

LABORATORIO DE ESTEROIDES

Efectos gonadales y extra-gonadales de la hipersecreción de la hormona gonadotrofina coriónica humana: evaluación en un modelo de ratones transgénicos.

Gonadal and extra-gonadal effects of human chorionic gonadotropin hypersecretion: evaluation in a transgenic mouse model

Efeitos gonadais e extra-gonadais da hipersecreção do hormônio gonadotrofina coriônica humana: avaliação num modelo de camundongos transgênicos

Susana B. Rulli, Laura D. Ratner, Guillermina Stevens, Betina González, Ricardo S. Calandra

Resumen

Nuestro grupo de investigación está enfocado en estudiar los efectos gonadales y extra-gonadales que ejerce la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) sobre la función endocrina y reproductiva, particularmente en condiciones de secreción desregulada y persistente. La tecnología transgénica ha resultado ser una herramienta fundamental a la hora de proveer nuevas evidencias sobre el rol de las gonadotrofinas en la patofisiología reproductiva. En este sentido, los ratones transgénicos hipersecretores de hCG han resultado un excelente modelo para llevar a cabo dichas investigaciones. Hemos realizado estudios de caracterización del modelo, que nos han permitido tener un profundo conocimiento del mismo e identificar un gran número de anomalías en distintos niveles de regulación endocrina, que serán el foco de atención en futuras investigaciones. Las mismas tienen un considerable potencial en el campo de la biomedicina, ya que ayudarán a identificar los mecanismos regulatorios afectados por un estímulo disruptivo como puede ser una hipersecreción hormonal, y permitirán la exploración de nuevas estrategias terapéuticas que interfieran en las patologías endocrinas asociadas. Nuestras investigaciones sobre el modelo de hipersecreción crónica de hCG en ratones muestran claramente que niveles elevados y persistentes de esta hormona promueven múltiples anomalías endocrinas que están acompañadas de tumores gonadales y extra-gonadales.

Palabras clave: gonadotrofina coriónica humana * ratones transgénicos * reproducción * hormona * tumores

Summary

This investigation is focused in studying the gonadal and extra-gonadal effects that the human chorionic gonadotropin hormone (hCG) exerts on endocrine and reproductive functions, particularly under deregulated and persistent secretion conditions. Transgenic technology has turned out to be a fundamental tool when providing new evidences on the role of gonadotropins in reproductive physiopathology. In this sense, transgenic mice hCG hypersecretion has been an excellent model to perform these investigations. Characterization studies of the model have been developed to identify a great number of anomalies in different levels of endocrine regulation, which will be the center of attention in subsequent investigations. These have a considerable potential in the field of biomedicine and will help to identify the regulatory mechanisms affected by a disruptive stimulus, such as hormonal hypersecretion, and will enable the exploration of new therapeutic strategies to interfere with endocrine pathologies. Our investigations on the model of chronic hypersecretion of hCG in mice show clearly that high and persistent levels of this hormone promote manifold endocrine anomalies that are accompanied by gonadal and extra-gonadal tumors.

Key words: human chorionic gonadotropin * transgenic mice * reproduction * hormone * tumors

Resumo

Nosso grupo de pesquisa está focado em estudar os efeitos gonadais e extra-gonadais que exerce o hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre a função endócrina e reprodutiva, particularmente em condições de secreção desregulada e persistente. A tecnologia transgênica tem resultado ser uma ferramenta fundamental na hora de fornecer novas evidências sobre o papel das gonadotrofinas na patofisiologia reprodutiva. Nesse sentido, os camundongos transgênicos hipersecretores de hCG têm resultado um excelente modelo para levar a cabo tais pesquisas. Temos realizado estudos de caracterização do modelo, que nos têm permitido ter um profundo conhecimento do mesmo e identificar um grande número de anomalias em diferentes níveis de regulação endócrina, que serão o foco de atenção em futuras pesquisas. As mesmas têm um considerável potencial no campo da biomedicina, visto que ajudarão a identificar os mecanismos regulatórios afetados por um estímulo disruptivo como pode ser uma hipersecreção hormonal, e permitirão a exploração de novas estratégias terapêuticas que interfiram nas patologias endócrinas associadas. Nossas pesquisas sobre o modelo de hipersecreção crônica de hCG em camundongos mostram claramente que níveis elevados e persistentes deste hormônio promovem múltiplas anomalias endócrinas que estão acompanhadas de tumores gonadais e extra-gonadais.

