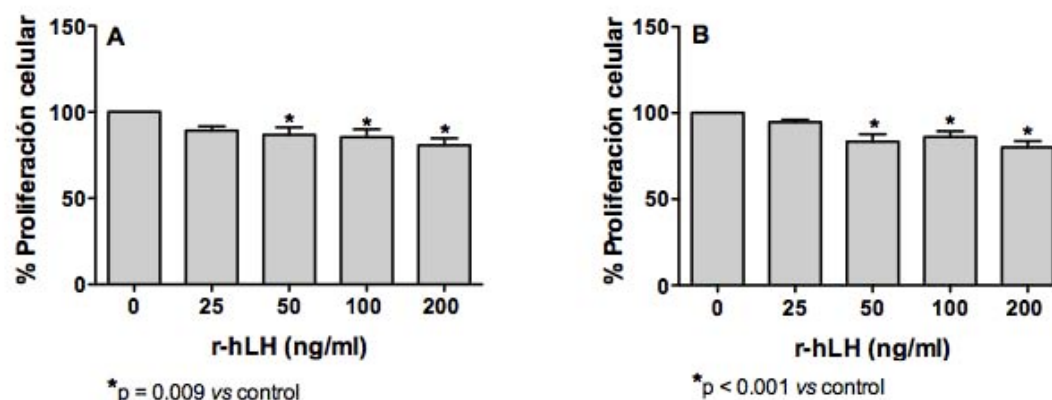


Figura 17. Ensayo de proliferación en las células OVCAR-3 con el estuche XTT. Las células fueron estimuladas con r-hLH durante 24 h (panel A) y 48 h (panel B). El efecto de la r-hLH provocó un decremento significativo tanto a las 24 h como a las 48 h de estímulo a partir de las dosis 50 ng/ml.

6.6 EXPRESION DE Ki-67 CON LOS ESTIMULOS DE r-hFSH y r-hLH

6.6.1. El tratamiento con r-hFSH aumenta la expresión de la proteína del Ki-67, mientras que la r-hLH disminuye su expresión a las 48 horas en la línea celular OVCAR-3.

La r-hFSH aumenta la expresión de la proteína de Ki-67 a las 48 horas de estímulo con la dosis de 100 ng/ml (108.70) y 200 ng/ml (130.51). En cuanto al estímulo con r-hLH se observó que hay una disminución en la expresión de proteína de Ki-67 a las 48 horas de estímulo con la dosis de 100 ng/ml (87.04) y 200 ng/ml (68.27) Figura 18.

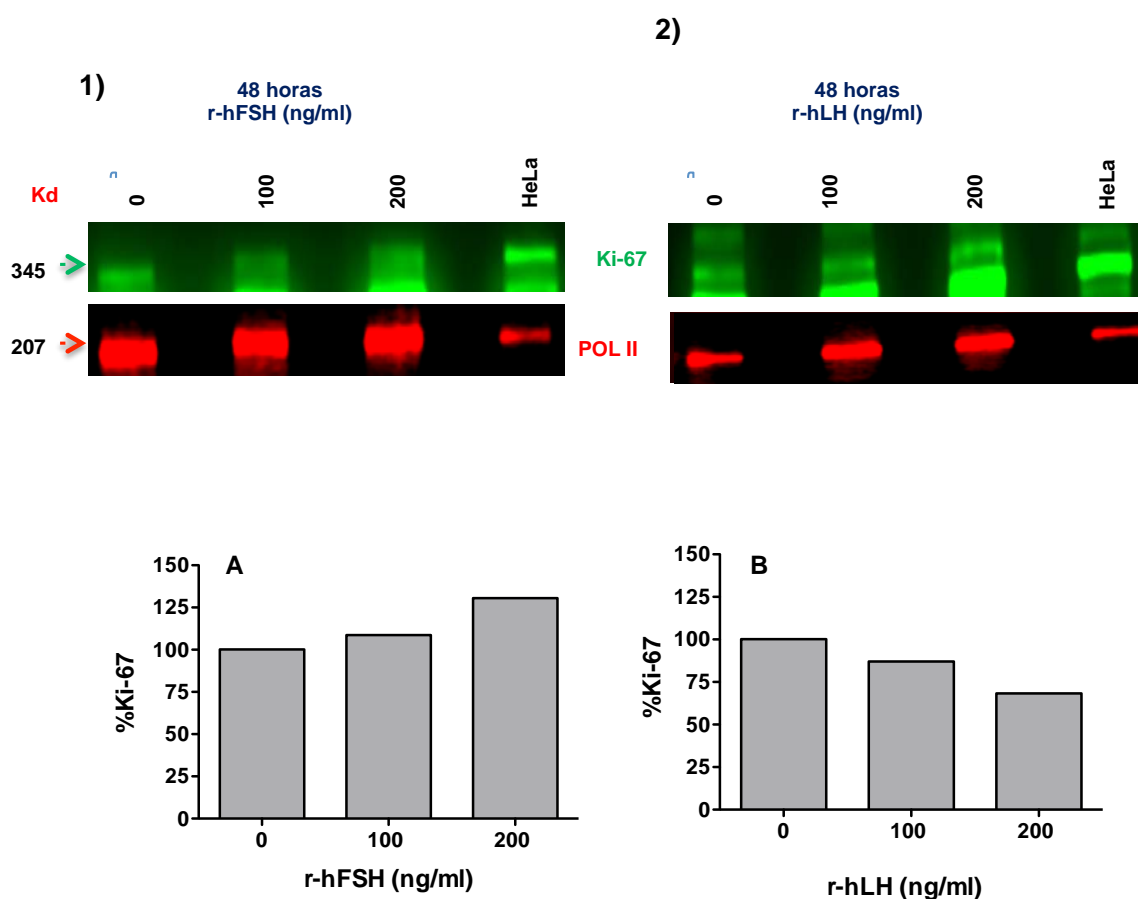


Figura 18. Inmunodetección de Ki-67 en células OVCAR-3 estimuladas con ambas gonadotropinas durante 48 h. **1)** Inmunoblot de células OVCAR-3 estimuladas con r-hFSH, **2)** Inmunoblot de células OVCAR-3 estimuladas con r-hLH. Control (+) línea celular HeLa.

