



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EL RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBUROS EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Ursula A. Bussmann

Director de tesis: Dr. José Lino Barañao

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires 2006

Agradecimientos

Al Dr. Leonardo Bussmann, por hacer posible la realización de esta tesis, por su generosidad, por su ayuda, por compartir su sabiduría y por enseñar.

Al Dr. Lino Barañao, por la libertad que siempre me ha brindado, por su coherencia, por su respeto y su confianza.

A Juan Manuel, por su ayuda oportuna y desinteresada, por la valiosa discusión de este trabajo.

A los laboratorios del Dr. Baldi, Dra. Tellez de Iñon y Dra. Flawiá, por haberme facilitado reactivos y equipos en innumerables ocasiones; en especial al Dr. Alejandro Mladovan, por haber además dispuesto de su tiempo para escuchar mis consultas y brindarme respuestas.

A Inés, por su colaboración entusiasta en la edición de este manuscrito.

A mamá y a papá, por haberme apoyado siempre e incondicionalmente, por haber hecho posible la realización de mi doctorado y por acompañar mi desarrollo individual con amor y respeto.

El receptor de aril hidrocarburos en la regulación de la función ovárica

Resumen

El objetivo del presente trabajo de tesis es estudiar el rol del receptor de aril hidrocarburos (AHR) en la función de las células ováricas. En particular, la investigación se centró en evaluar la acción de la activación del AHR sobre la proliferación de células de la granulosa y establecer a su vez la regulación de la expresión del propio receptor. El modelo utilizado consistió en células de la granulosa inmaduras de rata cultivadas en condiciones definidas. Se pudo establecer que distintos ligandos del AHR son capaces de regular la proliferación de células de la granulosa a través de modulaciones en las acciones de las hormonas clásicas. Se determinó la existencia de un novedoso sinergismo entre el AHR y el receptor de estrógenos activados por sus agonistas, el cual impacta sobre la respuesta proliferativa de las células de la granulosa pero no se verifica a nivel de la transcripción inducida por ninguno de los receptores. Por otro lado, se estableció que FSH y estradiol son importantes moduladores de la expresión del AHR en células de la granulosa, obteniéndose evidencia de que podrían ser factores endógenos claves asociados al ciclo reproductivo que regulan la expresión del receptor *in vivo*. Además, mientras los ligandos del AHR inducen rápidamente degradación proteasomal del receptor, atenuando la señal, promueven a la vez un aumento en sus transcritos a tiempos prolongados de exposición.

Los resultados tomados en conjunto indican que el AHR jugaría un papel clave en la regulación del crecimiento de las células ováricas y que su expresión es modulada por hormonas clásicas y por sus propios ligandos, lo cual constituye una forma de regular su función.

Palabras claves:

Células de la granulosa

Proliferación

Receptor de aril hidrocarburos

Receptor de estrógenos

Estradiol

β -naftoflavona

Role of the aryl hydrocarbon receptor in the regulation of ovarian function

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in ovarian cell function. Specifically, we focused on analyzing the effect of AHR activation on granulosa cell proliferation and establishing the regulation that AHR expression might undergo in the ovary. The experimental system consisted of rat immature granulosa cells cultured under defined conditions. Different AHR ligands showed the ability to regulate granulosa cell proliferation through modulation of the actions exerted by classical hormones. Moreover, a novel synergism between ligand-activated AHR and ligand-activated estrogen receptor is described, which impacts on granulosa cell proliferative response but does not take place at the transcriptional level. Besides, the results of the present study indicate that FSH and estradiol are important modulators of AHR expression in granulosa cells, pointing out that these hormones would be crucial cycle-associated endogenous factors that regulate AHR levels *in vivo*. In addition, while ligands of this receptor rapidly down-regulate AHR protein via proteasomal degradation in granulosa cells, attenuating the signal, they induce the mRNA levels for the receptor when incubation is allowed to proceed longer. Collectively, the results presented herein indicate that AHR would play an important role in the regulation of ovarian cell proliferation and that the expression of this receptor is modulated by classical hormones and by its own ligands, which constitutes a way of regulating AHR function.

Key words:

Granulosa cells

Proliferation

Aryl hydrocarbon receptor

Estrogen receptor

Estradiol

β -naphthoflavone

Abreviaturas

[³ H]- Timidina	timidina tritiada
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AHR	proteína del receptor de aril hidrocarburos
<i>Ahr</i>	gen del receptor de arill hidrocarburos
	transcriptos del receptor de aril hidrocarburos
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BSA	albúmina sérica bovina
cpm	cuentas por minuto
Cys	cisteína
DES	dietilstilbestrol
DMEM	medio Eagle modificado Dulbecco
EGTA	ácido etilén-glicol-bis(β -aminoetiléter) tetraacético
ES	error estándar
FSH	hormona folículo estimulante
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)1-piperazin etansulfónico
Hsp	proteína de choque térmico

Abreviaturas

kD	kilodalton
LH	hormona luteinizante
oFSH-20	FSH ovina estándar 20 del NIDDK
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RIA	radioinmunoensayo
Ser	serina
Thr	treonina
UV	ultravioleta

Los resultados presentados en esta tesis han formado parte de los siguientes trabajos:

An aryl hydrocarbon receptor agonist amplifies the mitogenic actions of estradiol in granulosa cells: evidence of involvement of the cognate receptors.

Bussmann U.A., Bussmann L.E., Baranao, J.L.

Biology of Reproduction 74(2):417-426 (2006).

Regulation of aryl hydrocarbon receptor expression in rat granulosa cells.

Bussmann U.A., Baranao J.L.

En revisión en Endocrinology.

1.	<i>Introducción general</i>	1
1.1.	<i>EL receptor de aril hidrocarburos (AHR)</i>	2
1.1.1.	<i>Estructura del AHR</i>	2
1.1.2.	<i>Señalización a través del AHR</i>	5
1.1.3.	<i>Respuestas inducidas por la activación del AHR</i>	8
1.2.	<i>Desarrollo folicular ovárico</i>	9
1.2.1.	<i>Formación del folículo primordial</i>	10
1.2.2.	<i>Iniciación de la foliculogénesis</i>	13
1.2.3.	<i>Crecimiento del folículo secundario o preantral</i>	14
1.2.4.	<i>Desarrollo del folículo terciario o antral</i>	14
1.2.5.	<i>Atresia folicular</i>	19
1.2.6.	<i>Cinética del crecimiento folicular</i>	19
1.2.7.	<i>Folículo preovulatorio y ovulación</i>	20
1.2.8.	<i>Regulación del desarrollo folicular</i>	21
1.2.8.1.	<i>Gonadotrofinas</i>	22
1.2.8.2.	<i>Estrógenos</i>	25
1.2.8.2.1.	<i>Acciones clásicas y acciones no genómicas de los estrógenos</i>	25
1.2.8.2.2.	<i>Catecolestrógenos</i>	28
1.2.8.3.	<i>Reguladores peptídicos intraováricos</i>	31
1.2.8.4.	<i>Regulación por ligandos del AHR</i>	33
1.3.	<i>Modelo experimental: cultivos primarios de células de la granulosa</i>	34
1.4.	<i>Objetivos</i>	36
2.	<i>Materiales y Métodos</i>	39
2.1.	<i>Reactivos</i>	40
2.2.	<i>Obtención y cultivo de células de la granulosa</i>	40
2.2.1.	<i>Incorporación de timidina</i>	41

2.2.2.	<i>Transfecciones transitorias para ensayos de activación de transcripción y para sobre-expresión del AHR.....</i>	41
2.2.3.	<i>Procedimiento de lavado de β -naftoflavona.....</i>	42
2.3.	<i>Ensayo de actividad luciferasa.....</i>	42
2.4.	<i>Inmunofluorescencia.....</i>	43
2.5.	<i>Extracción de ARNm y RT-PCR semi-cuantitativa.....</i>	43
2.6.	<i>Preparación de extractos celulares y Western Blot.....</i>	44
2.7.	<i>Determinación de niveles de estradiol.....</i>	46
2.8.	<i>Análisis estadístico.....</i>	46
3.	<i>Módulo I Acción del receptor de aril hidrocarburos sobre la función de las células de la granulosa.....</i>	47
3.1.	<i>Introducción.....</i>	48
3.2.	<i>Objetivos.....</i>	59
3.3.	<i>Resultados.....</i>	60
3.3.1.	<i>Efecto de ligandos del AHR sobre la proliferación de las células de la granulosa.....</i>	60
-	<i>Efecto de 3-indolacético sobre la proliferación.....</i>	60
-	<i>Efecto de índigo sobre la proliferación.....</i>	61
-	<i>Efecto de indol-3-carbinol sobre la proliferación.....</i>	63
-	<i>Efecto de triptofano sobre la proliferación.....</i>	63
-	<i>Efecto de 3-metil-colantreno sobre la proliferación.....</i>	65
-	<i>Efecto de β -naftoflavona sobre la proliferación.....</i>	66
-	<i>Efecto de α -naftoflavona sobre la proliferación.....</i>	68
-	<i>Caracterización de β -naftoflavona en términos de su capacidad de actuar como agonista del AHR.....</i>	70
-	<i>Participación del AHR y del receptor de estrógenos en la acción comitogénica de estradiol y β -naftoflavona.....</i>	75
-	<i>Efecto de β -naftoflavona sobre la transcripción inducida por estrógenos.....</i>	79

3.3.2.	<i>Efecto de ligandos del AHR sobre los niveles de estradiol en células de la granulosa</i>	81
	- Efecto de β -naftoflavona sobre los niveles de estradiol.....	81
	- Efecto de α -naftoflavona sobre los niveles de estradiol.....	81
	- Efecto de 3-indolacético sobre los niveles de estradiol.....	82
3.3.3.	<i>Efecto de los catecolestrógenos sobre la proliferación de células de la granulosa</i>	83
	- Efecto de 2-hidroxiestradiol sobre la proliferación.....	83
	- Efecto de 2-metoxiestradiol sobre la proliferación.....	84
	- Efecto de 4-hidroxiestradiol sobre la proliferación.....	84
3.4.	<i>Discusión</i>	87
4.	<i>Módulo II Regulación de la expresión del receptor de aril hidrocarburos en células de la granulosa</i>	97
4.1.	<i>Introducción</i>	98
4.2.	<i>Objetivos</i>	101
4.3.	<i>Resultados</i>	102
4.3.1.	<i>Regulación de los niveles de proteína AHR por las hormonas FSH y estradiol</i>	102
4.3.2.	<i>Regulación de los niveles de ARNm de Ahr por las hormonas FSH y estradiol</i>	105
4.3.3.	<i>Participación de la degradación proteasomal en la regulación de la expresión del AHR por hormonas a las 12 h de estimulación</i>	107
4.3.4.	<i>Regulación de los niveles de expresión de la proteína AHR por el agonista β -naftoflavona</i>	109
4.3.5.	<i>Regulación de los niveles de ARNm de Ahr por β -naftoflavona</i>	114
4.3.6.	<i>Recuperación de los niveles de expresión de proteína AHR</i>	117
4.3.7.	<i>Participación de la degradación proteasomal en la regulación de la proteína AHR por β -naftoflavona</i>	120
4.3.8.	<i>Efecto de la degradación proteasomal del AHR sobre la respuesta mediada por el receptor</i>	123

4.3.9. Efecto de la remoción de β -naftoflavona en las respuestas mediadas por el AHR.....	125
4.4. Discusión.....	128
5. Discusión general.....	135
6. Conclusiones.....	139
7. Referencias.....	142

1. Introducción general

1.1. EL receptor de aril hidrocarburos

El receptor de aril hidrocarburos (AHR) es una antigua proteína que se originó hace más de 550 millones de años. Este receptor y sus homólogos se expresan ampliamente y en forma ubicua en diversos tejidos de diferentes grupos de vertebrados e invertebrados.

El AHR media la mayor parte de los efectos tóxicos de contaminantes ambientales como las dioxinas y otros hidrocarburos xenobióticos, desencadenando respuestas detoxificantes. El hecho de que esta proteína se encuentre conservada en grupos tan disímiles sugiere una importante función a través de la evolución (revisado en Hahn, 1998; Butler *et al.*, 2001).

1.1.1. Estructura del receptor de aril hidrocarburos

Las propiedades moleculares del AHR son similares a las descritas para la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas y tiroidea. Éstas son proteínas de unión al ADN que poseen dedos de zinc y actúan como factores de transcripción inducidos por ligandos, transactivando sus genes blanco (Evans, 1988). Sin embargo, la estructura de la proteína AHR es significativamente distinta a la de las pertenecientes a la superfamilia antes mencionada (Swanson y Bradfield, 1993; Dolwick *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1993).

El gen *Ahr* se localiza en el cromosoma 7 en humanos, en el 6 en ratas y en el cromosoma 12 en ratones, constando de 12, 8 u 11 exones en las distintas especies, respectivamente. Dichos genes y homólogos en una amplia variedad de especies han sido clonados y secuenciados (ver revisiones en Hahn, 1988; Hahn *et al.*, 1997), reportándose que la proteína consta de 848 aminoácidos en humanos y en ratón, y de 853 aminoácidos en rata. Su peso molecular varía entre 95 y 105 KDa, dependiendo de la especie e incluso de la cepa en análisis.

Por medio de ensayos de deleciones de este gen, se han identificado varios dominios estructurales/funcionales a nivel proteico (Figura 1.1). La secuencia N-terminal contiene un dominio básico HLH (bHLH), el cual es indispensable para el reconocimiento de las secuencias específicas consenso en el ADN (elementos de respuesta a xenobióticos o dioxina, XRE o DRE), está implicado en la dimerización con su pareja nuclear ARNT (translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburos, proteína también perteneciente al grupo bHLH/PAS), en la interacción con Hsp90 y contiene secuencias importantes tanto para la localización nuclear del AHR (NLS) como para su exportación desde el núcleo (NES). Hsp90, una molécula chaperona, es importante para el correcto plegamiento del

dominio de unión al ligando del AHR y para regular la localización nuclear del complejo de señalización del receptor. La proteína AHR contiene además un dominio PAS, que es la única otra característica común a todas las proteínas bHLH-PAS, llamado así luego de las primeras tres proteínas identificadas con este motivo, Per en *Drosophila*, ARNT en humanos y Sim en *Drosophila* (Nambu *et al.*, 1991). El dominio PAS consta de 260–310 aminoácidos e incluye dos repeticiones hidrofóbicas bien conservadas llamadas PAS-A y PAS-B, las cuales se encuentran separadas por un espaciador pobremente conservado (Figura 1.1 A). En general, el dominio PAS no está bien conservado y, dado su tamaño y su diversidad en secuencia, puede mediar diversas funciones bioquímicas. Importantes funciones de este dominio son facilitar la selección de pareja durante la formación de heterodímeros bHLH-PAS (Huang *et al.*, 1993), unir moléculas como los propios ligandos o la proteína Hsp90, y también conferir la especificidad hacia los genes blanco de los heterodímeros bHLH-PAS (Zelzer *et al.*, 1997). A su vez, se han identificado en la porción C-terminal de la estructura del AHR una región rica en glutamina con potentes dominios de transactivación que son independientes de ligando (Jain *et al.*, 1994; Whitelaw *et al.*, 1994) (Figura 1.1). El subdominio rico en glutamina es además necesario y suficiente para la interacción *in vitro* con los coactivadores RIP140 y SRC-1 (Kumar y Perdew, 1999; Kumar *et al.*, 1999). A su vez, este subdominio es capaz de interactuar con la proteína supresora de tumor retinoblastoma (Rb) (Ge y Elferink, 1998).

Por todo esto, se clasifica al AHR como miembro de la familia de reguladores transcripcionales “*basic helix-loop-helix*” (bHLH)-Per-ARNT-Sim (PAS).