Palavras chave: gonadotrofina coriônica humana * camundongos transgênicos * reprodução * hormônio * tumores

El eje hipotálamo-hipófiso-gonadal es el pilar fundamental en la regulación endocrina de la función reproductiva. Cualquier alteración en la regulación de las diferentes hormonas o receptores involucrados en el funcionamiento de este eje puede provocar cambios en el inicio de la pubertad, infertilidad, y también cáncer, desórdenes metabólicos o disfunciones cardiovasculares. La acción fisiológica de las gonadotropinas está bien caracterizada y se sabe que son esenciales en la foliculogénesis, ovulación y esteroidogénesis en las hembras, y en el desarrollo testicular, espermatogénesis y esteroidogénesis en los machos. Existen condiciones fisiológicas y patológicas donde la secreción y/o acción de las gonadotropinas están elevadas. Por ejemplo, durante el primer trimestre de embarazo, cuando la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) es esencial en el mantenimiento de la preñez y la masculinización del feto (1). La posmenopausia es una condición fisiológica donde las mujeres están expuestas a niveles elevados de gonadotropinas durante décadas, y se ha propuesto que éste es un factor de riesgo para el desarrollo de tumores de ovario (2). Por último, condiciones patológicas con elevada secreción/acción de gonadotropinas incluye tumores hipofisarios, mutaciones activantes de sus receptores, síndrome de ovario poliquístico, enfermedades trofoblásticas y tumores testiculares.

La tecnología transgénica ha resultado ser una herramienta fundamental a la hora de proveer nuevas evidencias sobre el rol de las gonadotropinas en la fisiología reproductiva. La hCG, normalmente secretada por la placenta, está estructural y funcionalmente relacionada con la hormona luteinizante (LH), y produce el mismo efecto biológico a través de la unión a un mismo receptor, estimulando la esteroidogénesis gonadal. Los descubrimientos que vinculan a la acción de LH con actividad de promotor tumoral, fueron el incentivo para esclarecer las consecuencias fenotípicas de una acción aumentada de LH/hCG (3-8). Con el fin de lograr una elevada actividad de LH/hCG circulante, se han desarrollado dos líneas de ratones transgénicos que sobreexpresan hCG: 1) simple transgénicos portadores del gen de la subunidad β de hCG (hCG β +); 2) doble transgénicos portadores de los genes de las subunidades α y β de hCG (hCG $\alpha\beta$ +). Ambos transgenes se encuentran bajo el promotor universal Ubiquitina C.

Nuestro grupo de investigación está enfocado en estudiar los efectos gonadales y extra-gonadales que ejerce la hCG sobre la función endócrina y reproductiva, particularmente en condiciones de secreción desregulada y persistente. En este sentido, los ratones transgénicos hipersecretadores de hCG han resultado un excelente modelo para llevar a cabo dichas investigaciones. Estos animales se han desarrollado en la Universidad de Turku, Finlandia, bajo la dirección y coordinación de los Dres. I. Huhtaniemi y M. Poutanen, con quienes se mantiene una activa colaboración. Hemos realizado estudios

de caracterización del modelo, que nos han permitido tener un profundo conocimiento del mismo e identificar un gran número de anomalías en distintos niveles de regulación endocrina, que serán el foco de atención en futuras investigaciones. Las mismas tienen un considerable potencial en el campo de la biomedicina, ya que ayudarán a identificar los mecanismos regulatorios afectados por un estímulo disruptivo como puede ser una hipersecreción hormonal, y permitirán la exploración de nuevas estrategias terapéuticas que interfieran en las patologías endocrinas asociadas.