6.7. VIABILIDAD CELULAR DE OVCAR-3 CON LOS ESTIMULOS DE r-hFSH y r-hLH

Los tratamientos con r-hFSH y r-hLH no provocaron muerte celular en la línea OVCAR-3 durante los tiempos de estimulación. Figura 19.

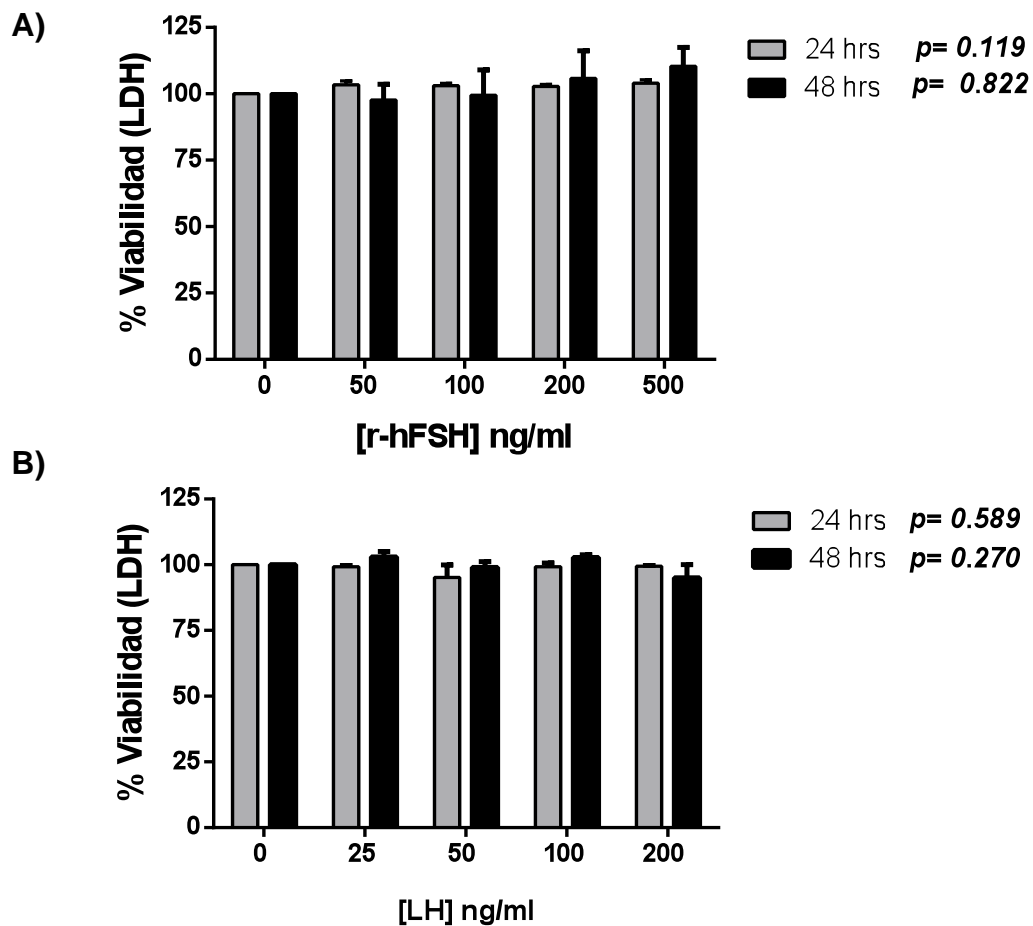


Figura19. Ensayo de viabilidad de células OVCAR-3 con el estuche CytoTox 96. Las células fueron estimuladas con r-hFSH durante 24 h y 48 h (panel A) y con r-hLH a las 24 h y 48 h (panel B).

7. DISCUSIÓN.

El cáncer de ovario, comúnmente se diagnostica durante la menopausia, cuando los niveles de FSH y LH se encuentran elevados (138), la relación causal del aumento de gonadotropinas con el incremento en el riesgo e incidencia del cáncer de ovario, es la base de la teoría de las gonadotropinas (28). Con relación a los receptores para ambas gonadotropinas, se ha reportado, que su expresión disminuye conforme incrementa el grado del tumor (67, 68). Adicionalmente, se sugiere que la expresión de estos tiene relación con el pronóstico de vida de las pacientes con CEO, ya que cuando las células neoplásicas de las pacientes son positivas a hLHR, tienen un mejor pronóstico de sobrevivida comparado con aquellas que no lo expresan. Por el contrario, en las pacientes que expresan el hFSHR pero no el hLHR, tienen un pronóstico más desalentador (71), lo anterior parece indicar que el perfil de expresión de los diferentes receptores de gonadotropinas puede influir en la progresión del tumor de ovario de manera diferente.

Por otro lado, la presencia de los receptores ER α y ER β , influyen en el desarrollo y progresión de los cánceres hormono-dependientes (ovario, mama, próstata), ejerciendo distintas funciones biológicas. De hecho, en este tipo de tumores, existe un incremento en la expresión de ER α y un decremento en la expresión del ER β al compararse con tejidos sanos. Adicionalmente, se conoce que el ER α es un promotor del crecimiento y proliferación celular de cáncer de ovario, mientras que los efectos del ER β se han descrito como proapoptóticos y antiproliferativos (96, 139). El ER α participa durante el proceso de metástasis de tumores ováricos, a través de la regulación a la alta de factores de transcripción asociados con la EMT (103), mientras que, el ER β tiene el efecto opuesto ya que la inhibe. Parece ser que, de la misma manera que los receptores de gonadotropinas, la expresión de los receptores de estrógenos tiene diferente relevancia en la sobrevivida de los pacientes (140).

El receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) regula genes estrógeno dependientes implicados en la proliferación y migración celular (112, 119).

En el ovario, GPER se expresa en el OSE, células de la teca, células de la granulosa y ovocitos, sin embargo aún no se conoce con exactitud la función de este receptor en el ovario humano ni en patologías del mismo (131, 141). Los estudios que han tratado de explicar la importancia de la expresión de GPER y su relación con la sobrevida de pacientes con EOC son escasos y controversiales (124, 125, 142, 143). Asimismo, la información en relación a los mecanismos o proteínas que regulan la expresión de GPER es muy escasa. Vivacqua y cols (144), describen que el EGFR y TGF α regulan a la alta GPER en células de cáncer de mama y endometrio a través de la vía de transducción de EGFR/ERK. En otro estudio, al evaluar la respuesta celular a hipoxia en células de cáncer de mama SKBR3 y en células de cardiomiocitos HL-1, se estimula la expresión de la proteína de GPER (145). Los estrógenos también pueden influir en la regulación de GPER en pacientes con endometriosis donde se encuentra reducida su expresión en relación a los controles (146).

Existe información controversial sobre la regulación de GPER por parte de las gonadotropinas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas; en un estudio *in vivo*, se encontró que durante el ciclo estral del hámster, la expresión de GPER en células de la teca y granulosa es dependiente del estadio folicular, inicia un aumento sostenido de la expresión en el folículo preantral hasta llegar al antral y se mantiene en niveles altos durante el diestro pero disminuye después del pico de LH (130). Por otro lado, en cultivos de células de la granulosa humanas, estimuladas con ambas gonadotropinas, la expresión de GPER, se incremento solo con altas concentraciones de LH (131), además, tanto la FSH como la LH, indujeron la expresión del RNAm y la proteína del ER β sin tener efecto alguno sobre ER α .

En el cáncer de ovario, también se ha analizado la regulación de GPER por gonadotropinas y su relación con la sobrevida de las pacientes por ejemplo, la detección de una señal fuerte de GPER en tumores de células de la granulosa, se relacionó con una reducción en la sobrevida de las pacientes con EOC (142), en otro estudio los mismos autores, reportaron que en sistemas *in vitro* las gonadotropinas regulan a la alta a GPER. Así mismo se correlacionó la expresión tanto de receptores de gonadotropinas y GPER con la sobrevida de las pacientes en tejidos de pacientes

con EOC. Los resultados mostraron que la expresión de GPER en ausencia de la expresión de los receptores de gonadotropinas le confiere a este receptor un papel de “pronosticador positivo” para la sobrevida (132). El impacto de GPER en la sobrevida, combinado con los datos *in vitro* demuestran que la activación de GPER reduce la proliferación de células de cáncer de ovario en ausencia de la señalización de LH/FSH y por último en este estudio no se encontró correlación alguna entre GPER con ER α y ER β . Por otro lado, se ha descrito que los receptores ER α y ER β junto con GPER regulan vías proliferativas y apoptóticas involucradas en la espermatogénesis durante el desarrollo reproductivo del varón (147).

Debido a que es relativamente escasa y controversial la información existente sobre la regulación de GPER por gonadotropinas en el cáncer epitelial de ovario, el objetivo de este trabajo de tesis fue analizar, si los sistemas activados de FSH/hFSHR y LH/hLHR regulan a GPER de manera diferencial y si ésta activación y/o inhibición podría modificar la expresión del ER α afectando así la proliferación *in vitro* de una línea celular proveniente de un adenocarcinoma ovárico (OVCAR-3).

En primera instancia, nuestros resultados demostraron que la línea celular OVCAR-3 expresa de manera endógena ambos receptores para gonadotropinas, hFSHR y hLHR y el receptor de estrógenos GPER. Heublein en el 2013 (132), reportó que la línea celular OVCAR-3 expresaba solamente el hFSHR y no el de hLHR, esto evaluado por PCR en tiempo real. Sin embargo, nosotros identificamos tanto el RNAm como la proteína de ambos receptores. El RNAm se identificó a través de PCR de punto final (Fig. 6), los productos se secuenciaron y compararon con la base del Gene Bank para confirmar su identidad (Fig. 6)

Es bien conocido que la vía de señalización clásica de las gonadotropinas a través de sus receptores se lleva a cabo mediante la activación de la enzima adenilato ciclasa lo que conlleva a un incremento en la síntesis de AMPc y la subsecuente activación de la proteína cinasa A (PKA). En un estudio donde utilizaron la línea celular OVCAR-3, la FSH y la LH incrementaron la migración y proliferación a través de la activación de la vía MAPK/ERK1/2 de manera dependiente de PKC δ y calcio. El no haber detectado