Existe además otra proteína miembro de la familia bHLH/PAS relacionada funcionalmente con el AHR, el represor del receptor de aril hidrocarburos (AHRR). Éste es un regulador negativo del AHR que compite con él en la formación de heterodímeros con ARNT (Mimura *et al.*, 1999; Karchner *et al.*, 2002). El complejo ARNT-AHRR es capaz de unirse a los XREs pero no de transactivar genes. Por otro lado, El AHRR no es capaz de unir ligandos, probablemente debido a la presencia de un dominio PAS B truncado (Mimura *et al.*, 1999; Karchner *et al.*, 2002). Otro dominio que no es funcional en esta proteína es la región rica en glutamina. Esto podría explicar por qué el complejo AHRR-ARNT es incapaz de transactivar los genes regulados por XREs (Mimura *et al.*, 1999; Karchner *et al.*, 2002). En la figura 1.1 B se muestra un esquema de los dominios estructurales del AHRR.

Se propone la lectura de excelentes revisiones (Safe, 1995; Hankinson, 1995; Schmidt y Bradfield, 1996; Rowlands y Gustafsson, 1997; Denison *et al.*, 1998; Ma, 2001; Denison *et al.*, 2002; y las referencias allí citadas) para una descripción detallada de la estructura y función de los dominios de las proteínas AHR, ARNT y AHRR.

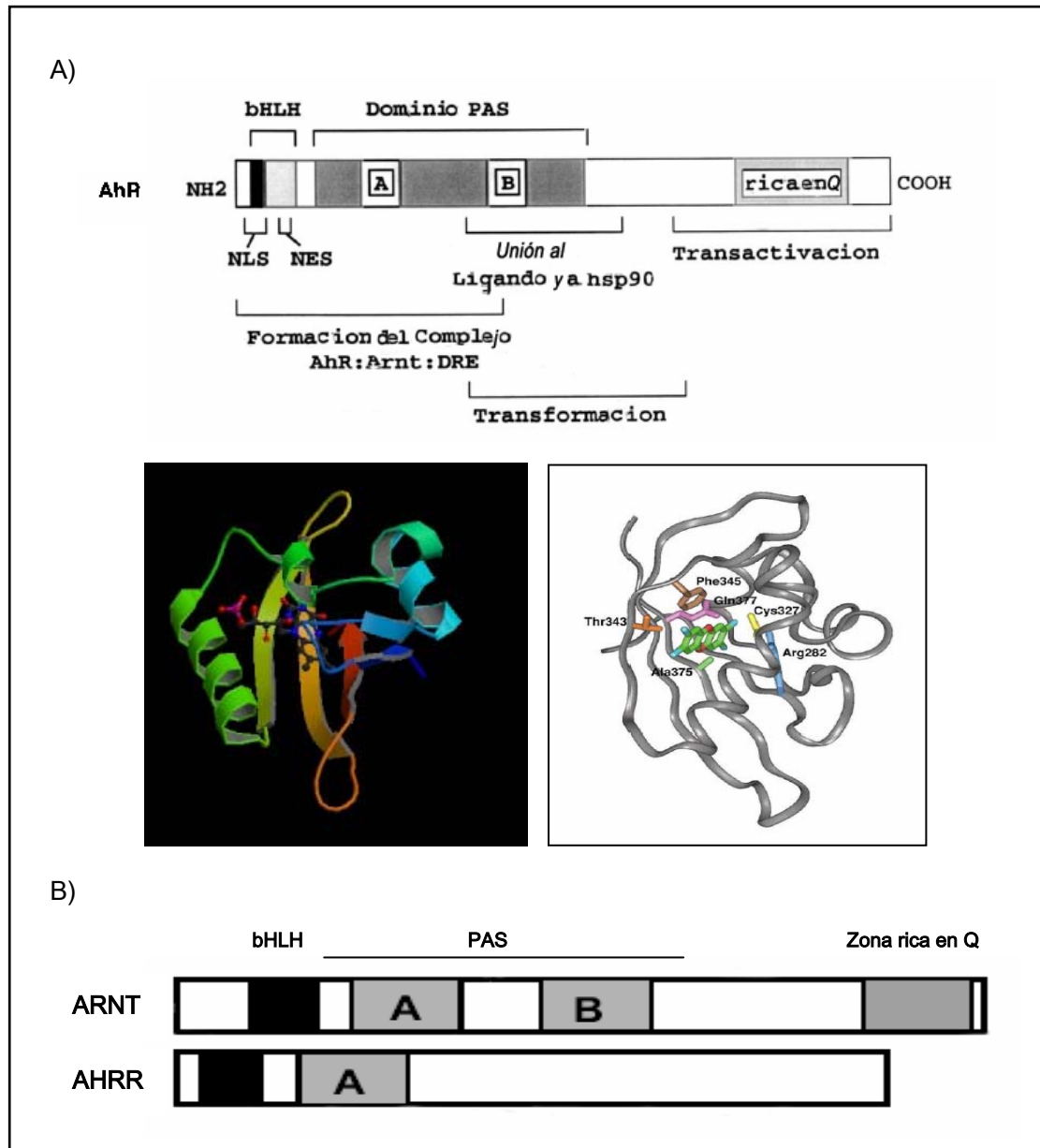


Figura 1.1. Estructura de las proteínas AHR, ARNT y AHRR. A) Panel superior: dominios estructurales de la proteína AHR. *NLS*: señal de localización nuclear, *NES*: señal de exportación nuclear, *Q*: glutamina (tomado de Denison *et al.*, 2002); panel inferior izquierdo: modelo en tres dimensiones propuesto para el receptor (extraído de RCSB ProteinDataBank); panel inferior derecho: modelo estructural del dominio de unión al ligando del AHR unido a TCDD, donde residuos azules: básicos, lila: polares, amarillos: Cys, marrón: aromáticos, verde: hidrofóbicos, naranja: Ser, Thr, gris: Prolina. TCDD está coloreado en verde (carbono), rojo (oxígeno) y celeste (cloro); tomado de Denison *et al.*, 2002. B) Dominios estructurales de las proteínas ARNT y AHRR. Adaptado de Safe, 1995 y Kewley *et al.*, 2004.

1.1.2. Señalización a través del AHR

En ausencia de ligando, el AHR se encuentra en el citoplasma de la células formando un complejo con dos moléculas de Hsp90, la proteína 2 asociada a X similar a la inmunofilina (XAP2, conocida también como ARA9 o AIP1) y algunas otras proteínas como p23 (Kazlauskas *et al.*, 1999, 2000; Meyer y Perdew, 1999; Petrusis y Perdew, 2002) (Figura 1.2). En este complejo, Hsp90 es importante para mantener al receptor en una conformación que exhibe alta afinidad para la unión de ligandos y una habilidad reprimida para unirse al ADN (Pongratz *et al.*, 1992; Whitelaw *et al.*, 1995). XAP2 se une tanto a Hsp90 como al AHR y parece estabilizar el complejo, habiendo sido también implicada en la regulación de la localización intracelular del AHR, en la protección de éste contra la degradación y en la represión de su actividad transcripcional (Ma y Whitlock, 1997; Meyer y Perdew, 1999; Kazlauskas *et al.*, 2000, 2002; Petrusis *et al.*, 2003; Hollingshead *et al.*, 2004). Por su parte, p23 pareciera tener la función de estabilizar el complejo AHR-Hsp90 en una forma inducible por el ligando (Kazlauskas *et al.*, 1999).

Se sostiene que los ligandos del AHR entran a la célula por simple difusión y se unen al dominio PAS B del AHR. Esta unión induce un cambio conformacional en el receptor que lo hace exponer su NLS (Lees y Whitelaw, 1999; Henry y Gasiewicz, 2003; Ikuta *et al.*, 2004). El complejo AHR luego se transloca al núcleo, se disocia de sus moléculas acompañantes y heterodimeriza con la proteína ARNT (Probst *et al.*, 1993; McGuire *et al.*, 1994; Denison y Nagy, 2003). La formación del heterodímero AHR-ARNT convierte el complejo a su forma de alta afinidad para la unión al ADN (Kronenberg *et al.*, 2000). Este complejo se une a sus sitios de reconocimiento específico en el ADN (XREs), los cuales están localizados río arriba de los genes blanco (Figura 1.2). Los XREs están compuestos de dos hemi-sitios, TNG y GTG, los cuales son reconocidos por el AHR y por ARNT, respectivamente (Denison *et al.*, 1988; Swanson *et al.*, 1995). Además, se ha propuesto como secuencia *enhancer* funcional a la secuencia 5'-T/GNGCGTGA/CNG/CNNN-3'. Sin embargo, se sabe actualmente que existe cierta heterogeneidad entre los distintos XREs y que diferencias de sólo un nucleótido en sus secuencias ocasionan un reconocimiento diferencial por el AHR dependiendo del ligando que tenga unido y lo haya activado (Matikainen *et al.*, 2001).

La activación génica mediada por el complejo transcripcional del AHR involucra doblado del ADN, disrupción nucleosomal e interacción con factores de transcripción y coactivadores/corepresores (Rowlands *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1999; Garrison y Denison, 2000; Beischlag *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004) (Figura 1.2).

Si bien existen numerosos genes blanco del AHR, los mejores estudiados son los que codifican para las enzimas metabolizantes de xenobióticos. Esta batería de genes consta de seis miembros en el ratón: *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Nqo*, *Aldh3a1*, *Ugt1a6* y *Gsta1* (Nebert *et al.*, 1990, 1993, 2000). A su vez, *Cyp1b1* también es regulado por el AHR (Sutter *et al.*, 1994). La mayor parte del conocimiento sobre la función del AHR deriva de los análisis del mecanismo por medio del cual su ligando prototípico 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) induce la transcripción del gen de la hidroxilasa *Cyp1a1*, tomada como paradigma de gen respondedor al AHR. Este gen codifica para la enzima microsomal citocromo P4501A1, quien entre otras funciones, oxigena varios xenobióticos como parte de su detoxificación en pasos (Conney, 1982). La activación transcripcional de los miembros de la familia P450 se conoce ampliamente (como ejemplos, ver revisión por Safe, 1995; Pocar *et al.*, 2005; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005).

Dentro de los genes que son regulados transcripcionalmente por el AHR, se encuentra también el AHRR. Este represor es inducido por ligandos del AHR, por lo que el AHR y el AHRR forman un circuito regulador de retroalimentación negativa dentro del camino de señalización del AHR (Mimura y Fujii-Kuriyama, 2003).

Como consecuencia de la actividad transcripcional del AHR puede regularse la expresión de múltiples proteínas, dando lugar a un sinnúmero de respuestas pleiotrópicas inducidas por la activación del AHR en los diversos tejidos.

Además del clásico mecanismo de activación génica descrito arriba, se han propuesto rutas adicionales para las acciones mediadas por el AHR. Estas explicarían observaciones de efectos rápidos de ligandos del AHR que ocurren incluso en sistemas libres de células en ausencia de núcleos, y que no pueden ser explicados por cambios transcripcionales. Estas vías involucrarían cambios en la incorporación de Ca^{2+} , interacciones con otras vías de transducción activadas, por ejemplo, por factores de crecimiento u hormonas esteroideas, y fosforilaciones de proteínas. Estas señales llevarían a distintas respuestas, y pueden ser consideradas como rutas de señalización del AHR separadas de la bien establecida vía dependiente de la translocación nuclear.

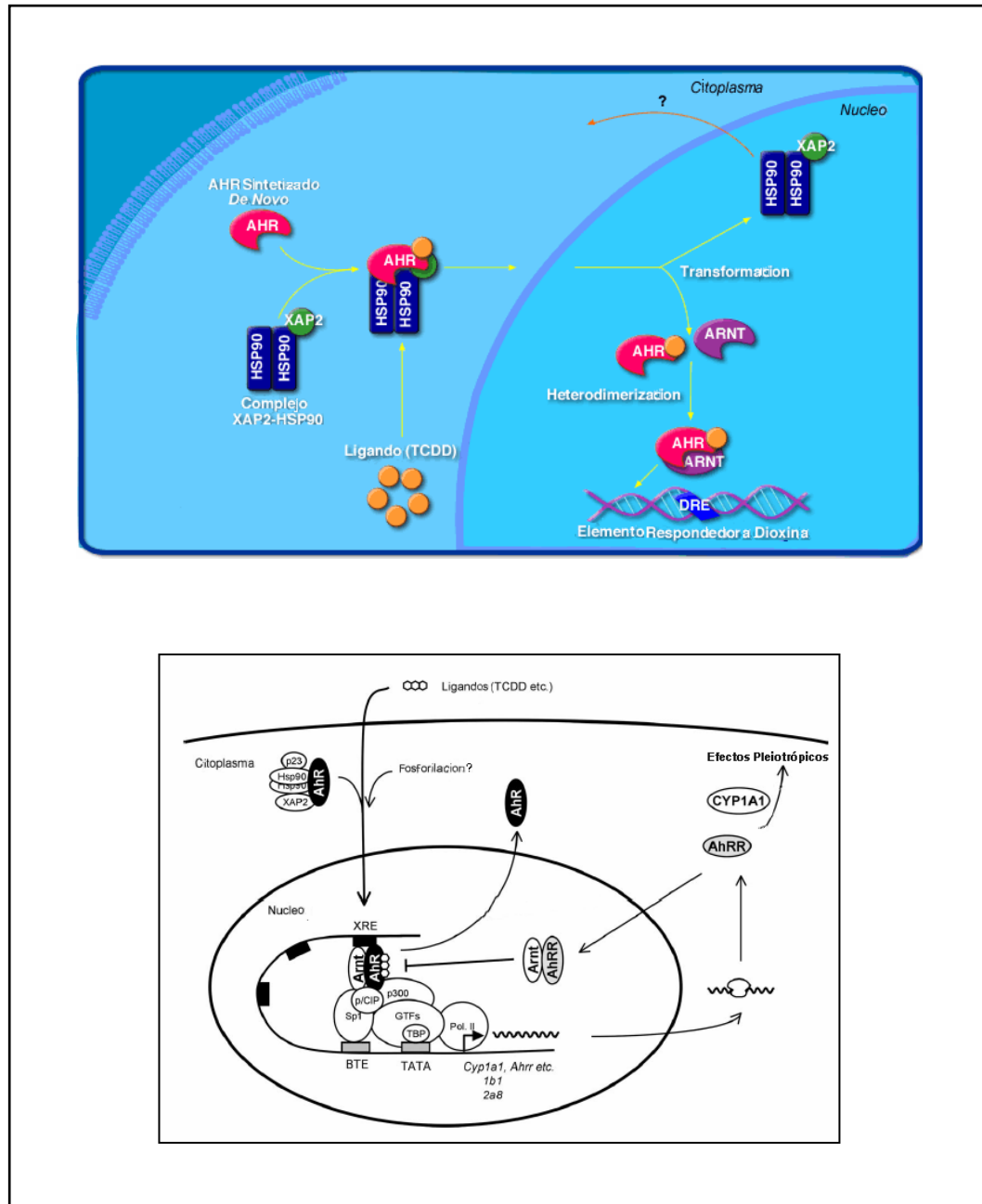


Figura 1.2. Modelo que esquematiza la vía de señalización del AHR. Panel superior: esquema básico general (tomado de BioCarta, Inc. *Ahr Signal Transduction Pathway*). Panel inferior: detalle del proceso de activación génica mediada por el AHR, con los co-activadores transcripcionales más relevantes identificados hasta el momento adaptado de Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005). (BTE: elemento de transcripción básico, conjunto de GC).

1.1.3. Respuestas inducidas por la activación del AHR

La conservación de los AHRs funcionales entre tantas diversas especies sugiere fuertemente que este receptor puede jugar un importante rol fisiológico además de su participación en el metabolismo de xenobióticos. Aún antes de la aparición de los vertebrados, el gen *Ahr* estaba presente en los organismos cumpliendo una o más funciones críticas para la vida.

Se postula que luego el AHR de los vertebrados comenzó a estar involucrado en la detección y respuesta a ciertas clases de tóxicos ambientales. Estos contaminantes ambientales ligandos del AHR (que incluyen hidrocarburos policíclicos aromáticos como la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxina -TCDD-, bifenilos policlorados o polihalogenados o dibenzofuranos) están dispersos en el medio ambiente, son potentes tóxicos y muestran ser resistentes a la degradación metabólica. Esta última propiedad de los xenobióticos es responsable de la acumulación de estos compuestos en la cadena alimenticia y de sus efectos sostenidos en la salud humana y animal (Fisher, 2000; Stapleton y Baker, 2003).