Hemos descrito que en el modelo de ratones transgénicos hCG β + se producen moderados niveles de hCG bioactiva, producto de la dimerización de la subunidad hCG β transgénica y la subunidad α expresada endógenamente en la hipófisis (9)(10). Mientras que los machos hCG β + son fértiles, las hembras presentan pubertad precoz y son infértiles debido a alteraciones en el ciclo estral y defectos en la estructura uterina. Los ovarios se muestran con quistes hemorrágicos ocasionales y altamente luteinizados como consecuencia de la activa estimulación con hCG. Estos animales producen elevados niveles circulantes de andrógenos, estrógenos y progesterona desde edades tempranas del desarrollo sexual. Se han detectado también varios fenotipos extragonadales en este modelo: a edades avanzadas, las hembras desarrollan hiperprolactinemia acompañada de macroprolactinomas y tumores mamarios metastásicos (9)(11)(12). Los complejos cambios hormonales, y consecuentemente el desarrollo de dichos tumores se atribuyen a la hiperestimulación crónica del ovario por hCG, ya que la ovariectomía impide su formación, a pesar de mantener una persistente y elevada secreción de hCG.

El modelo de ratones doble transgénicos hCG $\alpha\beta$ + produce una excesiva secreción de la forma dimérica bioactiva de hCG (3)(4)(10)(13). Esta condición permitió identificar fenotipos patológicos que no se habían manifestado en el modelo de simples transgénicos con moderada expresión de hCG. Hemos observado que las hembras también presentan pubertad precoz, infertilidad y significativas alteraciones en el perfil de hormonas esteroideas circulantes desde edades tempranas de la maduración sexual. La principal característica que diferencia este modelo con el del simple transgénico es el desarrollo de tumores de ovario de tipo teratoma (3)(4). Al inicio de la edad adulta, hemos detectado la presencia de células gigantes del trofoblasto en el ovario hCG $\alpha\beta$ +, normalmente involucradas en la implantación del feto y vascularización de la decidua materna, así como la formación de una masa tumoral compuesta de tejidos derivados de las tres capas embrionarias, que imita desordenadamente el desarrollo embrionario. Estos tumores surgen a partir de la activación partenogenética de los ovocitos dentro del ovario. Hemos analizado si el desarrollo tumoral está influenciado por la acción de los esteroides

gonadales producidos en exceso por dichos ovarios, a través de tratamientos *in vivo* con el antiandrógeno flutamida, el antiestrógeno fulvestrant y el antiprogéstano mifepristone en ratones hembras hCG $\alpha\beta$ + (14). Si bien los tratamientos antihormonales no lograron impedir la activación teratogénica, los mismos tuvieron un claro efecto sobre la progresión tumoral, frenando el crecimiento explosivo del teratoma. Por otra parte, hemos estudiado la capacidad ovulatoria y la expresión de distintos factores involucrados en la ovulación en hembras inmaduras hCG $\alpha\beta$ + sometidos a un protocolo de inducción de la ovulación con PMSG/hCG. Observamos que el mecanismo de ovulación resultó significativamente afectado en las hembras transgénicas, indicando que niveles elevados de hCG estarían produciendo una alteración en la correcta expresión de los factores involucrados en el proceso de señalización intrafolicular, que conllevaría a la anovulación (15).

En cuanto a los machos, la hipersecreción crónica de hCG causa hiperplasia/hipertrofia de las células de Leydig de origen fetal, hiperandrogenismo, infertilidad y severas alteraciones en los órganos reproductivos masculinos (10)(13). Hemos demostrado además, que la hipersecreción de hCG en machos produce una inhibición persistente sobre la síntesis y secreción de FSH, a través de alteraciones a nivel de la hipófisis y del hipotálamo, que no revierten con la castración o con el bloqueo de la acción androgénica por flutamida (16). Dado que la sobreexpresión de hCG en este modelo ocurre desde el estadio fetal, este efecto se debería a una mayor exposición a esteroides del sistema neuroendócrino durante etapas tempranas de diferenciación sexual, revelando nuevos roles de los andrógenos y/o sus metabolitos producidos localmente en la (des)regulación de la unidad hipotálamo-hipofisaria masculina.