incremento intracelular en la producción de AMPc llevó a estos autores a afirmar que la vía de PKA no está involucrada en este sistema (75), lo cual reportan como datos no mostrados. Aunque en este trabajo de tesis no se determinaron las vías de transducción involucradas en la regulación de GPER, nuestros resultados difieren de lo reportado por Mertens-Walker y cols (75) ya que, nosotros sí obtuvimos cambios en la acumulación de AMPc en la misma línea celular OVCAR-3, lo cual nos indicó que los receptores de gonadotropinas detectados son funcionales. El análisis de la funcionalidad se realizó midiendo la acumulación de AMPc después de estimular las células con dosis crecientes de r-hLH y r-hFSH durante 48 horas, mostrando respuestas con un patrón dosis dependiente (Fig. 8). Debido a la discrepancia que existe en relación a la expresión del receptor de hLHR en OVCAR-3 (72, 132, 148, 149), consideramos de gran importancia haber identificado la expresión tanto del RNAm como de la proteína de hLHR, lo cual nos permite plantear que la diferencia de resultados se debe a que posiblemente los sistemas utilizados por otros investigadores no tenían la sensibilidad y especificidad que nosotros logramos con nuestra metodología. Para lograr la detección de los bajos niveles de la proteína hLHR, se utilizaron en primer lugar, una mayor cantidad de extracto proteico (110 µg de proteína) (Fig. 7) y segundos anticuerpos fluorescentes con alta sensibilidad. La línea celular OVCAR-3 se obtuvo de ATCC para asegurar que no hubiese cambios en su fenotipo, como sucede con las líneas celulares que tienen varios pasajes (150). La medición de la acumulación de AMPc, se realizó mediante radioinmunoanálisis cuya sensibilidad fue 2 fmol (133). En nuestra experiencia el inmunoblot utilizado con segundos anticuerpos fluorescentes tiene dos ventajas; es más específico y más reproducible que el sistema quimioluminiscente. La valoración de la citotoxicidad en la línea celular OVCAR-3 con los diferentes estímulos de gonadotropinas mostró que no existe efecto tóxico con ninguna de las dosis utilizadas (Figs. 6 y 7).

Con relación a la regulación de la expresión de GPER por las gonadotropinas en la línea celular OVCAR-3, nuestros resultados demuestran que la r-hFSH es capaz de inducir un aumento del RNAm y de la proteína GPER a dosis de 50, 100 y 200 ng/ml después de 48 horas de estímulo (Figs. 11 y 12). Por el contrario, la r-hLH tuvo el efecto contrario provocando una disminución de la expresión de la proteína de GPER utilizado

las mismas dosis de 50, 100 y 200 ng/ml bajo las mismas condiciones experimentales (Fig. 14), no teniendo el mismo efecto sobre el RNAm de GPER (Fig. 13) por lo que se podría pensar que la regulación de GPER por r-hLH podría darse a nivel traduccional y no transcripcional. En células de la granulosa humanas, la r-hLH regula a la alta la expresión de GPER (131), mientras que nosotros observamos un efecto contrario en la línea celular OVCAR-3, lo cual indica que en el humano, la expresión de GPER esta hormonalmente regulada por r-hFSH y r-hLH de manera diferente en condiciones sanas (células de la granulosa) y malignas (adenocarcinoma, línea celular OVCAR-3).

La información sobre la expresión del ER α en la línea celular OVCAR-3 también ha sido controversial (132, 151). O'Donnell y cols., documentaron que dicha línea celular no expresaba el ER α (151), mientras que nuestros resultados corroboran la expresión tanto del RNAm como de la proteína correspondiente (Fig. 15). Es importante resaltar que además de identificar la expresión del ER α , los resultados mostraron que dicha expresión esta regulada hormonalmente y es diferente según el estímulo gonadotrópico, ya que la r-hFSH la regula a la alta y la r-hLH la regula a la baja después de 48 horas de estímulo con la dosis de 200 ng/ml (Fig. 15). La diferencia de nuestros resultados con los autores que no detectaron el ER α , podría deberse a que nuestra metodología para hacer extractos nucleares es más específica (137); además de que en los inmunoensayos se cargaron al gel aproximadamente 80 μ g de proteína para lograr la detección del receptor.

La participación de la FSH en el cáncer de ovario ha sido evaluada en múltiples estudios *in vitro*, los resultados han permitido generalizar que esta hormona juega un papel en la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, adhesión, migración, invasión, angiogénesis y quimioresistencia (82, 152, 153) a través de la regulación de la expresión de algunas proteínas participantes en dichos procesos como por ejemplo, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) el cual es estimulado por la FSH en células de carcinomas serosos (154), facilitando el potencial angiogénico característico del cáncer de ovario. Con respecto a las proteínas involucradas en la proliferación celular reguladas por la FSH se encuentran la ciclina D1, ciclina E y survivina, asimismo, la FSH regula a la baja la expresión de proteínas relacionadas con el

proceso de reducción de la apoptosis como son el receptor de muerte 5 (DR5) y la proteína codificada por el gen de muerte celular programada 6 (PDCD6) (155). De la misma manera que FSH regula a la alta las proteínas antes mencionadas, la regulación que ejerce esta gonadotropina sobre GPER en la línea celular OVCAR-3 podría sugerir que el sistema activado FSH-hFSHR/GPER junto con el aumento en la síntesis del ER α , podría contribuir en el proceso de proliferación celular, como lo demostraron los resultados obtenidos en este trabajo a través del ensayo de proliferación (XTT) (Figs. 16 y 17), lo cual fue apoyado por la posible regulación a la alta del marcador de proliferación, antígeno Ki-67 (Fig. 18), observado en el inmunoblot.

Por otro lado la participación de la LH en el cáncer de ovario también ha sido evaluada en diversos sistemas *in vitro*. En un estudio realizado en la línea celular de cáncer de ovario (SKOV-3), la LH disminuyó la proliferación, invasión y migración celular a pesar de que esta gonadotropina reguló a la alta al oncogen ErbB-2, sugiriendo que en algunos sistemas la regulación a la alta de ErbB-2 por sí sola, es insuficiente para producir un fenotipo más agresivo (74). En otro estudio *in vitro* con las mismas SKOV-3 transfectadas de manera estable con el hLHR y estimuladas con LH, se realizó el análisis transcriptómico (microarreglos y PCR de tiempo real) para identificar los cambios dependientes de la expresión y activación del hLHR, en los niveles de expresión génica y vías de transducción. Dentro de 1,783 genes regulados por la LH en este sistema, se encuentran cinco grandes familias de factores de crecimiento, reguladores de la traducción, transportadores, receptores acoplados a proteínas G y receptores nucleares dependientes de ligando. Con este análisis se encontró que la LH participa en redes de regulación transcripcional de crecimiento celular, apoptosis y en múltiples vías de transducción de señal. La LH induce la apoptosis y la inhibición del crecimiento celular a través de cambios significativos en la expresión de miembros de la familia TNF, como es el caso del gen TNFSF10, el cual codifica a la proteína TRAIL que puede unirse a los miembros de la familia TNF induciendo apoptosis (155, 156). Con respecto a la participación de la LH en el proceso de proliferación, existe un estudio donde en células de cáncer de mama MCF-7, la activación del receptor hCGR/hLHR por hCG, promueve la diferenciación y disminuye la proliferación celular, además de suprimir la expresión del ER α y activar la vía de