La unión de estos ligandos al AHR y su posterior transformación ocasiona la inducción de enzimas metabolizantes de xenobióticos, la cual es considerada una respuesta celular adaptativa en la detoxificación de compuestos exógenos lipofílicos. A su vez, la activación del AHR por aquellos ligandos exógenos causa un amplio espectro de alteraciones en el sistema endócrino, reproductivo, cardiovascular y nervioso, así como también defectos en el desarrollo, inmunotoxicidad, daño hepático, respuestas de estrés celular, cáncer y teratogénesis. Los mecanismos que gobiernan la mayoría de estas acciones no se han dilucidado aún. Pueden encontrarse completas revisiones sobre estos tópicos en Safe, 1995; Safe *et al*, 1998; Safe, 2001; Matsumura, 2003; Mandal, 2005; Pocar *et al*, 2005.

Como se mencionara anteriormente, el factor de transcripción AHR no es únicamente un sensor de xenobióticos, sino además un potencial componente integral clave en la fisiología normal y en el mantenimiento de las funciones homeostáticas. Esta afirmación se basa en estudios realizados con animales que carecen del gen *Ahr* o de unos pocos que han estudiado al receptor en ausencia de ligandos exógenos. Se ha demostrado que la carencia del receptor produce fallas en el desarrollo hepático (revisado en Rushmore y Kong, 2002), reducción en la incidencia de formación de blastocitos, una media menor en el número de células de embriones en cultivo (Peters y Wiley, 1995), alteraciones en la función reproductiva (revisado en Pocar *et al*, 2005, Baba *et al*, 2005), en la supervivencia y en el crecimiento (revisado en Gonzalez y Fernandez-Salguero, 1998). A su vez, se ha

mostrado que el AHR está implicado en una serie de eventos fisiológicos como la regulación del ciclo celular en algunos sistemas (revisado en Puga *et al.*, 2002), la diferenciación celular (revisado en DeVito y Birnbaum, 1995), la apoptosis (revisado en Nebert *et al.*, 2000), la transición a la senescencia reproductiva (Franczak *et al.*, 2006) la activación de distintas vías de transducción de señales (revisado en Carlson y Perdew, 2002), el estrés celular (revisado en Matsumura, 2003) y procesos relacionados con el desarrollo, como la neurogénesis o la vasculogénesis (revisado en Puga *et al.*, 2005).

La identidad del ligando endógeno del AHR no ha sido aún fehacientemente determinada. Si bien varios compuestos han sido propuestos como candidatos (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998; Schaldach *et al.*, 1999; Adachi *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002), el AHR continúa siendo considerado un receptor huérfano. En este contexto, se ha reportado que en ausencia de ligandos exógenos existe en algunos sistemas activación constitutiva del AHR, verificándose en estas condiciones procesos mediados por el receptor (Sadek y Allen-Hoffmann, 1994; Singh *et al.*, 1996; Mufti *et al.*, 1995; Zaher *et al.*, 1998; Elizondo *et al.*, 2000; Monk *et al.*, 2001).

Quizás el aspecto más inusual e interesante de las acciones del AHR es que puede afectar múltiples órganos, variando además sus efectos notoriamente dependiendo del ligando que lo haya activado, el tipo celular o tejido sobre el que actúe, el sexo, la edad, la especie y la duración de la exposición.

1.2. Desarrollo folicular ovárico

La función primaria del folículo ovárico en los mamíferos es la liberación de un ovocito en condiciones de ser fertilizado. Este proceso involucra el crecimiento y maduración del folículo, y la ovulación y división meiótica del ovocito.

El folículo es la unidad funcional del ovario. Está formado por una capa exterior de células tecales que envuelve, por fuera de la membrana basal, capas internas de células de la granulosa. A su vez, las células de la granulosa rodean y confinan al complejo formado por el ovocito y las células del cumulus (Figura 1.3).

En respuesta a la secreción cíclica de gonadotropinas hipofisarias, los distintos compartimientos foliculares interactúan de manera integrada para sintetizar esteroides sexuales (estrógenos y progestinas) y para producir un ovocito fertilizable. Aunque las gonadotropinas que perfunden el ovario son los mayores reguladores del desarrollo del

folículo, no todos los folículos en un ovario responden a estas hormonas en un ciclo. Sólo un número limitado de folículos seleccionados alcanza la ovulación durante la vida fértil, mientras que la mayoría de los folículos degeneran en atresia. Luego de la ovulación, las células de la granulosa sufren profundos cambios en la respuesta hormonal y en su capacidad de producir esteroides.

Tanto el crecimiento y diferenciación del ovocito como la proliferación y diferenciación de las células somáticas que lo rodean ocurren de manera coordinada en las distintas etapas de la foliculogénesis (revisado en Richards, 2001) (Figuras 1.4 y 1.5 A).

1.2.1. Formación del folículo primordial

Las células germinales primordiales se originan a partir del endodermo del saco vitelino, cerca del final del cauda del embrión. Las células germinales en activa proliferación migran luego hacia la cresta genital (Peters, 1978; Byskov y Hoyer, 1994). Cuando las células premeióticas arriban al lugar de desarrollo de la gónada son denominadas oogonias (Baker y Franchi, 1967). Durante un intervalo previo al nacimiento en los roedores o en la semana 8 de vida intrauterina en el humano, las oogonias comienzan a dejar su ciclo mitótico, comienzan la división meiótica y se detienen en la primera profase, convirtiéndose en ovocitos primarios (Peters, 1970) (Figura 1.5 B). Tanto durante la mitosis como durante la meiosis, una gran proporción de células germinales degenera, resultando en una pérdida de más de un tercio de las mismas en el ratón. En el humano, esta pérdida de células germinales impactará sobre la reserva de folículos disponibles para futuras ovulaciones, disminuyendo desde 7×10^6 células germinales a las 20 semanas de gestación hasta entre $1,3$ y $3,8 \times 10^5$ por ovario al nacimiento (Baker, 1963). Una vez formado, el ovocito primario persiste en la profase de la primera división meiótica hasta el momento de la ovulación (Figura 1.5 B).

En un estadio temprano de la diferenciación de la gónada femenina las células de la pregranulosa, provenientes de la *rete ovarii* y del epitelio superficial, se organizan alrededor de los ovocitos primarios (Byskov y Hoyer, 1994). La unidad resultante constituye el folículo primordial, formado por un ovocito ($<20\mu\text{m}$) rodeado por una capa de células de la pregranulosa no cuboides y una membrana basal. Este folículo permanece quiescente hasta que se dispara su crecimiento.

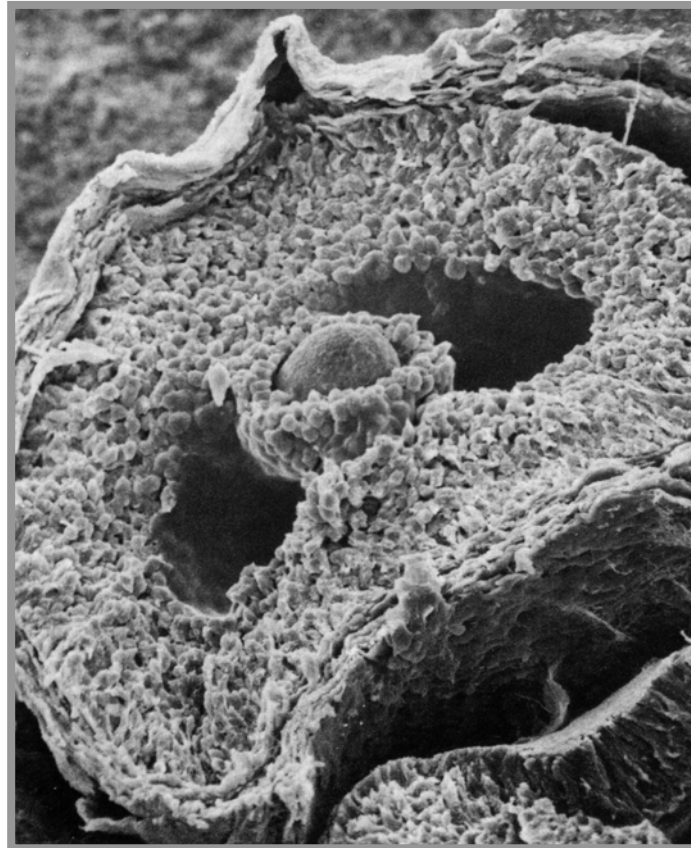


Figura 1.3. *Folículo ovárico.* Microscopía electrónica de barrido de un folículo ovárico maduro de rata. El ovocito se encuentra rodeado por las células del cumulus y varias capas de células de la granulosa que contienen el antro folicular. Por fuera de la membrana basal se observa una capa de células de la teca (Tomado de Richards, 1979).

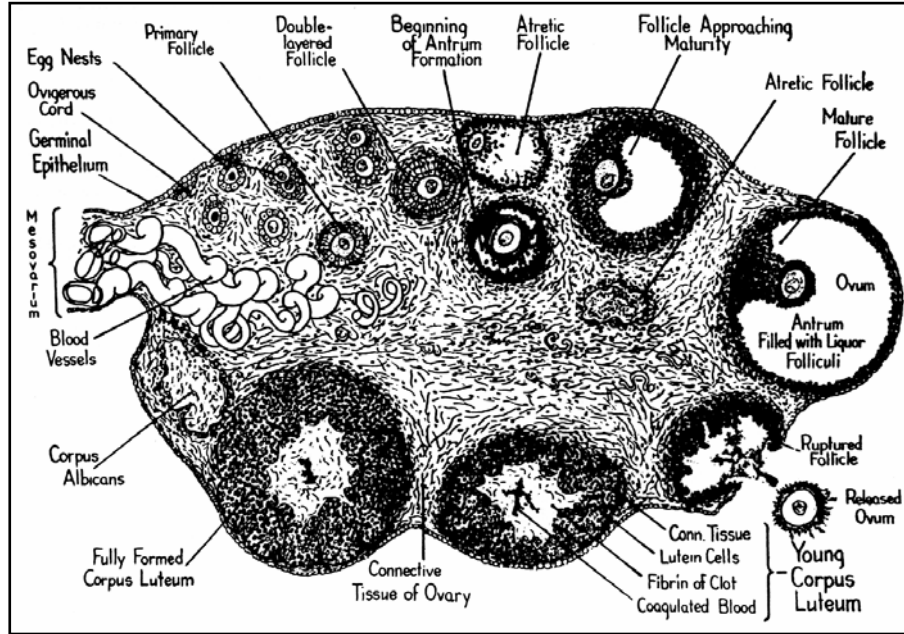


Figura 1.4. Estructura del ovario y desarrollo folicular. Esquema del ovario mostrando los diferentes estadios del desarrollo folicular (Tomado de Ham, 1965).

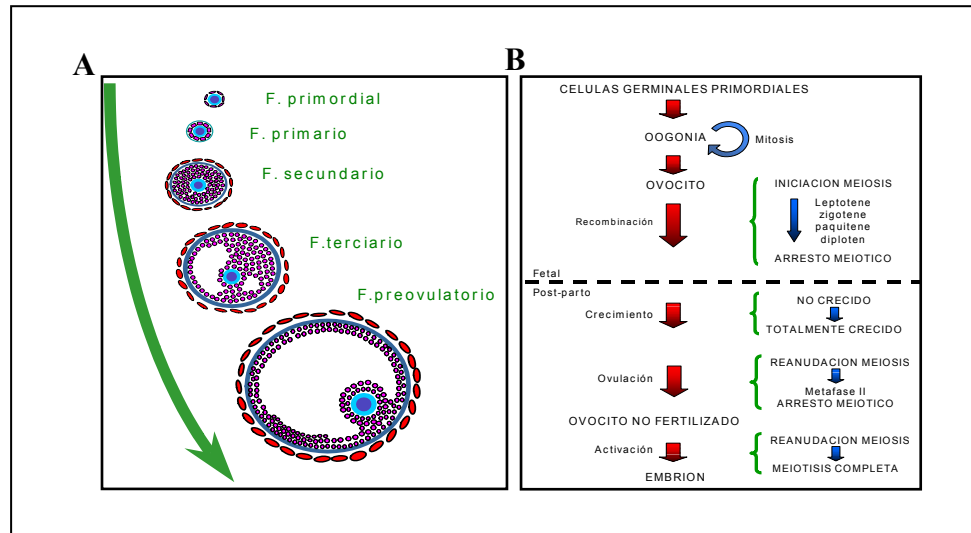


Figura 1.5. A) Desarrollo del folículo ovárico: Representación esquemática del desarrollo de un folículo: primordial, primario, secundario, terciario y preovulatorio. B) Esquema de la oogénesis en roedores: Progresión desde las células germinales primordiales hasta ovocitos no crecidos en el desarrollo fetal; y de etapas de la oogénesis hasta el ovocito fertilizado en hembras adultas maduras. Esquema tomado de Lanuza G (1999) Tesis Doctoral.

1.2.2. *Iniciación de la foliculogénesis*

La iniciación de la foliculogénesis puede reconocerse por la morfología cuboide de las células de la granulosa y por el incremento en su número (Peters, 1978), convirtiéndose el folículo primordial en un folículo primario. Este período de crecimiento es lento, habiéndose estimado que la duración del ciclo celular sería de 7 días (Hirshfield, 1989). El momento de inicio del crecimiento folicular depende de la especie. En mamíferos grandes (como ovinos, bovinos, monos y humanos) ocurre durante la vida fetal; mientras que en mamíferos más pequeños (como ratón, rata, conejo y hámster) ocurre durante el período perinatal (Peters, 1978). Los factores responsables de la regulación de estos eventos tempranos no están totalmente dilucidados, pero se considera que serían de origen local. Una vez comenzado, el crecimiento folicular continúa a lo largo de toda la vida fértil, independientemente del estado fisiológico, de la fase del ciclo estral y de los niveles de gonadotrofinas, existiendo aún durante la preñez (Pederson, 1970; Pederson y Peters, 1971; Edwards *et al.*, 1977).

Se ha sostenido que no existen poblaciones de folículos más grandes de reserva. Por lo tanto, una vez que un folículo ha comenzado su etapa de crecimiento y diferenciación, culminará en la atresia o en la ovulación del ovocito maduro. En la mujer, el agotamiento de la población de folículos primordiales está asociado con la menopausia. Sin embargo, en los últimos años, se ha reportado que es posible la formación de nuevos folículos que reemplazan a los folículos primarios más tempranos que se encuentran en atresia. Este proceso, denominado renovación folicular, se ha descrito en mujeres adultas y en ratas, y desafía el dogma establecido sobre el origen fetal de las oogonias y los folículos primarios en los ovarios de mamíferos adultos (revisado en Bukovsky *et al.*, 2005). Por lo tanto, actualmente se sugiere que el conjunto de folículos primarios en los ovarios de humanos adultos representaría una población dinámica y no estática de estructuras en procesos de diferenciación y regresión. No obstante, la renovación folicular puede cesar a cierta edad, predeterminando el comienzo de la menopausia natural o la falla ovárica prematura.

Coincidente con la transición de las células de la granulosa a morfología cuboide y el crecimiento del ovocito, comienza éste la secreción de la matriz glicoproteica extracelular, la zona pelúcida (Chiquoine, 1960). Empieza a la vez un proceso citoplasmático en el cual las células de la granulosa atraviesan la zona pelúcida, para mantener un íntimo contacto con la membrana plasmática del ovocito, formando uniones estrechas. Dada la formación temprana de estos contactos, se sostiene que el acoplamiento entre el ovocito y las células

que lo rodean sería importante en el adecuado desarrollo posterior del folículo (Hirshfield, 1991).

1.2.3. Crecimiento del folículo secundario o preantral

Mediante una serie de divisiones mitóticas, los folículos primarios con una capa de células de la granulosa se convierten a un estadio preantral multilaminado, denominado folículo secundario. El crecimiento del folículo preantral es independiente de gonadotrofinas y se acepta que está regulado por mecanismos intraováricos e intrafoliculares. La proliferación de las células de la granulosa, la diferenciación e hipertrofia de las células tecales y el crecimiento del ovocito son los procesos que determinan un incremento en el diámetro del folículo maduro (Figura 1.6).