Nuestras investigaciones sobre el modelo de hipersecreción crónica de hCG muestran claramente que niveles elevados y persistentes de esta hormona promueven en ratones múltiples anomalías endocrinas que están acompañadas de tumores gonadales y extra-gonadales.

Estas investigaciones han sido financiadas con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y Fundación Roemmers.

Referencias bibliográficas

- Huhtaniemi I. Fetal testis-a very special endocrine organ. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 25-31.
- Konishi I Gonadotropins and ovarian carcinogenesis: a new era of basic research and its clinical implications. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 16-22.
- Rulli SB, Huhtaniemi I. What have gonadotrophin overexpressing transgenic mice taught us about gonadal function? *Reproduction* 2005; 130: 283-91.
- Huhtaniemi I, Rulli S, Ahtiainen P, Poutanen M. Multiple sites of tumorigenesis in transgenic mice overproducing hCG. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234: 117-26.
- Huhtaniemi I, Ahtiainen P, Pakarainen T, Rulli SB, Zhang FP, Poutanen M. Genetically modified mouse models in studies of luteinising hormone action. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 252: 126-35.
- Ahtiainen P, Rulli S, Pakarainen T, Zhang FP, Poutanen M, Huhtaniemi I. Phenotypic characterisation of mice with exaggerated and missing LH/hCG action. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 262: 55-63.
- Pakarainen T, Ahtiainen P, Zhang FP, Rulli S, Poutanen M, Huhtaniemi I. Extragonadal LH/hCG action- Not yet time to rewrite textbooks. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 269: 9-16.
- Peltoketo H, Zhang FP, Rulli SB. Animal models for aberrations of gonadotropin action. *Rev Endocr Metab Disord* 2011 (en prensa).
- Rulli SB, Kuorelahti AI, Karaer O, Pelliniemi L, Poutanen M, Huhtaniemi IT. Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2002; 143: 4084-95.
- Rulli SB, Ahtiainen P, Makela S, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi IT. Elevated steroidogenesis, defective reproductive organs and infertility in transgenic male mice overexpressing human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2003; 144: 4980-90.
- Kuorelahti A, Rulli S, Huhtaniemi I, Poutanen M. hCG upregulates wnt5b and wnt7b in the mammary gland and hCG{beta} transgenic female mice present with mammary gland tumors exhibiting characteristics of the Wnt/{beta}-catenin pathway activation. *Endocrinology* 2007; 148: 3694-703.
- Ahtiainen P, Sharp V, Rulli SB, Rivero-Müller A, Mamaeva V, Røyttä, *et al.* Enhanced LH action in transgenic female mice expressing hCG β subunit induces pituitary prolactinomas; the role of high progesterone levels. *Endocrine-Related Cancer* 2010; 17: 611-21.
- Ahtiainen P, Rulli S, Pelliniemi LJ, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi I. Fetal but not adult Leydig cells are susceptible to adenoma formation in response to persistently high hCG level; a study on hCG overexpressing transgenic mice. *Oncogene* 2005; 24: 7301-9.
- Gonzalez B, Calandra RS, Poutanen M, Huhtaniemi I, Rulli SB. Expression of key steroidogenic genes and the role of androgens in the development of ovarian tumors in hCG transgenic mice. *Endocrinologia e Metabologia* 2008; 52, supl.6, S924.
- Ratner LD, Gonzalez B, Poutanen M, Huhtaniemi I, Calandra RS, Rulli SB. The ovulatory capacity and related genes are altered in transgenic mice hypersecreting the human chorionic gonadotrophin hormone (hCG). 12nd European Congress of Endocrinology, Praga, República Checa, 2010. *Endocrine Abstracts* 2010; 22: P485.
- Gonzalez B, Ratner LD, Di Giorgio NP, Poutanen M, Huhtaniemi I, Calandra RS, *et al.* Effect of chronically elevated androgens on the developmental programming of the hypothalamic-pituitary axis in male mice. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 332: 78-87.