señalización PKA. De tal forma, nosotros en este estudio observamos que la activación del sistema LH/LHR disminuye la expresión de GPER y del ER α , en células de cáncer de ovario, todo ello en conjunto podría inducir la disminución en la proliferación celular como lo muestran nuestros resultados a través del ensayo de XTT y de la posible regulación a la baja del marcador de proliferación, antígeno Ki-67 (Fig. 18).

Todo lo anterior apoya aún más la idea del papel protector de la LH en el cáncer de ovario. La activación de los receptores de ambas gonadotropinas y la subsecuente producción de AMPc pueden también contribuir al efecto diferencial observado, ya que se ha descrito que el AMPc tiene la capacidad de aumentar o disminuir el crecimiento celular (157). Por último, utilizando la misma línea SKOV-3, se encontró que la LH regula a la alta dos proteínas que tienen diferente acción en la proliferación celular; la prohibitina la disminuye y la MMP-9 la aumenta a través de ERK y PI3K/AKT. La regulación al alta de prohibitina por LH, ocasionó una disminución en la proliferación cuando se silenció a la MMP-9 con RNA de interferencia (154).

Los resultados encontrados en la línea celular OVCAR-3, estimulada con r-hFSH y r-hLH, demuestran que existe una regulación diferencial de estas gonadotropinas sobre GPER y ER α , además de tener un efecto igualmente diferente sobre la proliferación celular, proceso que podría confirmarse con el marcador Ki-67. La regulación a la alta por r-hFSH y a la baja por r-hLH sobre estos receptores en el cáncer de ovario nos sugiere que existe una comunicación entre ellos que tiene que ser explorada mediante sus diferentes vías de transducción. Los resultados de la expresión diferencial de GPER ocasionados por la estimulación de gonadotropinas en la línea celular OVCAR-3 serían de gran utilidad como blancos terapéuticos para la disminución de la proliferación celular, mecanismo importante en el desarrollo y progresión del cáncer.

8. CONCLUSIONES

- La línea celular de adenocarcinoma de ovario OVCAR-3 expresa los receptores funcionales de hFSHR y hLHR de manera endógena.
- La r-hFSH regula a la alta la expresión del RNAm y de la proteína GPER en la línea celular OVCAR-3. Sin embargo, la r-hLH regula a la baja la expresión de la proteína de GPER mientras que el RNAm no mostró cambios significativos.
- La r-hFSH regula a la alta la expresión de la proteína ER α mientras que la r-hLH la regula a la baja, en la línea celular OVCAR-3.
- La activación del sistema FSH-hFSH y la sobre expresión de GPER tienen un efecto proliferativo, mientras que la activación del sistema LH-hLHR y la disminución en la expresión de GPER provoca un efecto antiproliferativo en la línea celular OVCAR-3.
- Las gonadotropinas regulan de manera diferencial tanto el GPER como el ER α e influyen directamente en la proliferación de este tipo celular derivado de un adenocarcinoma ovárico (OVCAR-3).
- Dada la alta malignidad y el pobre pronóstico de las pacientes con cáncer de ovario, los mecanismos que regulan la expresión del GPER representan un blanco terapéutico y por lo tanto estos resultados podrían contribuir para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento en el cáncer de ovario.

9. REFERENCIAS.

1. Hoffman B, Schorge J, Schaffer J. Ginecología de Williams. 2 ed ed. McGraw-Hill, editor. México 2012
2a. ed.
2. Ross M, Pawlina W. Texto y atlas a color con biología celular y molecular. In: Panamericana M, editor. Histología. 5a. ed. México2007. p. 730-44.
3. Gartner L, Hiatt J. In: Médica-Panamericana, editor. Atlas en color de histología. 5a ed. México 5a ed 2011.
4. Strauss JF, III, Williams CJ. The Ovarian Life Cycle, in Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. In: Elsevier: S, editor. 2009 ed. Philadelphia PA2009. p. 155-90.
5. Leung PC, E.Y A. The Ovary. Second ed. Elsevier: S, editor. USA2004.
6. Knobil E. The physiology of reproduction: Raven Press; 1994.
7. Leung PCK, Adashi EY. The ovary. Second ed. ELSEVIER, editor. USA2004.
8. Andersen CY, Ezcurra D. Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. Reproductive biology and endocrinology : RB&E. 2014;12(1):128.
9. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. Reproduction. 2001;122(2):215-26.
10. Yen SSC, Jaffe RB, RL B. Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinica Management. Fourth ed. USA: W.B Saunders Company; 1999.
11. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(2):87-108.
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(1):5-29.
13. Torres-Sánchez M, Rojas-Martínez R, Escamilla Nuñez C. Tendencias en la mortaliad por cáncer en México de 1980 a 2011. Salud Publica Mex. 2014;56:473-91.
14. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. Clinical obstetrics and gynecology. 2012;55(1):3-23.
15. Scott IV. The identification of high risk and practical strategies for a population based randomized trial of ovarian cancer screening. Dis Markers. 1991;9(3-4):133-52.

16. Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later. *Endocr Rev.* 1993;14(3):324-47.
17. Abul K, Nelson F, Richard N. *Patología Humana*. España: Elsevier; 2008.
18. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer.* 2003;97(10 Suppl):2631-42.
19. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, et al. Histological classification of ovarian cancer. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan.* 2003;36(1):9-17.
20. Benedet JL, Bender H, Jones H, 3rd, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics.* 2000;70(2):209-62.
21. Kumar A, Nelson F, Richard N, Mitchell R. *Robbins Patología Humana España*: Elsevier; 8a ed 2008.
22. Kurman RJ, Shih le M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology.* 2010;34(3):433-43.
23. Kurman RJ, Shih le M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human pathology.* 2011;42(7):918-31.
24. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *Journal of cellular physiology.* 2007;213(3):581-8.
25. Pepling ME. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction.* 2012;143(2):139-49.
26. Okamura H, Katabuchi H. Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis. *International review of cytology.* 2005;242:1-54.
27. Auersperg N. Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? *Gynecol Oncol.* 2013;130(1):246-51.
28. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 1971;2(7716):163.
29. Landen CN, Jr., Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of*

Clinical Oncology. 2008;26(6):995-1005.

30. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet*. 2009;374(9698):1371-82.

31. Bose CK. Follicle stimulating hormone receptor in ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancer. *Oncol Res*. 2008;17(5):231-8.

32. Slot KA, de Boer-Brouwer M, Houweling M, Vaandrager AB, Dorrington JH, Teerds KJ. Luteinizing hormone inhibits Fas-induced apoptosis in ovarian surface epithelial cell lines. *J Endocrinol*. 2006;188(2):227-39.

33. Ho SM. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2003;1:73.

34. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev*. 1983;4(2):179-211.

35. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Jr., Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*. 1995;16(6):765-87.

36. Dias JA, Cohen BD, Lindau-Shepard B, Nechamen CA, Peterson AJ, Schmidt A. Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor. *Vitam Horm*. 2002;64:249-322.

37. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev*. 1997;18(6):739-73.

38. Dufau ML, Catt KJ. Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitam Horm*. 1978;36:461-592.

39. Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 1975;97(5):1328-31.

40. Bley MA, Simon JC, Estevez AG, de Asua LJ, Baranao JL. Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*. 1992;131(3):1223-9.

41. Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev*. 1980;60(1):51-89.

42. Yong EL, Baird DT, Yates R, Reichert LE, Jr., Hillier SG. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;74(4):842-9.

43. Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update*. 1998;4(3):260-83.
44. Parsons TF, Pierce JG. Free alpha-like material from bovine pituitaries. Removal of its O-linked oligosaccharide permits combination with lutropin-beta. *J Biol Chem*. 1984;259(4):2662-6.
45. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev*. 2002;23(2):141-74.
46. Caltabiano G, Campillo M, De Leener A, Smits G, Vassart G, Costagliola S, et al. The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(16):2484-92.
47. Kleinau G, Krause G. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocr Rev*. 2009;30(2):133-51.
48. Nechamen CA, Dias JA. Point mutations in follitropin receptor result in ER retention. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;201(1-2):123-31.
49. Hipkin RW, Sanchez-Yague J, Ascoli M. Identification and characterization of a luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor precursor in a human kidney cell line stably transfected with the rat luteal LH/CG receptor complementary DNA. *Mol Endocrinol*. 1992;6(12):2210-8.
50. Bradbury FA, Kawate N, Foster CM, Menon KM. Post-translational processing in the Golgi plays a critical role in the trafficking of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor to the cell surface. *J Biol Chem*. 1997;272(9):5921-6.
51. Gloaguen P, Crepieux P, Heitzler D, Poupon A, Reiter E. Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:45.
52. Pasapera AM, Jimenez-Aguilera Mdel P, Chauchereau A, Milgrom E, Olivares A, Uribe A, et al. Effects of FSH and 17beta-estradiol on the transactivation of estrogen-regulated promoters and cell proliferation in L cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;94(4):289-302.
53. Telikicherla D, Ambekar A, Palapetta SM, Dwivedi SB, Raju R, Sharma J, et al. A comprehensive curated resource for follicle stimulating hormone signaling. *BMC Res Notes*. 2011;4:408.
54. Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem*. 1992;267(7):4479-88.

55. Kuhn B, Gudermann T. The luteinizing hormone receptor activates phospholipase C via preferential coupling to Gi2. *Biochemistry*. 1999;38(38):12490-8.
56. Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem*. 1994;269(11):7851-4.
57. Hirakawa T, Galet C, Ascoli M. MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR. *Endocrinology*. 2002;143(3):1026-35.
58. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C, et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod*. 1995;10(8):2107-11.
59. Shoham Z. Epidemiology, etiology, and fertility drugs in ovarian epithelial carcinoma: where are we today? *Fertil Steril*. 1994;62(3):433-48.
60. Chakravarti S, Collins WP, Forecast JD, Newton JR, Oram DH, Studd JW. Hormonal profiles after the menopause. *Br Med J*. 1976;2(6039):784-7.
61. Beral V, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2007;369(9574):1703-10.
62. Matei MC, Caruntu ID, Negura L, Petrariu FD, Ifrim S, Acatrinei L, et al. The assessment of relations between main histologic type of ovarian cancer and some risk and prognostic factors. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2010;114(4):1135-41.
63. Syed V, Ulinski G, Mok SC, Yiu GK, Ho SM. Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res*. 2001;61(18):6768-76.
64. Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Fukumoto M, Komatsu T, Yamamoto S, et al. Messenger ribonucleic acid expression of LH/hCG receptor gene in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer*. 1997;33(9):1501-7.
65. Parrott JA, Doraiswamy V, Kim G, Mosher R, Skinner MK. Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;172(1-2):213-22.
66. Zheng W, Magid MS, Kramer EE, Chen YT. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol*. 1996;148(1):47-53.
67. Lu JJ, Zheng Y, Kang X, Yuan JM, Lauchlan SC, Pike MC, et al. Decreased luteinizing hormone receptor mRNA expression in human ovarian epithelial cancer. *Gynecol Oncol*. 2000;79(2):158-68.