La capa de células tecales se forma cuando el folículo alcanza dos láminas de células de la granulosa y constituirá la fuente de andrógenos para la producción folicular de estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988). La FSH en combinación con los estrógenos ejerce un efecto mitogénico sobre las células de la granulosa (Goldenberg *et al.*, 1972). Posteriormente, el folículo secundario diferenciado migra hacia la médula y completa la formación de la teca, evento asociado con la adquisición de una o dos arteriolas en sus adyacencias. Si bien no se conoce fehacientemente cuál es la señal capaz de disparar esta transformación de precursores tipo fibroblasto del estroma, la evidencia acumulada indica que señales parácrinas inductoras del desarrollo de la teca provienen de folículos preantrales con dos o más capas de células de la granulosa.

Cuando un folículo secundario se ha formado, desarrolla receptores para FSH, estrógenos y andrógenos. Del conjunto de folículos secundarios maduros se reclutarán aquellos que entren en la fase tónica de crecimiento. Con la aparición de la cavidad antral, el folículo secundario se convierte en un folículo terciario.

1.2.4. Desarrollo del folículo terciario o antral

Durante el desarrollo folicular, la formación del antro folicular representa una transición de la regulación primaria intrafolicular a la regulación extraovárica. El folículo comienza un período de crecimiento rápido y adquiere nuevas características. El eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en la hembra integra señales del cerebro, pituitaria y ovario y produce hormonas que coordinan la maduración folicular con el comportamiento sexual y la preparación fisiológica para la preñez. El hipotálamo produce y secreta GnRH de manera

pulsátil directamente en el sistema porta hipofisario (Everett, 1994). La frecuencia de pulsos de GnRH es modulada por el estado endócrino del animal, los estrógenos incrementan la frecuencia de pulsos y aumentan la sensibilidad de la hipófisis anterior a GnRH. En respuesta a GnRH, la pituitaria anterior libera gonadotrofinas, la baja frecuencia de pulso favorece la secreción de FSH, mientras que una alta frecuencia favorece la liberación de LH.

Durante la primera fase del desarrollo folicular, el crecimiento del ovocito y el folículo correlacionan positivamente. Una vez que el ovocito ha alcanzado su tamaño máximo, justo antes de la formación de la cavidad antral, comienza una segunda fase, caracterizada por la actividad mitótica de las células de la granulosa, la diferenciación de la teca y la acumulación de fluido folicular (Figura 1.6).

Para que el folículo llegue hasta los primeros estadios antrales resulta imprescindible la acción de gonadotrofinas. La FSH estimula la actividad de aromatasas en las células de la granulosa, lo que se manifiesta en un aumento de la concentración intrafolicular de estrógenos (Figura 1.8). Al aumentar los niveles de este esteroide, aumenta también la sensibilidad del folículo a la acción de la gonadotrofina. La FSH, en conjunción con el estradiol localmente producido, promueve el crecimiento folicular (Rao *et al.*, 1978), observándose un aumento en el índice mitótico de las células de la granulosa entre el estadio preantral tardío y antral temprano (Rao *et al.*, 1978; Hirshfield, 1991). Las señales desencadenadas por FSH interactúan con estradiol para activar la expresión de genes necesarios para la maduración del folículo, tales como citocromo P450 aromatasas, las subunidades de inhibina y el receptor de LH (Hsueh *et al.*, 1984; Richards, 1994).

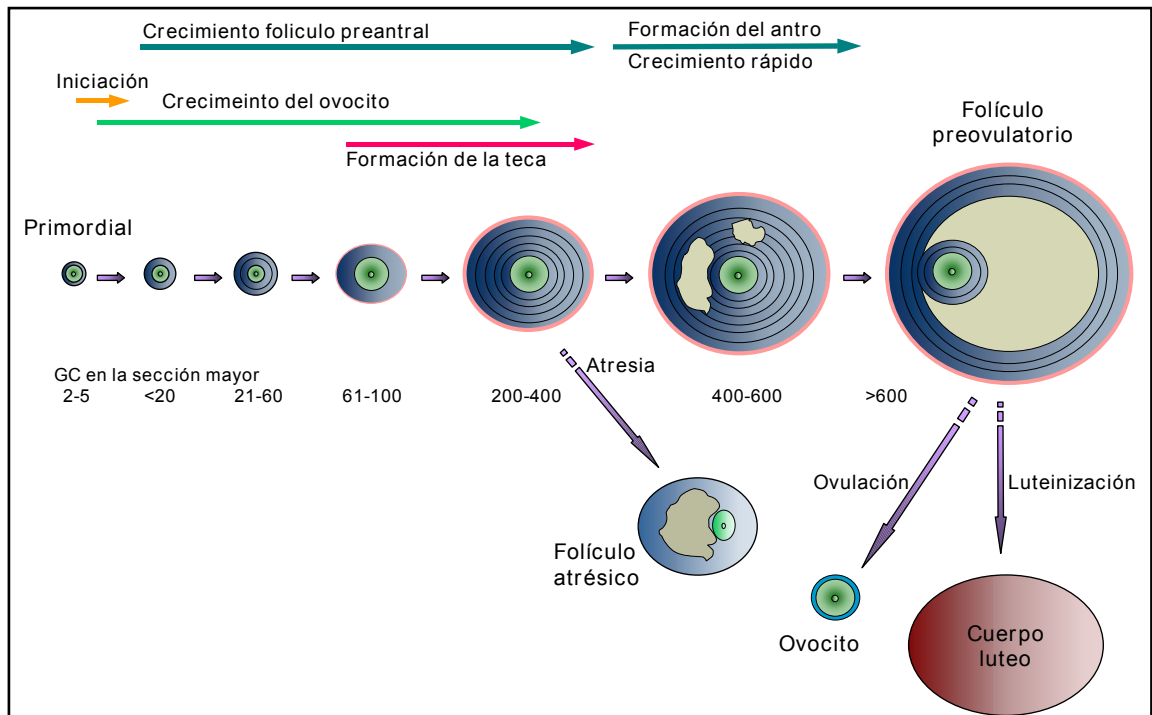


Figura 1.6. *Foliculogénesis.* Representación de los cambios morfológicos en la foliculogénesis. Las flechas indican el comienzo y la duración aproximada de distintas etapas: iniciación, crecimiento del ovocito, proliferación de las células de la granulosa, formación de la capa de la teca y desarrollo del folículo antral. También se muestran los puntos finales de la foliculogénesis: atresia, ovulación del ovocito y luteinización. Para cada folículo se indica el número de células de la granulosa (GC) en la sección transversal mayor del folículo. Esquema tomado de Lanuza G (1999) Tesis Doctoral.

En algunos folículos se observa un incremento drástico de la producción de estrógenos, lo que se ve acompañado por una disminución de los niveles circulantes de FSH (Fritz y Speroff, 1982). Como resultado, aquellos folículos con estrógenos relativamente bajos y elevados niveles de andrógenos intrafoliculares presentarán una sensibilidad disminuida a FSH y como consecuencia no serán seleccionados (Figura 1.7).

Asimismo, un conjunto de factores de producción local cumplen un papel importante en el proceso de selección folicular. Por otra parte, el desarrollo del folículo dominante se encuentra asociado a los cambios ocurridos en las células tecaes. La LH circulante estimula al máximo la producción de andrógenos por parte de las células tecaes-intersticiales, estableciéndose así la unidad funcional ovárica entre las células de la granulosa y las células de la teca (Figura 1.8).

Se ha mostrado que, en varias especies, el folículo dominante secreta sustancias capaces de inhibir a los folículos pequeños ipsilaterales adyacentes. De acuerdo con esta teoría, el folículo dominante tendría un papel activo para asegurar su estatus preferencial. Otros investigadores han explicado la inhibición del crecimiento de los folículos pequeños como una consecuencia del deterioro del ambiente endócrino. Por otro lado, existen estudios en diversos sistemas que han llevado a postular que la degradación proteolítica de proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina por parte de los folículos ováricos constituirían un mecanismo de control para la selección de los folículos dominantes (revisado en Spicer, 2004).

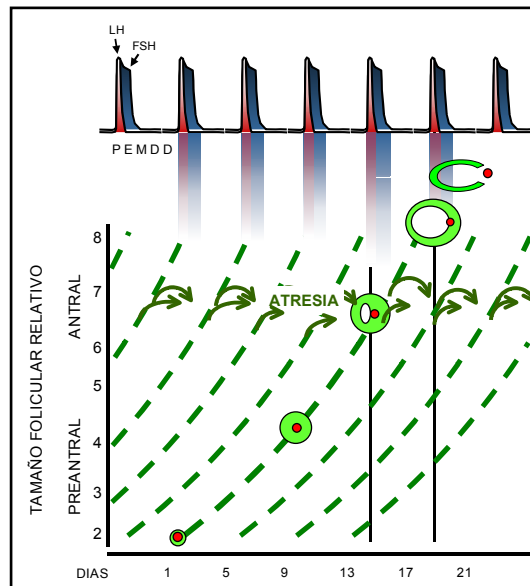


Figura 1.7. *Crecimiento folicular y ciclo estral.* Diagrama esquemático del crecimiento folicular en el ciclo estral en la rata. Panel superior: niveles séricos de gonadotrofinas, indicando los días del ciclo: proestro (P), estró (E), metaestro (M), diestro (D). Panel inferior: crecimiento del foliculo, representado como cambio en el tamaño relativo en función de los días de desarrollo (Richards, 1980).

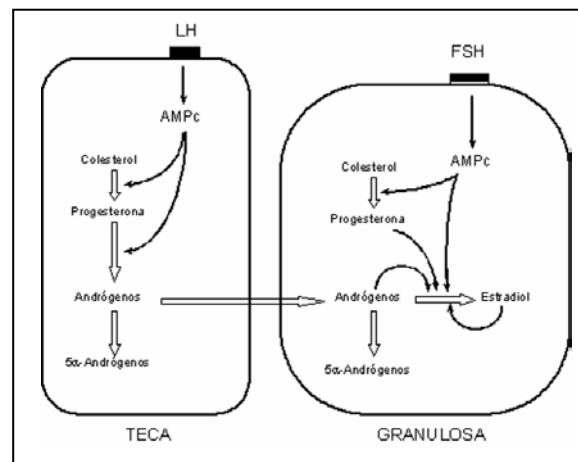


Figura 1.8. *Esteroidogénesis.* Representación del modelo de dos células, dos gonadotrofinas. Regulación de la esteroidogénesis en el foliculo ovárico: cooperación entre las células de la granulosa y de la teca. Las flechas negras representan pasos regulados positivamente. Esquema tomado de Lanuza G (1999) Tesis Doctoral.

1.2.5. *Atresia folicular*

La atresia folicular es el proceso a través del cual degeneran los folículos que no fueron seleccionados para ovular (Hirshfield, 1991) y ocurre a través de muerte celular por apoptosis (Hsueh *et al.*, 1994; Tilly, 1996).

Existen en realidad dos tipos de procesos de degeneración celular en el ovario: degeneración de las células germinales ("*attrition*"), la cual es responsable de la pérdida del mayor número de ovocitos y ocurre en la etapa prenatal o perinatal, dependiendo de la especie; y degeneración folicular (atresia) que ocurre en la vida reproductiva postnatal (Tilly, 1996).

Se ha estimado que más del 99% de los folículos degeneran en atresia en la vida reproductiva de la mujer, mientras que aproximadamente un 77% se pierden en el ratón (Baker, 1963). Por lo tanto, el número de folículos que se desarrollan hasta un estadio preovulatorio es sustancialmente menor que el de aquellos que se pierden. Los folículos pueden volverse atrésicos en cualquier estadio del desarrollo, aunque en la mayoría de los mamíferos la mayor eliminación ocurre entre los estadios preantral tardío y antral temprano (Tilly, 1996) (Figura 1.6 y 1.7).

Este es el momento en el que el crecimiento continuo es dependiente de gonadotrofinas, habiéndose demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la exposición a FSH se requiere para evitar la atresia y continuar el desarrollo (Tilly *et al.*, 1992; Chun *et al.*, 1994; Tilly *et al.*, 1995). Los estrógenos son indispensables para el crecimiento y maduración del folículo, presentando los folículos atrésicos una relación estrógenos/andrógenos disminuida (Carson *et al.*, 1981). El estradiol y los andrógenos regulan la apoptosis en células de la granulosa actuando como factores de supervivencia o atretogénicos, respectivamente (Billig *et al.*, 1993).

1.2.6. *Cinética del crecimiento folicular*

La cinética del desarrollo folicular que se representa en la Figura 1.7 se ha establecido a partir del análisis de la dinámica folicular en el ratón, hámster y rata (Richards, 1980). El panel superior representa el patrón de concentraciones circulantes de gonadotrofinas en siete ciclos estrales de 4 ó 5 días (Gay *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974). El pico de FSH y LH ocurre en la mañana del proestro, extendiéndose el de FSH hasta la mañana del estro. El panel inferior representa los cambios relativos en el tamaño folicular,

desde un folículo preantral temprano, con una o dos capas de células de la granulosa, hasta folículos antrales grandes.

El folículo de *de Graff*, el cual ovula en respuesta al pico de gonadotrofinas de un ciclo, comenzó en realidad su crecimiento al menos 19 días antes, como parte de una población de folículos en crecimiento. Por lo tanto, una vez que un folículo fue reclutado para su crecimiento, se ve expuesto a 3 o más aumentos consecutivos de gonadotrofinas. En la rata adulta, la mayoría de estos folículos crecen continuamente hasta que, como folículos antrales pequeños, sufren atresia (Hirshfield y Midgley, Jr. 1978).

Solamente unos pocos folículos entran a la etapa final de maduración. Se ha propuesto que el pico de hormonas del ciclo que precede a la ovulación selecciona de la población de folículos preantrales a aquellos que ovularán en el proestro siguiente (Welschen, 1973; Schwartz, 1974; Richards y Midgley Jr., 1976).

El pico de hormonas gonadotróficas ejerce dos funciones. La LH induce la ovulación y luteinización, “eliminando” los folículos más grandes que se encuentran saludables en proestro. El aumento de FSH, probablemente junto con LH, selecciona para su crecimiento a la población de folículos de la cual emergerán aquellos que se ovularán el ciclo siguiente (Figura 1.7).

El proceso hormonal que determina cuáles folículos finalmente ovularán involucra mecanismos de interacción entre secreciones ováricas (esteroides y factores de crecimiento) e hipofisarias, caracterizándose los folículos en crecimiento por una sensibilidad específica a los factores actuantes (Everett, 1964; Richards y Midgley Jr., 1976; Hsueh *et al.*, 1984; Adashi y Rohan, 1992).

1.2.7. Folículo preovulatorio y ovulación

El folículo preovulatorio, también denominado folículo de *de Graff*, es el que presenta una esteroidogénesis más activa y una mayor respuesta a gonadotrofinas. Estudios en la rata han demostrado que las células de la granulosa del folículo en proestro expresan receptores de LH en alta concentración, produciendo elevados niveles de AMPc en respuesta al pico de gonadotrofinas (Uilenbroek y Richards, 1979). La LH, al igual que la FSH, estimula a la adenilato ciclasa para producir AMPc, quien activa a la proteína quinasa A (Richards *et al.*, 1995).

El pico de LH promueve la supresión de la expresión de la aromatasa, detiene la división celular (Rao *et al.*, 1978; Robker y Richards, 1998) e incrementa la expresión de los genes responsables de la ruptura de la pared del folículo y la membrana basal. Uno de

estos genes codifica para el activador del plasminógeno, quien junto con otras enzimas y sus inhibidores está involucrado en la cascada de reacciones proteolíticas necesarias para la ovulación (Beers, 1975; Reich *et al.*, 1985; Hagglund *et al.*, 1996).

Durante todo el desarrollo del folículo los ovocitos crecen hasta alcanzar su máximo tamaño, pero permanecen detenidos en la profase de la primera división meiótica (Figura 1.6). Las células de la granulosa son, al menos en parte, las encargadas de mantener detenido al ovocito, mediante la secreción de inhibidores de la meiosis (Eppig, 1993).

Antes de la ovulación, pero después del pico de LH, se completa la primera división meiótica y el ovocito pasa a denominarse ovocito secundario, arrestado en metafase de la segunda división meiótica. La maduración del ovocito se observa por la ruptura de la vesícula germinal y la eliminación del primer corpúsculo polar (Eppig *et al.*, 1994). Solamente si el ovocito es fertilizado se activará el mecanismo que determinará que se complete la segunda división meiótica (Figura 1.5). En respuesta al pico preovulatorio de gonadotrofinas se desencadena el proceso de mucificación o de expansión del cumulus, que se caracteriza por la activa secreción de ácido hialurónico y la expansión de la estructura de las células del cumulus (Eppig, 1982).

El folículo preovulatorio representa el último estadio del desarrollo folicular. Posteriormente, sufrirá una serie de cambios morfológicos y funcionales en el proceso conocido como luteinización, comenzando un nuevo estadio de diferenciación.

1.2.8. Regulación del desarrollo folicular

La regulación del desarrollo folicular representa un proceso intrincado y exquisitamente coordinado, en el cual intervienen señales de diversos orígenes y naturaleza. La proliferación y diferenciación de las células de la granulosa involucra la transformación de la célula inmadura en una totalmente madura, bajo la influencia de señales hormonales endócrinas, parácrinas y autócrinas. Para realizar esta transformación, las células de la granulosa adquieren la capacidad de interactuar de manera específica y sincronizada con las señales hormonales que dirigen los procesos de crecimiento y maduración folicular.

Si bien existe un vasto conocimiento sobre estos aspectos, constantemente se realizan hallazgos que echan luz sobre las facetas aún desconocidas de los mecanismos que gobiernan este proceso. A su vez, no dejan de describirse nuevas interacciones entre las distintas vías de señalización ya descritas, lo que da como resultado el balance justo entre proliferación, diferenciación y apoptosis, necesario para llevar a cabo una correcta

función ovárica. Particularmente, en los últimos años se ha acumulado vasta evidencia de la importancia de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en la función ovárica y en la función de las células de la granulosa en particular. Se ha demostrado que esta vía está involucrada en los procesos de proliferación, diferenciación (esteroidogénesis) y apoptosis, existiendo numerosas interacciones entre este camino de señalización y las vías clásicas mediadas por gonadotrofinas, el receptor de estrógenos, de progesterona o de glucocorticoides, entre otros (revisado en Tamura *et al.*, 2004).

1.2.8.1. Gonadotrofinas

Los principales factores endócrinos que modulan el desarrollo folicular son las gonadotrofinas FSH y LH.

La LH juega un rol clave estimulando las enzimas responsables de la producción de andrógenos en las células de la teca e iniciando la diferenciación final de las células de la granulosa. Como se mencionó anteriormente, el pico de LH que se produce durante la ovulación induce una cascada de eventos que llevan a la reanudación de la maduración meiótica, la luteinización de las células de la granulosa, la expansión de las células del cumulus y finalmente la ruptura de la pared del folículo. Se ha sugerido recientemente que la acción de LH durante el proceso de ovulación podría estar mediada por factores parácrinos, miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005).

Los receptores de LH se expresan en las células tecaes y sólo se encuentran en células de la granulosa de folículos preovulatorios grandes (Amsterdam *et al.*, 1975; Richards *et al.*, 1976). El tratamiento con FSH, tanto *in vitro* como *in vivo*, induce la expresión de receptores para LH en células de la granulosa (Erickson *et al.*, 1979; Piquette *et al.*, 1991). A su vez, la inducción de los receptores para LH por FSH, es aumentada por la presencia de estrógenos (Rani *et al.*, 1981). Tanto los ratones hembras *knockout* para el receptor de LH como aquellas que son deficientes en la subunidad β , son infértiles. Los folículos son capaces de alcanzar el estadio antral pero luego degeneran (Zhang *et al.*, 2001; Ma *et al.* 2004). Si bien esta hormona glicoproteica no es esencial para completar el desarrollo folicular *in vitro*, el agregado de dosis bajas de LH durante el cultivo de folículos aumenta el grado de formación de la cavidad antral y mejora la maduración meiótica del ovocito (Cortvrindt *et al.*, 1998).

La FSH ejerce sus funciones a través de receptores específicos que se localizan exclusivamente en células de la granulosa. El receptor de FSH, al igual que el receptor de

LH, son proteínas integrales de membrana con siete dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a proteína G. La unión de la hormona a su receptor promueve, a través de una proteína G, la activación de la adenilato ciclasa, la cual incrementa los niveles de AMPc. La proteína quinasa A transduce la señal del AMPc (Taylor *et al.*, 1990), resultando en la fosforilación de un gran número de proteínas en serina y treonina y en cambios específicos en la expresión de genes (Richards, 1994). Un factor transcripcional de unión a elementos con respuesta a AMPc (CREB) es capaz de ser activado por fosforilación por proteína quinasa A (Richards, 1994). La interacción de CREB con otros factores de transcripción determinará la expresión de ciertos genes, como por ejemplo los correspondientes a las enzimas esteroideogénicas (Oonk *et al.*, 1990; Fitzpatrick y Richards, 1994).

En la rata, estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la FSH incrementa la expresión de sus propios receptores en células de la granulosa (Richards *et al.*, 1976; Ireland y Richards, 1978). Esta auto-regulación de los receptores para FSH en células de la granulosa es amplificada por el estradiol, aunque el esteroide no modifica la expresión basal (Louvet y Vaitukaitis, 1976; Ireland y Richards, 1978). Consecuentemente, cambios en la producción de estradiol por los folículos preantrales seleccionados podrían modular la respuesta a FSH a través de un aumento del número de receptores para la gonadotropina.

El rol esencial de FSH durante el crecimiento folicular antral *in vivo* se encuentra bien establecido. Las hembras deficientes en FSH β o aquellas *knockout* para el receptor de la hormona son infértiles (Kumar *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2000). En dichos animales, se observaron todos los estadios foliculares hasta el estadio preantral, pero no se ha descrito posterior desarrollo folicular ni ovulación. Estos experimentos indican claramente el papel fundamental que juega FSH en los folículos antrales tempranos para el posterior crecimiento y diferenciación.

A su vez, FSH interactúa con varios factores de crecimiento para inducir el crecimiento folicular, tales como el ligando *kit* (KL), EGF, activina A, inhibina, BMP-15 (proteína morfogénica ósea-15) o el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1). Estos reguladores intraováricos median el efecto de las gonadotropinas al regular las interacciones celulares a través de mecanismos autócrinos y parácrinos (revisado en Erickson y Shimasaki, 2001).

Desde hace muchos años se ha reconocido que la FSH induce la proliferación de células de la granulosa, y en la última década se ha comprendido el mecanismo molecular de su acción mitogénica. Se ha demostrado que la FSH está involucrada directamente en la activación de la expresión de ciclina D2 en células de la granulosa de rata en cultivo, siendo

la ciclina D un componente esencial para la progresión en la fase G1 del ciclo celular (Robker y Richards, 1998). En el ratón deficiente en ciclina D2, no hay respuesta proliferativa a FSH, lo que conduce a la esterilidad de las hembras (Sicinski *et al.*, 1996). Si bien en estos animales la gonadotropina no desencadena el crecimiento folicular, es capaz de aumentar la producción de estradiol, indicando que la transducción de señales de FSH se encuentra intacta. Recientemente, se ha reportado que el efecto inductor que ejerce FSH sobre ciclina D2 se debe a la liberación del represor FOXO1 mediada por activación de PI3K (fosfatidil-inositol-3-quinasa) y Akt, acoplado a señales positivas de la vía de TGF- β (Park *et al.*, 2005).

Por otro lado, una de las principales acciones de FSH es la de promover la síntesis de estradiol a través de la inducción de la enzima P450 aromatasa en células de la granulosa, la cual convierte andrógenos a estrógenos (Armstrong y Papkoff, 1976; Ericsson y Hsueh, 1978). La biosíntesis de estradiol requiere de la interacción de las células de la granulosa con las células de la teca. Las hormonas esteroideas son por su parte los más conocidos e inicialmente mejor caracterizados productos de secreción del folículo. En todos los mamíferos, las células involucradas en la esteroidogénesis folicular pertenecen a dos tipos celulares básicos: las células de la teca interna de la envoltura folicular y células intersticiales ováricas que responden a LH; y las células de la granulosa que son sensibles a FSH y que sólo posteriormente en la maduración folicular adquirirán la capacidad de responder a la LH. Estos dos tipos celulares cumplen particulares funciones en el proceso de esteroidogénesis, encontrándose reguladas por distintas hormonas y otros factores y por la expresión de distintas enzimas esteroidogénicas. La cooperación entre las células de la teca y de la granulosa en la biosíntesis de estrógenos constituye lo que se conoce como la teoría de dos células, dos gonadotropinas (Gore-Langton y Armstrong, 1988) (Figura 1.8).

Los esteroides más abundantes producidos por la teca madura son los andrógenos (fundamentalmente androstenodiona), generados por metabolismo de colesterol. La acción de la LH, a través de receptores específicos presentes en la célula de la teca en todos los estadios foliculares, provee el principal estímulo para las actividades esteroidogénicas (Fortune y Armstrong, 1977; Tsang *et al.*, 1979). Los andrógenos producidos pueden difundir a través de la membrana basal y alcanzar las células de la granulosa.

En las células de la granulosa, las vías esteroidogénicas se encuentran organizadas principalmente para el metabolismo de esteroides C₁₉ (andrógenos) y para la síntesis *de novo* de progesterona y sus metabolitos C₂₁ (Hsueh *et al.*, 1984). Las células de granulosa responden a FSH incrementando la actividad de aromatización, lo cual promueve la conversión de los andrógenos sintetizados por las células tecales a estrógenos (Ericsson y

Hsueh, 1978; Hsueh *et al.*, 1984). Por otra parte, la vía de biosíntesis de progesterona en células de la granulosa es típica de todas las células esteroideogénicas. Esta vía involucra la conversión de colesterol en pregneneolona y su posterior metabolismo hacia progesterona.

In vivo, FSH es esencial no solo para la esteroideogénesis y la diferenciación de las células de la granulosa, sino también para la formación del antro. Además, FSH regula la conexión transzonal entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean (Albertini *et al.*, 2001).

1.2.8.2. Estrógenos

De los dos subtipos de receptores para estrógenos que se han descrito (el receptor de estrógenos- α y el receptor de estrógenos- β , ER α y ER β , respectivamente), las células de la granulosa expresan mayoritariamente el subtipo β (Wang *et al.*, 2000). Actualmente se sabe que los ERs pueden estar localizados en varios sitios dentro de la célula, contribuyendo potencialmente a la acción global de los estrógenos.

1.2.8.2.1. Acciones clásicas y acciones no genómicas de los estrógenos

Los efectos de los estrógenos pueden estar mediados por distintas vías (revisado en Nilsson *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2001). Clásicamente, luego de la unión del ligando el ER nuclear sufre un cambio conformacional, dimeriza con un segundo ER e interactúa con las regiones reguladoras del ADN correspondientes (elementos de respuesta a estrógenos, EREs), activando o reprimiendo la transcripción de los genes que se encuentran río abajo. Alternativamente, un segundo mecanismo involucra la interacción del ER nuclear unido al estradiol con otros factores de transcripción, como la proteína activadora 1 (AP-1) o Sp-1, quienes a su vez se unen a sus elementos de respuesta respectivos en el ADN (revisado en Hall *et al.*, 2001). Esto lleva a alteración en la cromatina, desenrollado de las histonas e interacciones con componentes de la maquinaria basal de transcripción. En ambos escenarios, el reclutamiento de coactivadores (y desplazamiento de co-represores) a los sitios de unión del ADN modula la expresión génica. Estudios *in vitro* han mostrado que en presencia de estradiol, homodímeros de ambos ER inducen la expresión de genes reporteros unidos a un ERE (activación génica directa), mientras que la inducción de genes bajo sitios de unión AP-1 (activación génica indirecta) solo se verifica por homodímeros ER α unidos a estradiol (Paech *et al.*, 1997).

Posteriormente, se describió que también puede ocurrir señalización a través de ERs expresado en la membrana celular (revisado en Levin, 2003). Las acciones del estradiol mediadas por estos receptores se verifican en forma rápida y son denominadas “acciones no genómicas” de los estrógenos. Estos ERs señalizan principalmente a través de acoplamiento, directo o indirecto, con proteínas G.

La interacción entre los ERs ubicados en la membrana con los ERs nucleares puede estar mediada por receptores de factores de crecimiento con actividad de tirosina quinasa, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el receptor del factor de crecimiento similar a insulina de tipo I (IGF-IR). Estos receptores de factores de crecimiento transmiten la señal a quinasas como ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) o PI3K, quienes fosforilan y activan los ERs nucleares dentro de sus dominios AF-1. Este proceso puede ocurrir también en ausencia de esteroides, activándose la vía de las MAPKs por factores de crecimiento (revisado en Hall *et al.*, 2001; Nilsson, 2001). La relación entre los efectos de los estrógenos iniciados en membrana y los genómicos es extremadamente compleja, involucrando también fosforilación de coactivadores iniciada en la membrana y el reclutamiento de estas proteínas al transcriptosoma (revisado en Levin, 2005).

Por último, también se han descrito ERs de ubicación citoplasmática, algunos de los cuales se encuentran localizados en la mitocondria. Actualmente, no se ha determinado la función de este *pool* de ERs (revisado en Levin, 2005).

Por lo tanto, en respuesta a estrógenos, la transducción de la señal puede modular tanto eventos transcripcionales como no-transcripcionales, impactando en la función celular con acciones prolongadas o rápidas.

Como se mencionó anteriormente, las células de la granulosa sufren una serie de divisiones celulares repetidas durante el desarrollo folicular. Si bien la FSH es un estímulo fundamental para promover la división de las células de la granulosa (Goldenberg *et al.*, 1972), los estrógenos constituyen un mitógeno importante para estas células (Pencharz, 1940).

El patrón de proliferación y diferenciación de células de la granulosa, el cual caracteriza el desarrollo natural del folículo, puede reproducirse en ratas hipofisectomizadas por un régimen hormonal específico (Rao *et al.*, 1978; Richards, 1980). Inyecciones de estradiol durante 3 días seguidas por la aplicación de FSH durante 2 días, estimula la proliferación de células de la granulosa y el crecimiento del folículo hasta un estadio preovulatorio. Esta combinación de hormonas incrementa el contenido de ADN y la proporción de células de la granulosa marcadas después de administrar [³H]-Timidina *in vivo* (Rao *et al.*, 1978).

En ratas hipofisectomizadas, el desarrollo folicular se detiene en el estadio preantral (Richards, 1980). Un bloqueo similar en la foliculogénesis ocurre en animales con mutaciones que provocan deficiencia, desregulación o insensibilidad a gonadotrofinas, como los modelos de ratón hipogonadal (Mason *et al.*, 1986), con delección de la subunidad (de FSH (Kumar *et al.*, 1997) o del receptor de la hormona (Dierich *et al.*, 1998). Los ratones deficientes en el receptor de estrógenos tipo- α también presentan crecimiento folicular anormal e infertilidad (Lubahn *et al.*, 1993), aunque el desarrollo de los folículos hasta estadio antral se debería a la presencia del receptor de estrógenos tipo- β en las células del folículo (Byers *et al.*, 1997). Estos modelos han indicado que gonadotrofinas y estrógenos son los principales factores tróficos que controlan la proliferación y diferenciación de células de la granulosa in vivo, en fases posteriores al folículo preantral.

El efecto mitogénico de estas hormonas ha sido difícil de demostrar en los sistemas de cultivo comúnmente utilizados para el estudio de la diferenciación de células de la granulosa (Hsueh *et al.*, 1984). Resultados de distintos laboratorios han demostrado que tanto FSH como estradiol, cuando se administran de manera separada, ejercen efectos inhibitorios sobre el crecimiento de células de la granulosa (Feng *et al.*, 1986; Dodson y Schomberg, 1987; Hammond y English, 1987; Reilly *et al.*, 1996). Sin embargo, utilizando un sistema de cultivo de células de la granulosa de rata en alta densidad, la combinación de FSH y esteroides sexuales, en concentraciones fisiológicas, puede ejercer un efecto de estimulación pronunciado sobre la síntesis de ADN (Bley *et al.*, 1997). Actualmente se acepta que en los efectos proliferativos del estradiol están involucradas las acciones no-genómicas de los estrógenos, en las cuales participa, como se explicó anteriormente, la vía de las MAPKs u otras quinasas como la PKA –proteína quinasa A- (revisado en Nilsson *et al.*, 2001; Levin, 2003; Levin, 2005).