68. Wang J, Lin L, Parkash V, Schwartz PE, Lauchlan SC, Zheng W. Quantitative analysis of follicle-stimulating hormone receptor in ovarian epithelial tumors: a novel approach to explain the field effect of ovarian cancer development in secondary mullerian systems. *Int J Cancer*. 2003;103(3):328-34.
69. LaPolk PS, Jia XC, Sincich C, Hsueh AJ. Ligand-induced down-regulation of testicular and ovarian luteinizing hormone (LH) receptors is preceded by tissue-specific inhibition of alternatively processed LH receptor transcripts. *Mol Endocrinol*. 1991;5(3):397-403.
70. Themmen AP, Blok LJ, Post M, Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Parmentier M, et al. Follitropin receptor down-regulation involves a cAMP-dependent post-transcriptional decrease of receptor mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;78(3):R7-13.
71. Lenhard M, Lennerova T, Ditsch N, Kahlert S, Friese K, Mayr D, et al. Opposed roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors in ovarian cancer survival. *Histopathology*. 2011;58(6):990-4.
72. Choi JH, Choi KC, Auersperg N, Leung PC. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5508-16.
73. Zhang Z, Jia L, Feng Y, Zheng W. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor facilitates the development of ovarian epithelial cancer. *Cancer Lett*. 2009;278(1):56-64.
74. Warrenfeltz SW, Lott SA, Palmer TM, Gray JC, Puett D. Luteinizing hormone-induced up-regulation of ErbB-2 is insufficient stimulant of growth and invasion in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2008;6(11):1775-85.
75. Mertens-Walker I, Bolitho C, Baxter RC, Marsh DJ. Gonadotropin-induced ovarian cancer cell migration and proliferation require extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation regulated by calcium and protein kinase C{delta}. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(2):335-49.
76. Grant S, Qiao L, Dent P. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. *Front Biosci*. 2002;7:d376-89.
77. van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*. 1996;17(6):698-714.
78. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2245-53.
79. Choi JH, Choi KC, Auersperg N, Leung PC. Gonadotropins activate proteolysis

- and increase invasion through protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(7):3912-20.
80. Liao H, Zhou Q, Gu Y, Duan T, Feng Y. Luteinizing hormone facilitates angiogenesis in ovarian epithelial tumor cells and metformin inhibits the effect through the mTOR signaling pathway. *Oncol Rep.* 2012;27(6):1873-8.
81. Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1367-79.
82. Mertens-Walker I, Baxter RC, Marsh DJ. Gonadotropin signalling in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2012;324(2):152-9.
83. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81(4):1535-65.
84. Barros RP, Gustafsson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell metabolism.* 2011;14(3):289-99.
85. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids.* 2008;73(11):1039-51.
86. Paige LA, Christensen DJ, Gron H, Norris JD, Gottlin EB, Padilla KM, et al. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(7):3999-4004.
87. Pietras RJ, Szego CM. Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature.* 1975;253(5490):357-9.
88. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(18):8517-21.
89. Barton M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids.* 2012;77(10):935-42.
90. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology.* 2001;142(9):4120-30.
91. Wang C, Liu Y, Cao JM. G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *International journal of molecular sciences.* 2014;15(9):15412-25.
92. Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB. Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and

- ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):1025-8.
93. Hillier SG, Anderson RA, Williams AR, Tetsuka M. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in cultured human ovarian surface epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(8):811-5.
94. Hosokawa K, Ottander U, Wahlberg P, Ny T, Cajander S, Olofsson IJ. Dominant expression and distribution of oestrogen receptor beta over oestrogen receptor alpha in the human corpus luteum. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(2):137-45.
95. Revelli A, Pacchioni D, Cassoni P, Bussolati G, Massobrio M. In situ hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary. *Gynecol Endocrinol.* 1996;10(3):177-86.
96. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(3):537-51.
97. Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2006;231(2):151-7.
98. Lindgren PR, Cajander S, Backstrom T, Gustafsson JA, Makela S, Olofsson JI. Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;221(1-2):97-104.
99. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology.* 2004;50(1):3-22.
100. Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol.* 2008;111(1):144-51.
101. Drummond AE, Fuller PJ. Ovarian actions of estrogen receptor-beta: an update. *Semin Reprod Med.* 2012;30(1):32-8.
102. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(8):597-608.
103. Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 2008;22(9):2085-98.
104. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005;307(5715):1625-30.
105. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene

- (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*. 1997;45(3):607-17.
106. Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol*. 2011;164 Suppl 1:S1-324.
107. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:165-90.
108. Prossnitz ER, Sklar LA, Oprea TI, Arterburn JB. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(3):116-23.
109. Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*. 2010;204(2):105-14.
110. Girgert R, Emons G, Grundker C. Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2012.
111. Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2009;89(3-4):89-97.
112. Olde B, Leeb-Lundberg LM. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(8):409-16.
113. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*. 2002;16(1):70-84.
114. Kanda N, Watanabe S. 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J Invest Dermatol*. 2004;123(2):319-28.
115. Kamanga-Sollo E, White ME, Chung KY, Johnson BJ, Dayton WR. Potential role of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) in estradiol-17beta-stimulated IGF-I mRNA expression in bovine satellite cell cultures. *Domest Anim Endocrinol*. 2008;35(3):254-62.
116. Kanda N, Watanabe S. 17Beta-estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Invest Dermatol*. 2003;121(4):771-80.
117. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004;279(26):27008-16.
118. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene

- expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308(1-2):32-8.
119. Wang D, Hu L, Zhang G, Zhang L, Chen C. G protein-coupled receptor 30 in tumor development. *Endocrine.* 2010;38(1):29-37.
120. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005;146(2):624-32.
121. Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, et al. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2006;12(21):6359-66.
122. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews Endocrinology.* 2011;7(12):715-26.
123. Smith HO, Leslie KK, Singh M, Qualls CR, Revankar CM, Joste NE, et al. GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(4):386 e1-9; discussion e9-11.
124. Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee SJ, et al. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;114(3):465-71.
125. Kolkova Z, Casslen V, Henic E, Ahmadi S, Ehinger A, Jirstrom K, et al. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) does not predict survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2012;5:9.
126. Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, et al. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(4):1859-66.
127. Kraemer S, Jaeger WH, Lang N. Growth regulation effects of gonadotropin induced steroidogenic response in human ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2001;21(3B):2005-10.
128. Wimalasena J, Meehan D, Dostal R, Foster JS, Cameron M, Smith M. Growth factors interact with estradiol and gonadotropins in the regulation of ovarian cancer cell growth and growth factor receptors. *Oncol Res.* 1993;5(8):325-37.
129. Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Pichon C, Milgrom E. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry.* 1996;35(5):1358-66.
130. Wang C, Prossnitz ER, Roy SK. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and steroid hormones. *Endocrinology.* 2007;148(10):4853-64.

131. Pavlik R, Wypior G, Hecht S, Papadopoulos P, Kupka M, Thaler C, et al. Induction of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) and nuclear steroid hormone receptors by gonadotropins in human granulosa cells. *Histochem Cell Biol.* 2011;136(3):289-99.
132. Heublein S, Mayr D, Vrekoussis T, Friese K, Hofmann SS, Jeschke U, et al. The G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) is a gonadotropin receptor dependent positive prognosticator in ovarian carcinoma patients. *PloS one.* 2013;8(8):e71791.
133. Olivares A, Mendez JP, Zambrano E, Cardenas M, Tovar A, Perera-Marin G, et al. Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen Comp Endocrinol.* 2010;166(2):356-64.
134. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J.* 1963;89:114-23.
135. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
136. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
137. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(15):6419.
138. Leung PC, Choi JH. Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer. *Hum Reprod Update.* 2007;13(2):143-62.
139. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology.* 2001;142(6):2351-60.
140. Lenhard M, Tereza L, Heublein S, Ditsch N, Himsl I, Mayr D, et al. Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer: progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival. *BMC Cancer.* 2012;12:553.
141. Heublein S, Lenhard M, Vrekoussis T, Schoepfer J, Kuhn C, Friese K, et al. The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in normal human ovaries and is upregulated in ovarian endometriosis and pelvic inflammatory disease involving the ovary. *Reprod Sci.* 2012;19(11):1197-204.
142. Heublein S, Mayr D, Friese K, Jarrin-Franco MC, Lenhard M, Mayerhofer A, et al. The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in ovarian granulosa cell tumors. *International journal of molecular sciences.* 2014;15(9):15161-72.

143. Wang C, Lv X, He C, Hua G, Tsai MY, Davis JS. The G-protein-coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian cancer cells by blocking tubulin polymerization. *Cell Death Dis.* 2013;4:e869.
144. Vivacqua A, Lappano R, De Marco P, Sisci D, Aquila S, De Amicis F, et al. G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2009;23(11):1815-26.
145. Recchia AG, De Francesco EM, Vivacqua A, Sisci D, Panno ML, Ando S, et al. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2011;286(12):10773-82.
146. Heublein S, Vrekoussis T, Kuhn C, Friese K, Makrigiannakis A, Mayr D, et al. Inducers of G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in endometriosis: potential implications for macrophages and follicle maturation. *Journal of reproductive immunology.* 2013;97(1):95-103.
147. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Pezzi V. Role of estrogen receptors and g protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:1.
148. Al-Alem LF, McCord LA, Southard RC, Kilgore MW, Curry TE, Jr. Activation of the PKC pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and expression of MMP7 and MMP10. *Biol Reprod.* 2013;89(3):73.
149. Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Yura Y, Tsuruta Y, Hamid AA, et al. Human chorionic gonadotropin (hCG) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells: possible role of up-regulation of insulin-like growth factor-1 by hCG. *Int J Cancer.* 1998;76(4):571-8.
150. Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;228(1-2):67-78.
151. O'Donnell AJ, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP. Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(4):851-66.
152. Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev.* 2007;28(4):440-61.
153. Huang CF, Liu DY, Xu WH, Shen K. [Protective effect of follicle stimulating hormone on apoptosis of human epithelial ovarian cancer cell induced by cisplatin]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2003;25(4):443-6.
154. Wang J, Luo F, Lu JJ, Chen PK, Liu P, Zheng W. VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *Int J Cancer.* 2002;97(2):163-7.

155. Huang Y, Jin H, Liu Y, Zhou J, Ding J, Cheng KW, et al. FSH inhibits ovarian cancer cell apoptosis by up-regulating survivin and down-regulating PDCD6 and DR5. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(1):13-26.
156. Cui J, Miner BM, Eldredge JB, Warrenfeltz SW, Dam P, Xu Y, et al. Regulation of gene expression in ovarian cancer cells by luteinizing hormone receptor expression and activation. *BMC Cancer*. 2011;11:280.
157. Kim SN, Ahn YH, Kim SG, Park SD, Cho-Chung YS, Hong SH. 8-Cl-cAMP induces cell cycle-specific apoptosis in human cancer cells. *Int J Cancer*. 2001;93(1):33-41.