Los estrógenos ejercen, como se deduce de todo lo expuesto, una acción crítica a nivel ovárico (Williams, 1945; Goldenberg *et al.*, 1972). A nivel de las células de la granulosa, los estrógenos promueven la división celular (Bradbury, 1960; Rao *et al.*, 1978) y ejercen un efecto antiatrético directo (Payne y Hellbaum, 1955; Ingraham, 1959). Por otro lado, el estradiol y sus agonistas tienen una función importante en la promoción de uniones estrechas intracelulares (Merk *et al.*, 1972; Burghardt y Matheson, 1982; Stein *et al.*, 1991), en el agrandamiento del antro y en el aumento de sus propios receptores (Richards, 1980). A su vez, amplifican la expresión de receptores de FSH y LH estimulados por FSH (Louvet y Vaitukaitis, 1976; Richards *et al.*, 1979) y la acción de FSH sobre inducción de la aromatasa (Hadshi y Hsueh, 1982). Esto último implica que los estrógenos regulan la propia producción de estradiol por las células de la granulosa (Figura 1.8). La capacidad de los estrógenos de

aumentar la actividad de la enzima que los forma a partir de andrógenos, sería responsable del aumento exponencial de los niveles de estradiol. Se ha sostenido que esta forma de auto-amplificación podría jugar un papel central en el proceso de selección folicular y en el establecimiento de la dominancia (Hsueh *et al.*, 1984). El(los) folículo(s) seleccionado(s) reducen los niveles de FSH a través de la alta producción de estradiol, impidiendo así la maduración de otros folículos. Sin embargo, los folículos seleccionados continúan su desarrollo aún con los niveles de FSH disminuidos.

1.2.8.2.2. Catecolestrógenos

Los estrógenos primarios, estradiol y estrona, son capaces de sufrir reacciones de hidroxilación en los carbonos C2 y C4 del anillo A, dando lugar a la formación de compuestos llamados catecolestrógenos (2-hidroxiestradiol -2OHE- y 4-hidroxiestradiol -4OHE-, respectivamente). Estas reacciones son catalizadas por las enzimas pertenecientes al citocromo P450 1A1 y 1B1 (CYP1A1 y CYP1B1), respectivamente. Estos grupos hidroxilo en las posiciones C2 y C4 pueden ser luego *O*-metilados por la enzima catecol-*O*-metiltransferasa (COMT) para formar metoxiestrógenos, como el 2-metoxiestradiol -2MOE- (Figura 1.9).

Se ha planteado un rol regulador local para los catecolestrógenos, generados *in situ*, en varios tejidos blanco de estrógenos. En particular, estos compuestos han sido propuestos, junto con los factores de crecimiento, como factores que ejercen mecanismos de regulación intraováricos o autócrinos/parácrinos en el desarrollo folicular. Se ha reportado que el 2OHE, el más estudiado de los catecolestrógenos, está presente en concentraciones del orden de nanomolar en el fluido folicular. Además, las enzimas responsables de convertir al estradiol en estos compuestos se expresan de forma abundante en células de la granulosa y de la teca y su actividad aumenta durante el desarrollo folicular en cerdo (revisado en Spicer y Hammond, 1989). Como se mencionó anteriormente, la expresión de estas hidroxilasas está regulada a nivel transcripcional por el AHR.

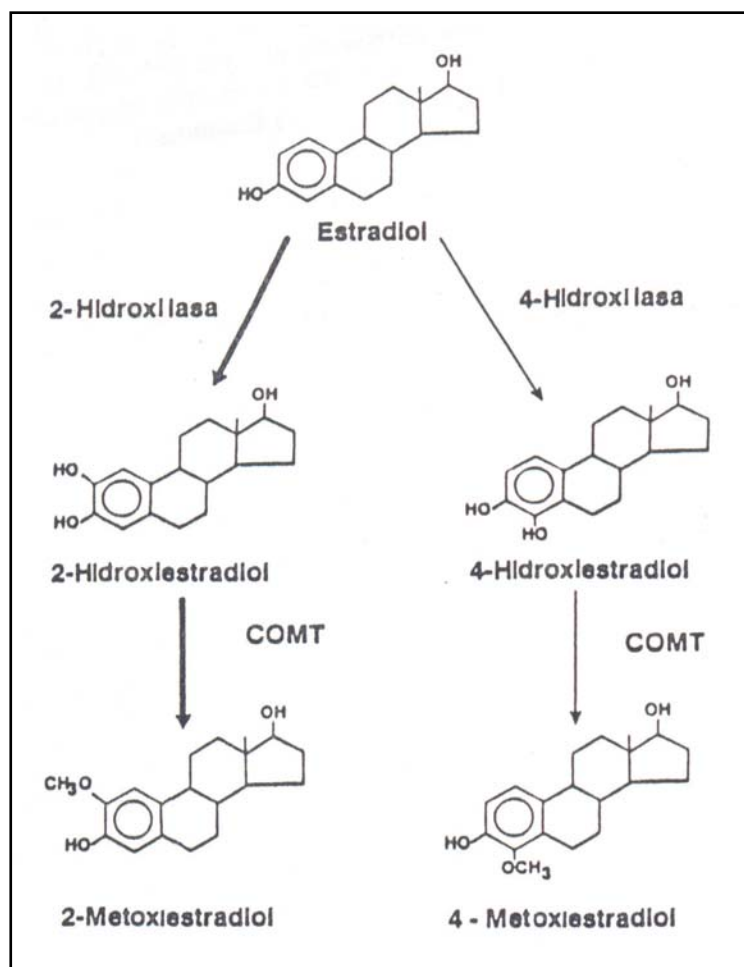


Figura 1.9. Esquema de la biosíntesis de catecolestrógenos dentro del folículo ovárico. El estradiol es preferentemente convertido a 2-hidroxiestradiol vía una 2-hidroxilasa (CYP1A1) y posteriormente metabolizado a 2-metoxiestradiol por medio de la catecol-O-metiltransferasa (COMT). El mismo camino es seguido también por la estrona (Spicer y Hammond, 1989).

Se ha demostrado que el efecto del 2OHE sobre la diferenciación folicular es comparable con el de estradiol y gonadotrofinas, y mayor que el de catecolaminas y andrógenos. Distintos estudios han mostrado que la acción del 2OHE es mediada por un mecanismo distinto de los que median los efectos de otras clases de hormonas (revisado en Spicer y Hammond, 1989). Este catecolestrógeno puede también intensificar las acciones de otras hormonas tróficas, epinefrina, LH y FSH, mediante la generación de un aumento en la producción de cAMP estimulada por hormonas. Otros estudios han sugerido que el 2OHE y su derivado *O*-metilo tendrían un efecto inhibitorio sobre la replicación de células de la granulosa (revisado en Spicer y Hammond, 1989). Dados todos estos antecedentes, se plantea que la interacción entre catecolestrógenos, catecolaminas y gonadotrofinas serían un mecanismo de regulación importante durante el desarrollo folicular.

Sin embargo, los catecolestrógenos pueden ejercer efectos que difieren marcadamente de aquellos ejercidos por el estradiol, dependiendo del tejido, la especie y el parámetro estudiado. El papel fisiológico de estos compuestos no se ha establecido hasta el momento en forma fehaciente, sin embargo numerosas evidencias experimentales indicarían que los mismos podrían jugar un papel relevante en la tumorigénesis mamaria. Según una de las hipótesis imperantes, el 2HOE promovería la formación de tumores mientras que el 2MOE tendría una importante acción antitumoral (Mukhopadhyay y Roth, 1998; Schumacher *et al.*, 1999). Más aún, se ha encontrado cierta correlación entre el predominio de la 2-hidroxilación sobre la 4-hidroxilación y la formación de tumores estrógeno dependientes (Liehr y Ricci, 1996).

El hecho de que el 4HOE sea capaz de ejercer efectos tróficos a nivel uterino aún en ratones en los que se ha delecionado el receptor nuclear de estrógenos α o en presencia de bloqueantes de los receptores α y β (Das *et al.*, 1997) ha llevado a postular la existencia de un mecanismo alternativo para la acción de este esteroide.

Por otra parte, el 2MOE ejerce un marcado efecto antiproliferativo en tejidos donde el estradiol es mitogénico (Zhu y Conney, 1998). Su mecanismo de acción podría diferir radicalmente del esquema clásico de acción de hormonas esteroideas, habiéndose propuesto un efecto a nivel de microtúbulos (D'Amato *et al.*, 1994).

Todos los estudios referidos a la acción de catecolestrógenos en ovario se han centrado en la diferenciación celular, fundamentalmente en la regulación de la esteroidogénesis. Sin embargo ciertas evidencias experimentales en otros órganos blanco indicarían que es a nivel de la regulación de la proliferación celular donde podrían observarse mayores diferencias con respecto a la acción clásica de los estrógenos.

Hasta el momento, no se ha dilucidado la regulación fisiológica de las enzimas responsables de la formación de estos metabolitos a nivel ovárico, aunque existen evidencias de cambios en la expresión asociados al desarrollo folicular (Leighton *et al.*, 1995) y se ha reportado inducción de los transcritos para las enzimas CYPs por estrógenos *in vitro* y en líneas celulares (revisado en Tsuchiya *et al.*, 2005).

Sobre la base de varios estudios realizados en distintas especies, se sostiene actualmente que la interacción entre los catecolestrógenos y las gonadotrofinas (entre otros) sería un importante mecanismo de regulación durante el desarrollo folicular (revisado en Spicer y Hammond, 1989).

1.2.8.3. Reguladores peptídicos intraováricos

Si bien las hormonas hasta ahora mencionadas ejercen un papel fundamental en el control del desarrollo folicular, se sabe que factores peptídicos intraováricos modulan localmente sus acciones (Adashi y Rohan, 1992; Greenwald y Roy, 1994). La participación de factores parácrinos y autócrinos, quienes sensibilizan a la acción de gonadotrofinas, constituyen un mecanismo que explica la estimulación del crecimiento de las células de la granulosa por estas hormonas en la selección folicular. Además, los estadios más tempranos del crecimiento folicular se asumen independientes de las gonadotrofinas circulantes (Greenwald y Roy, 1994; Richards, 1980), por lo que se acepta que la iniciación del crecimiento folicular está regulada por factores ováricos que actúan de forma autócrina y parácrina. Aún después de la formación del antro, cuando el desarrollo folicular es dependiente de las gonadotrofinas y los estrógenos, los procesos de crecimiento y selección folicular no son explicables exclusivamente por acción de estas hormonas.

Se ha descrito y estudiado en detalle el importante efecto que tienen sobre la función ovárica los factores de crecimiento y diferenciación. Algunos de estos factores con funciones autócrinas/parácrinas sobre las células ováricas son el IGF (I-III, factor de crecimiento similar a insulina de tipo I a III); IGF-BPs (proteínas ligadoras de factor de crecimiento similar a insulina); EGF (factor de crecimiento epidérmico); TGF- β (factor de crecimiento transformante de tipo β); Activina; Inhibina; Folistatina; TNF- α (factor de necrosis tumoral- α); GDF-9 (factor de crecimiento y diferenciación 9); BMP-3 (proteína morfogénica ósea-3) y BMP-15 (proteína morfogénica ósea-15), entre otros. Sus acciones han sido caracterizadas en término del crecimiento y la diferenciación en los distintos pasos dentro de la foliculogénesis, la formación y la maduración del ovocito (como ejemplo, ver revisión en van den Hurk y Zhao, 2005; Demeestere *et al.*, 2005).

En la Figura 1.10 se muestra un esquema que muestra sintéticamente varios de los factores endócrinos, parácrinos y autócrinos involucrados en el control del desarrollo folicular.

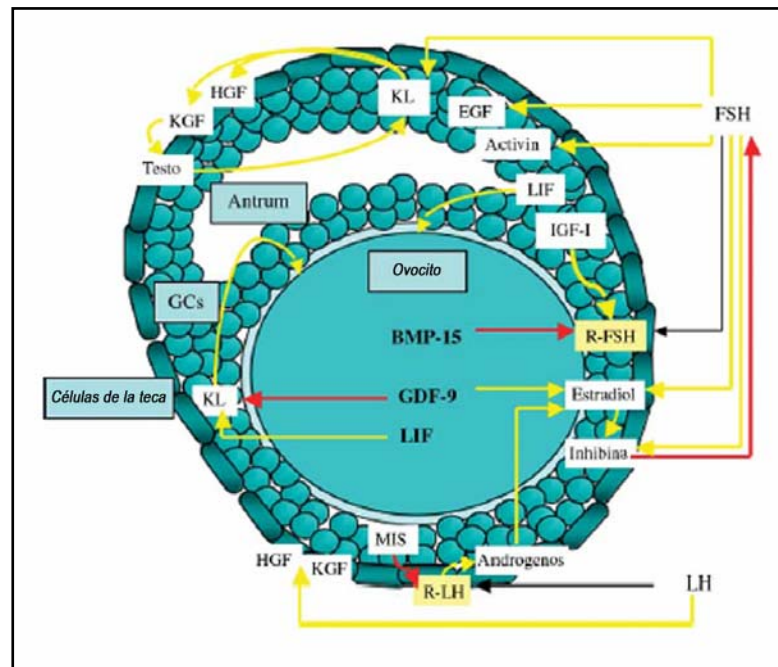


Figura 1.10. Factores involucrados en el control del desarrollo folicular: control negativo (flechas rojas) y control positivo (flechas amarillas). GDF, factor de crecimiento y diferenciación-9; KGF, factor de crecimiento de queratinocitos; GH, hormona de crecimiento; IGF-I, factor de crecimiento similar a insulina-I; KL, ligando *kit*; LIF, factor inhibidor de leucemia; EGF, factor de crecimiento epidermal; BMP-15, proteína morfogénica ósea-15; HGF, factor de crecimiento de hepatocito; MIS, sustancia inhibitoria mulleriana; FSH, hormona folículo estimulante; LH, hormona luteinizante; R-LH y R-FSH, receptores para LH y FSH; Testo, testosterona; GCs, células de la granulosa. Tomado de Demeestere *et al.*, 2005

1.2.8.4. Regulación por ligandos del receptor de aril hidrocarburos

Los procesos reproductivos y del desarrollo reflejan una cadena de eventos intrincada y altamente regulada que requiere de la integración precisa de un sistema endócrino, parácrino y autócrino funcional. Los químicos ambientales exógenos que imitan, inhiben o modulan los mensajes endócrinos endógenos pueden inevitablemente producir alteraciones en el desarrollo folicular y en otros procesos que ocasionarán perturbaciones en las funciones reproductivas.

Se ha demostrado que los ligandos del AHR como el TCDD y compuestos relacionados alteran el crecimiento y la diferenciación celular, y afectan la homeostasis y el balance hormonal, modulando tanto la inducción de enzimas y factores de crecimiento como a sus respectivos receptores (DeVito y Birnbaum, 1995). Se ha reportado que TCDD puede alterar la esteroidogénesis tanto en la fase folicular como en la luteal del ciclo ovárico del cerdo (Gregoraszcuk, 2002). Además, los compuestos xenobióticos pueden actuar de una manera estrogénica o antiestrogénica (revisado en Safe y Krishnan, 1995), alterar los niveles de tiroxina (Van Birgelen *et al.*, 1995) y de varios factores de crecimiento (incluyendo sus receptores) (Abbott y Birnbaum, 1990; Dohr *et al.*, 1994), modular la expresión de glucocorticoides (Abbott *et al.*, 1994; Abbott, 1995), inducir apoptosis en ovocitos, llevando a falla ovárica prematura, o en células germinales ováricas de fetos en desarrollo (Matikainen *et al.*, 2001; Matikainen *et al.*, 2002), o adelantar la transición a la senescencia reproductiva en ratas (Franczak *et al.*, 2006). Por otro lado, basado en experimentos de varios laboratorios realizados en distintas especies, se han descrito interacciones entre el AHR y los receptores de hormonas esteroideas y la participación de este receptor en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (revisado en Pocar *et al.*, 2005).

El intento de evaluar el rol del AHR en ausencia de la activación por compuestos xenobióticos llevó a la producción de ratones deficientes en el *Ahr* por parte de tres grupos de investigación independientes (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996; Mimura *et al.*, 1997). Esos modelos de animales *knockout* mostraron una gran variedad de deficiencias reproductivas complejas en los ratones hembras con ausencia de expresión del *Ahr*, incluyendo muerte durante la preñez y la lactancia de las hembras *-/-*, un tamaño menor de crías al nacimiento, una pobre supervivencia de las crías durante las dos semanas posteriores al nacimiento y muerte de las crías *-/-* luego del destete. El pobre éxito reproductivo en estos animales carentes del AHR refleja probablemente la disrupción de múltiples procesos biológicos. Un análisis más extensivo de los animales *-/-* de más edad mostró hipertrofia uterina con trombosis y mineralización de los vasos serosos (Fernandez-

Salguero *et al.*, 1997). Además, se observó un número aumentado de folículos primordiales en las hembras -/- de 2 a 4 días de edad (Benedict *et al.*, 2000; Robles *et al.*, 2000). Las hembras carentes del *Ahr* mostraron a los 53 días de edad un número disminuido de folículos antrales (Benedict *et al.*, 2000) y resistencia a sufrir apoptosis por parte de las células germinales (Robles *et al.*, 2000). Estos resultados indican que el número disminuido de folículos antrales observado en las hembras *knockout* para el *Ahr* podría ser insuficiente para llevar a cabo la síntesis hormonal necesaria durante la preñez y la lactancia.

Más aún, otro estudio ha sugerido que la delección del *Ahr* causa perturbaciones en el crecimiento folicular y, concomitantemente, reduce el número de folículos que ovulan y transforman en cuerpo lúteo (Benedict *et al.*, 2003). Esto podría implicar al AHR como un novedoso regulador de la ovulación. En concordancia con esta hipótesis, se ha demostrado que el pico de gonadotropina ovulatoria induce la expresión del gen *Ahr* en el ovario del macaco (Chaffin *et al.*, 1999) y se ha sugerido un rol directo de la vía de señalización del AHR en la reanudación de la meiosis en ovocitos de mamíferos (Pocar *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que el AHR está involucrado en la inducción de la expresión de la aromatasasa (Baba *et al.*, 2005).

Por lo tanto, el factor de transcripción *bHLH* AHR parece tener un prominente rol funcional en la reproducción femenina, haciendo que resulte de gran interés la realización de investigaciones en este campo.

1.3. Modelo experimental: cultivos primarios de células de la granulosa

Numerosos laboratorios han estudiado la maduración de las células de la granulosa *in vitro* y han dilucidado el control hormonal de su diferenciación, estudiando aspectos como la biosíntesis de esteroides, la regulación de los receptores de gonadotropinas, la comunicación intercelular o la regulación de la expresión de diversos genes involucrados en estos procesos (Hsueh *et al.*, 1984). Sin embargo, los mecanismos de regulación de la proliferación de estas células han sido comparativamente menos estudiados.

Un número importante de los estudios originales se ha realizado en medio de cultivo suplementado con suero. Éste provee nutrientes, factores de crecimiento y hormonas que facilitan la adhesión celular, el mantenimiento y el crecimiento de las células *in vitro*. Sin embargo, las células de la granulosa *in vivo* están separadas de los vasos sanguíneos y de las células de la teca por una membrana basal que rodea al folículo, la cual disminuye el

acceso a numerosos factores presentes en la circulación. El reemplazo del suero por medios definidos ha puesto en evidencia respuestas que permanecían enmascaradas por su presencia.

Los experimentos presentados en esta tesis han sido realizados utilizando un modelo experimental que permite el estudio de los factores que controlan la proliferación (y también la diferenciación) de células foliculares. Dicho modelo ha sido desarrollado y validado en el laboratorio (Bley *et al.*, 1991) y consiste en cultivo de células de la granulosa obtenidas de folículos preantrales de ratas inmaduras luego del tratamiento de las mismas con implantes conteniendo dietilstilbestrol (DES), un agonista de estrógenos. Las células son cultivadas sobre una matriz de colágeno y mantenidas en medio definido, libre de suero, en presencia de diferentes factores.

El modelo experimental elegido provee una serie de ventajas: las células se encuentran en un estado relativamente indiferenciado; el tratamiento con estrógenos *in vivo* induce la formación de múltiples folículos preantrales y provee un número de células relativamente homogéneas en un mismo estado de desarrollo; el aislamiento de las células no requiere tratamiento con enzimas; el cultivo en medio libre de suero permite estudiar el efecto de gonadotrofinas, esteroides, factores peptídicos y otros compuestos sin interferencia del suero; los cultivos primarios de granulosa, a diferencia de la mayoría de las líneas celulares obtenidas, mantienen respuesta hormonal y funciones fisiológicas semejantes a las condiciones *in vivo*, tanto en la modulación del crecimiento como en la regulación de la esteroidogénesis.

Sin embargo, si bien los cultivos celulares constituyen un medio conveniente y reproducible para estudiar la regulación hormonal del crecimiento y diferenciación, presentan las siguientes limitaciones: los métodos *in vitro* no tienen en cuenta cambios en la vasculatura y microcirculación folicular, importante para el acceso de hormonas a los folículos *in vivo*; el cultivo de células aisladas no tiene en cuenta las interacciones entre distintos tipos celulares como con las células de la teca o la relación con los complejos cumulus-ovocito; el cultivo celular no tienen en cuenta la heterogeneidad estructural y funcional de las subpoblaciones de células de granulosa en un folículo dado.

1.4. Objetivos

Objetivo general

En el desarrollo del folículo ovárico, las células de la granulosa tienen la capacidad de interactuar de manera específica con las señales hormonales, parácrinas y autócrinas que llegan a estas células y dirigen los procesos de crecimiento y maduración folicular. Existen evidencias de que el receptor de aril hidrocarburos, activado por su aún no identificado ligando endógeno o por contaminantes ambientales, ejercería una importante regulación sobre los procesos mencionados.

Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis es estudiar el rol del receptor de aril hidrocarburos en la regulación de la función de las células de la granulosa.

Objetivos particulares

A los efectos de facilitar la presentación y el análisis de los resultados obtenidos, esta tesis ha sido dividida en dos módulos. El primero trata sobre la acción que ejerce el receptor de aril hidrocarburos en la regulación de la función de las células de la granulosa, mientras que el segundo detalla la regulación de la expresión del receptor en estas células ováricas.

Los objetivos particulares de cada módulo son:

1. - Determinar el efecto de distintos compuestos descriptos como ligandos del receptor de aril hidrocarburos sobre la proliferación de las células de la granulosa de rata, tanto en condiciones control como en presencia de las hormonas clásicas que regulan la función de estas células.
- Verificar la participación del receptor de aril hidrocarburos en los efectos hallados.
- Establecer si ligandos del receptor de aril hidrocarburos tienen la capacidad de modular la producción de estradiol por parte de las células de la granulosa.

- Estudiar el efecto de los catecolestrógenos, cuya síntesis es llevada a cabo por enzimas reguladas transcripcionalmente por el receptor de aril hidrocarburos, sobre la proliferación de las células de la granulosa, determinando si ejercen efectos diferenciales con respecto al estradiol.
- //.
- Estudiar la posible regulación fisiológica de la expresión del receptor de aril hidrocarburos en células de la granulosa, determinando los puntos de modulación implicados.
 - Analizar el efecto de la activación del receptor de aril hidrocarburos sobre su propia expresión y sobre la respuesta desencadenada en células de la granulosa, determinando los mecanismos subyacentes.

2. Materiales y Métodos

2.1. Reactivos

La FSH ovina (NIDDK-oFSH-20) se obtuvo del *National Hormone and Pituitary Program*. Los catecolestrógenos 2-hidroxiestradiol, 4-hidroxiestradiol y 2-metoxiestradiol fueron provistos por Steraloids, INC (Newport, USA). ICI 182,780 fue obtenido por Tocris (Ballwin, MO, USA). La [metil-³H]-Timidina se obtuvo de Dupont NEN Research Products (Boston, MA). L-triptofano fue provisto por ICN Biomedicals y lactacistina por Calbiochem, EMD Biosciences, Inc. Dietilstilbestrol (DES), 17 β -estradiol (estradiol) y el resto de los reactivos fueron provistos por SIGMA (St. Louis, MO, USA), excepto donde se especifica lo contrario.

El colágeno fue preparado a partir de cola de rata como se describió previamente (Bley *et al.*, 1992).

2.2. Obtención y cultivo de células de la granulosa

Ratas inmaduras (21 a 23 días) de la cepa Sprague-Dawley mantenidas en la colonia del instituto con comida y agua *ad libitum* fueron tratadas con implantes de dietilstilbestrol (5mg DES/implante) durante 4 días (Bley *et al.*, 1992). Los procedimientos utilizados están revisados y aprobados por el Comité de Investigación Animal de nuestra institución, quienes siguen los lineamientos del *National Institute of Health*, USA. Las células de la granulosa fueron preparadas y cultivadas como se ha descrito previamente (Bley *et al.*, 1992). Concisamente, los ovarios fueron liberados de tejido conectivo y adiposo y se trataron secuencialmente con una solución de EGTA 6,8 mM y sacarosa 0,5 M en medio de cultivo (DMEM:F12, conteniendo Hepes 10 mM, pH:7,4). Las células de la granulosa fueron obtenidas por extrusión a través de una malla de nytex (Nytex 50, Geneva, Switzerland) y resuspendidas en medio de cultivo. Para eliminar las células de la teca/intersticiales contaminantes, la suspensión cruda de células de la granulosa fue sembrada en una solución de Percoll 40% en solución fisiológica y centrifugada a 400 x g durante 20 min. La capa de células de la granulosa purificadas se aspiró de la superficie de la solución de Percoll y se resuspendió en DMEM-F12 (1:1) suplementado con bicarbonato de sodio (2,4 g/l; pH: 7,4) conteniendo antibiótico. La viabilidad se evaluó por exclusión de azul de tripán. Las células fueron cultivadas en placas de plástico (Nunc, Roskilde, Denmark) cubiertas previamente con colágeno purificado de tendones de cola de rata. La densidad inicial de

plaqueo fue de 3×10^5 células viables/cm², excepto que se indique lo contrario. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Luego de 2 horas, se aspiró el medio para remover las células no adheridas y se reemplazó por medio fresco conteniendo las hormonas y factores en estudio, según el diseño experimental. Todos los cultivos celulares se realizaron en ausencia de suero, excepto si se indica lo contrario.

2.2.1. Incorporación de timidina

La síntesis de ADN se determinó por incorporación de [³H]-Timidina de acuerdo al método previamente validado en estas condiciones de cultivo (Bley *et al.*, 1992; Bley *et al.*, 1991; Dain *et al.*, 1993). Luego de 24 h de estimulación, se agregó la timidina tritiada (4μCi/ml) y los cultivos se cosecharon a las 48 h de sembradas las células sobre filtros de fibra de vidrio (Wathman GF-C), usando un cosechador automático (Nunc). La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido. En cada experimento, los distintos tratamientos fueron realizados por cuadruplicado.

2.2.2. Transfecciones transitorias para ensayos de activación de transcripción y para sobre-expresión del receptor de aril hidrocarburos

Las transfecciones transitorias con construcciones reporteras se llevaron a cabo por medio de la técnica de co-precipitación en suspensión con fosfato de calcio. Se co-transfectaron las células de la granulosa con 6 μg/well del plásmido *pTK-Red-ERE-LUC* (provisto por Dr. M. Beato) y 6 μg/well del plásmido control *pCMV-β-Galactosidase* (Clontech, CA, USA). Luego se sembraron las células en placas múltiples de 6 wells, a una densidad de 3×10^6 células viables/well en medio libre de rojo fenol y de antibióticos (DMEM-F12 1:1, 2,2 g/l bicarbonato, pH: 7,4 sin rojo fenol) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células no adheridas fueron removidas 16 h después y se agregó medio fresco libre de rojo fenol y sin FBS. Cuatro horas después, se cambió el medio por medio libre de rojo fenol sin FBS conteniendo los diferentes estímulos. La incubación con los estímulos se realizó durante 24 h.

Para los ensayos de sobre-expresión, las células de la granulosa fueron sembradas en cámaras-portaobjetos LAB-TEK® *Chamber Slide™* (Nalge Nunc International Corp., Naperville, IL, USA) a una densidad de 3×10^5 células viables/well. Luego de 18 h, las células fueron transfectadas transitoriamente con un vector de expresión que codifica para el *Ahr* de rata, provisto por Dr M. S. Denison. La transfección fue realizada en medio sin suero y

libre de antibióticos utilizando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Molecular Research Center, Inc.) a 0,75 μ l liposomas/cm² y 500 ng ADN/cm². Veinticuatro horas luego de la transfección, los medios fueron cambiados por medio fresco con antibiótico y se agregaron los distintos estímulos. Luego de 36 h de estímulo, las células fueron fijadas en P-formaldehído 4% durante 10 min y se procedió a realizar inmunofluorescencia.

2.2.3. Procedimiento de lavado de β -naftoflavona

Las células incubadas con β -naftoflavona fueron lavadas de este compuesto por medio de una serie de cinco lavados de 20 min de duración cada uno con PBS-BSA 0,25% (2 ml para las células cultivadas en P-35 y 100 μ l para las cultivadas en P-96) seguido de un lavado final sólo con PBS, usando los mismos volúmenes y con la misma duración. Luego se agregó medio de cultivo con vehículo y se continuó con la incubación. El mismo procedimiento fue aplicado a las células control. Se ha demostrado que protocolos similares son efectivos para la remoción de esteroides durante cultivos (Xiong y Ferrell, 2003).

En los experimentos donde la incubación debía proseguir en presencia de otros estímulos, dichos compuestos fueron agregados nuevamente en el medio fresco, a las mismas concentraciones que inicialmente. Esto puede introducir cierta variabilidad con respecto a los ensayos estándar, ya que la concentración efectiva de dichos estímulos no es conocida en forma precisa. Este hecho se encuentra contemplado al aplicar el mismo procedimiento a los cultivos tratados solo con los compuestos en cuestión y sin β -naftoflavona.

2.3. Ensayo de actividad luciferasa

Las células cultivadas durante 24 h fueron lavadas dos veces con PBS y lisadas en 200 μ l de buffer de lisis 1X (*Reporter Lysis Buffer*, Promega, WI, USA). El extracto limpio en solución, resultante luego de centrifugación, fue ensayado para su actividad luciferasa y de β -Galactosidasa, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega, WI, USA).

La eficiencia de transfección de las células fue contemplada por medio de la normalización por actividad β -Galactosidasa en cada well, y la actividad luciferasa se expresó en unidades relativas de luz (RLU), como porcentaje de la actividad observada en los controles tratados sólo con vehículo (etanol), valor que fue establecido arbitrariamente como 100%.

2.4. Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas en P-formaldehído 4% durante 10 min. Luego de lavar con PBS, se permeabilizaron por medio de incubación durante 30 min con Triton X100 0,25%, se lavaron posteriormente con PBS y se bloqueó por 30 min con suero normal de cabra 10%-1% BSA en PBS-Tween 20 (0,05%). La incubación con los primeros anticuerpos contra ciclina D2 (Santa Cruz Biotechnology, INC, diluidos 1:500) y AHR (Affinity BioReagents, diluido 1:500) fue hecha durante 16 h a 4°C. Luego de esto, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con IgG anti-conejo conjugado con CyTM3 e IgG anti-ratón conjugada con CyTM2 (Jackson ImmunoResearch, BA USA, diluidos 1:100) por 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, se dejó secar las muestras y se montaron con Mowiol (Hoechst, Frankfurt, F.R.G). Las imágenes fueron luego analizadas con un microscopio de fluorescencia confocal.

2.5. Extracción de ARNm y RT-PCR semi-cuantitativa

Los niveles de expresión del ARNm de *Cyp1a1*, *Cyp1b1* y *Ahr* en las células de la granulosa fueron evaluados por medio de RT-PCR semi-cuantitativa. Las células de la granulosa fueron cultivadas en placas de 6 wells a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células viables/well. Luego de 24 h (para *Cyp1a1*), 6 h (para *Cyp1b1*) o distintos tiempos entre las 4 y 48 h (para el *Ahr*) de incubación con los distintos estímulos, las células fueron lisadas directamente en las placas de cultivo con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Molecular Research Center, Inc.) y se extrajo ARN total de acuerdo a las instrucciones del fabricante (la fase orgánica fue reservada para la extracción de proteínas). El ADNc se sintetizó por transcripción reversa (RT) a partir de ARN total (1µg de ARN en 8 µl de reacción) tratado previamente con desoxiribonucleasa I (DNA freeTM, Ambion Inc.). En cada serie de reacciones de RT se incluyó un blanco sin ARN. A su vez, en las reacciones de PCR subsecuentes se incluyó un control de ARN no sujeto a RT. Se utilizaron alícuotas de 1 µl de reacción de RT para amplificar los distintos fragmentos blanco en reacciones de PCR múltiples (*multiplex PCR*).

- *Cyp1a1* y *Cyp1b1*: Las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar los ADNc blanco de las hidroxilasas fueron las descritas por Dasmahapatra *et al.* (Dasmahapatra *et al.*, 2001). Los *primers* para *Cyp1a1* y los *primers*:competímeros 18S Classic II (Quantum mRNA Ambion, Inc., usados como control interno para normalización en

las reacciones de PCR) generaron fragmentos de 509 y 324 pares de bases (pb), respectivamente. Los *primers* para *Cyp1b1* y los *primers:competímeros* 18S Classic (Quantum mRNA Ambion, Inc.) generaron fragmentos de 372 y 488 pb, respectivamente. En experimentos preliminares se determinó el número de ciclos de amplificación óptimo para cada fragmento de interés, de manera de asegurarse de que las señales resultantes estuvieran siempre en la porción lineal de amplificación. Todos los programas de amplificación incluyeron un paso inicial de 94°C por 3 min y un paso final a 72°C por 5 min. Cada ciclo consistió de 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de hibridación a la temperatura indicada en cada caso y 1 min de extensión a 72°C. La amplificación de los ADNc para *Cyp1a1* y 18S Classic II se realizó con 33 ciclos, 2 mM MgCl₂ y 62°C de temperatura de hibridación. Los ADNc para *Cyp1b1* y 18S Classic fueron amplificados en 32 ciclos, en presencia de 2 mM MgCl₂ y a 65°C de temperatura de hibridación.

- *Ahr*: Las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar los ADNc blanco del *Ahr* fueron las descritas por Timsit *et al.* (Timsit *et al.*, 2002), quienes generaron fragmentos de 917 pb. Como control interno usado en la reacción de PCR para la normalización, se utilizó el par *primers:competímeros* 18S Classic II (amplificación resultante de 488 pb). En experimentos preliminares se determinó el número de ciclos de amplificación óptimo para el fragmento de interés, de manera de asegurarse de que la señal resultante estuviera siempre en la porción lineal de amplificación. Éste fue de 24 ciclos. El programa de amplificación incluyó un paso inicial de 94°C por 3 min y un paso final a 72°C por 5 min. Cada ciclo consistió de 20 seg de desnaturalización a 94°C, 20 seg de hibridación a 54°C y 40 seg de extensión a 72°C. La reacción se llevó a cabo en presencia de 1,5 mM MgCl₂.

Diez microlitros de las reacciones de PCR se resolvieron por medio de electroforesis en geles de agarosa 2% (para las hidroxilasas) ó 1,5% (para el *Ahr*) y se tiñó subsiguientemente con bromuro de etidio. La cantidad relativa de cada ARNm fue cuantificado utilizando el *software* ImageQuant (Amersham Biosciences, Sunnyvale CA, USA) y normalizado a la señal del 18S ribosomal (dada por la proporción de 18S *primers:18S* competímeros usada) para cada muestra.

2.6. Preparación de extractos celulares y Western Blot

- *Ciclina D2* y *PCNA*: Se cultivaron las células de la granulosa en placas de cultivo de 6 wells a una densidad de 2,5 x 10⁶ células viables/well. Luego de 36 h de incubación con los distintos estímulos, las células fueron levantadas en buffer de lisis y procesadas para

extracción de proteínas según las técnicas estándar. Veinticinco microgramos de proteína total (cuantificada por el método de Bradford) se resolvieron en geles de poliacrilamida 12% en condiciones reductoras y se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa. Para corroborar igual carga de proteínas totales en cada calle, las membranas fueron teñidas luego de la transferencia con Ponceau S. Los niveles de expresión de PCNA y ciclina D2 fueron evaluados por medio de técnicas estándares de *Western Blot*, utilizando un anticuerpo contra PCNA generado en ratón (PC10, Santa Cruz Biotechnology, INC, diluido 1:5000) o un anticuerpo contra ciclina D2 generado en ratón (M10, Santa Cruz Biotechnology, INC, diluido 1:100), respectivamente, y el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa apropiado (Amersham Biosciences, UK). La detección se llevó a cabo con un kit de quimioluminiscencia (DuPont NEN, USA). El ensayo se realizó para tres experimentos independientes, obteniendo siempre el mismo patrón de respuesta en cada experimento.

- *AHR*: Se cultivaron las células de la granulosa en placas de cultivo de 6 wells a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células viables/well. Luego de 4, 6, 12, 24 ó 36-48 h de incubación con los distintos estímulos, se lisaron las células directamente en la placa de cultivo con el reactivo TRIzol y se purificaron las proteínas totales de la fase orgánica según las instrucciones del fabricante. El uso de lisados celulares totales en lugar de fracciones subcelulares en el análisis de la expresión del AHR permite evaluar el *pool* celular entero del receptor, sin que interfieran en el resultado factores debidos a los procedimientos de fraccionamiento. Cuarenta microgramos de proteína total (cuantificada por el método de Bradford) se resolvieron en geles de poliacrilamida 8% en condiciones reductoras y se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa. Para corroborar igual carga de proteínas totales en cada calle, las membranas fueron teñidas luego de la transferencia con Ponceau S. Los niveles de expresión de AHR fueron evaluados por medio de técnicas estándares de *Western Blot*, utilizando un anticuerpo contra el AHR generado en conejo (SA-210, Biomol Research Laboratories Inc, PA, USA, 2 µg/ml) y un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa contra conejo (Amersham Biosciences, UK). El primer anticuerpo presentó reacción cruzada con una banda de bajo peso molecular (alrededor de 60 kDa), cuyos niveles de expresión no variaban significativamente con ninguno de los estímulos utilizados en los distintos ensayos y fue por lo tanto usada como control interno. La detección se llevó a cabo con un kit de quimioluminiscencia (DuPont NEN, USA). La cuantificación de las bandas de proteína se realizó con el *software ImageQuant* (Amersham Biosciences, Sunnyvale CA, USA). Las unidades densitométricas obtenidas para la intensidad de las bandas correspondientes al AHR fueron normalizadas a las unidades densitométricas

obtenidas para las intensidades del control interno, y los resultados se expresaron relativos a los valores alcanzados por las células control.

2.7. Determinación de niveles de estradiol

El efecto de los distintos tratamientos sobre la producción de estradiol se evaluó por radioinmunoensayos específicos de estradiol (Barañaño *et al.*, 1991). Se analizaron los niveles acumulados en los medios de cultivo a las 72 h de incubación, en condiciones basales y estimuladas por FSH, en ausencia o presencia de los compuestos de interés. Se añadió a los cultivos androstenodiona (0,35 μM) como sustrato aromatizable.

2.8. Análisis estadístico

Los tratamientos fueron realizados por lo menos por duplicado en cada uno de tres/cuatro experimentos separados independientes. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. Las comparaciones estadísticas de los resultados se realizaron por ANOVA de una vía y test de Tukey-Kramer de comparaciones múltiples luego de transformación logarítmica de datos en caso de ser necesario (Sokal y Rohlf, 1995). Todos los experimentos fueron realizados al menos 3 veces (excepto que se indique lo contrario), obteniéndose resultados similares.

3. Módulo I

***Acción del receptor de aril
hidrocarburos sobre la función
de las células de la granulosa***

3.1. Introducción

EL AHR es capaz de ligar y mediar los efectos tóxicos y biológicos de diferentes clases de compuestos aromáticos, entre los cuales el más potente y caracterizado agonista es el compuesto aromático halogenado 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD). Estudios de unión competitiva usando [³H]-TCDD como radioligando han mostrado que el AHR une estereoselectivamente y con alta afinidad otros congéneres aromáticos halogenados, los cuales son isoestereómeros aproximados de TCDD, y varios hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs) tipificados por el benzo[a]pireno (BaP) y el metilcolantreno (MC). También se ha observado unión competitiva al AHR con muchos otros compuestos estructuralmente diversos, incluyendo los compuestos aromáticos heterocíclicos como el indol-3-carbinol (I3C), las flavonas β-naftoflavona (5,6-benzoflavona) y α-naftoflavona (7,8-benzoflavona) y las fenantrolinas (revisado en Safe, 1995). A su vez, existen distintos compuestos naturales, no sintetizados por el hombre, que se han descrito como ligandos del AHR, la mayoría de los cuales son químicos derivados de plantas incluidos en las dietas, como los flavonoides, carotenoides, triptofano y compuestos fenólicos. Si bien estos pueden activar la vía de señalización del AHR, la mayoría son ligandos relativamente débiles (revisado en Denison *et al.*, 2002). Resulta interesante que los indoles dietarios (incluyendo el indol-3-carbinol y el triptofano) pueden ser convertidos a ligandos o agonistas del AHR significativamente más potentes en el tracto digestivo de los mamíferos (Wattenberg y Loub, 1978; Perdew y Babbs, 1991). La estructura molecular de algunos de los compuestos mencionados se muestra en la Figura 3.1.

Durante muchos años se han observado diferencias significativas en la habilidad que poseen distintos ligandos del AHR en inducir respuestas tóxicas y biológicas en varias especies y tejidos (Poland y Knutson, 1982; Safe, 1986). Estas diferencias pueden ser debidas a variaciones en una amplia gama de características bioquímicas y fisiológicas específicas de la especie o del tejido, las cuales incluyen, pero no se limitan a: diferencias en la farmacocinética, farmacodinámica y/o metabolismo del ligando, funcionalidad del AHR, concentraciones celulares del AHR u otros componentes de la vía de señalización, presencia o ausencia de sitios de unión para el ligando intracelulares o extracelulares, y presencia de otros tipos de efectores reguladores específicos de tejido o de la especie. Existen evidencias a su vez de que las bases moleculares de las diferencias entre especies o cepas en la susceptibilidad a distintos ligandos del AHR estarían relacionadas con polimorfismos en el receptor, como variaciones en el dominio de unión al ligando, en la región C-terminal o mutaciones puntuales en el dominio de transactivación

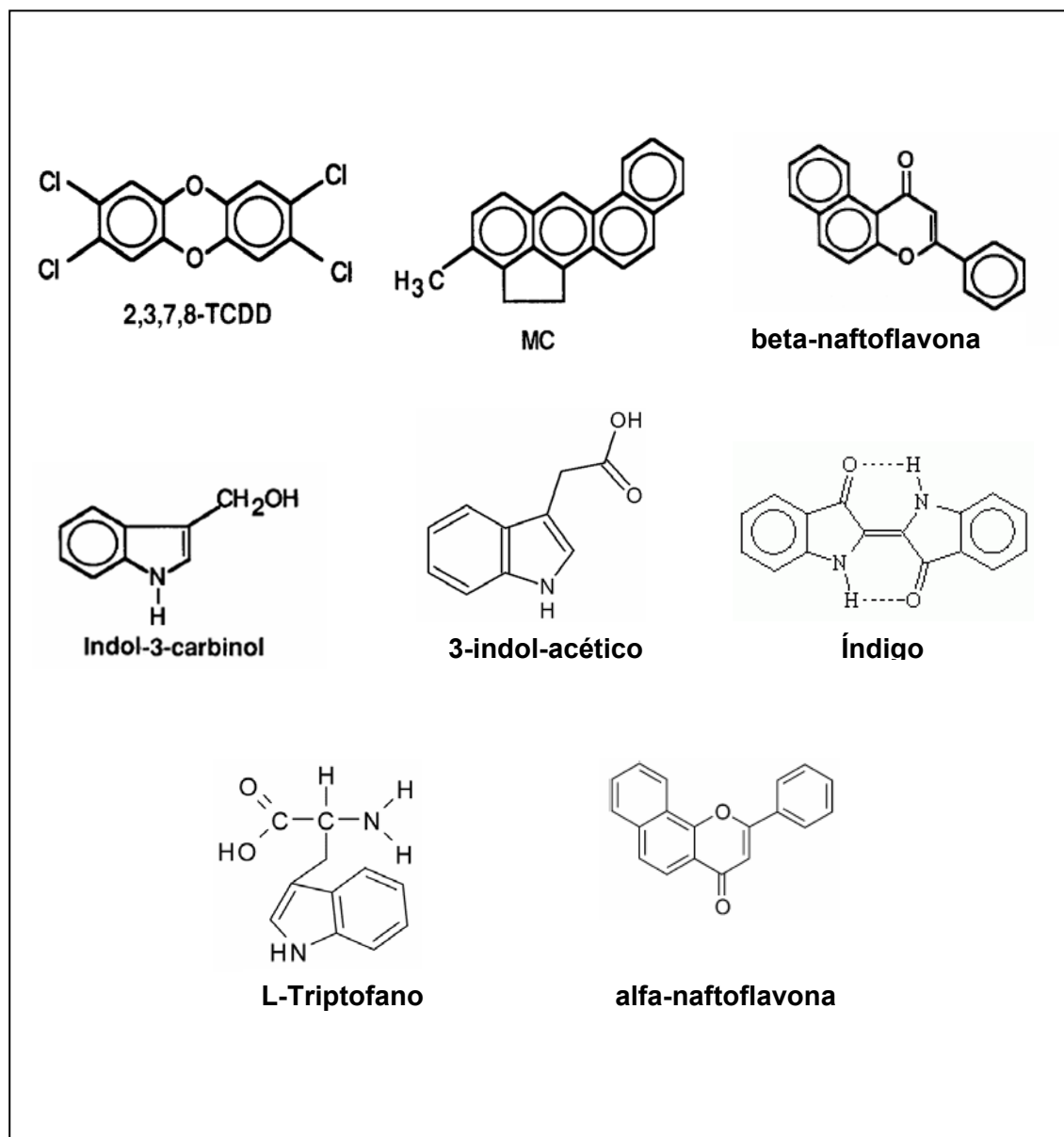


Figura 3.1. Diferentes clases estructurales de ligandos que se unen competitivamente al AHR citosólico. Adaptado de Safe, 1995.

Se ha aceptado que si bien la afinidad de unión de los distintos químicos (hidrocarburos aromáticos halogenados y PAHs) por el AHR puede variar entre las especies, el orden en que se ubican los químicos según su potencia es el mismo. Sin embargo, resultados de distintos laboratorios sugieren que la especificidad por unión al ligando del AHR no es idéntico entre las distintas especies. Por ejemplo, los bifenilos policlorados (PCB) mono-orto sustituidos se unen y activan al AHR humano, pero no son generalmente eficaces en activar al receptor en peces; la α -naftoflavona es capaz de antagonizar la transformación del AHR hepático y su unión al ADN en rata, pero no antagoniza al presente en cobayos (revisado en Denison *et al.*, 2002). Por lo tanto, si bien puede generalizarse que la especificidad de unión del AHR por los ligandos es similar entre especies, existen en algunos casos diferencias importantes en la especificidad y la afinidad que pueden contribuir a las variaciones que se han reportado entre las respuestas en los distintos organismos. Estas observaciones ponen además ciertas restricciones a la especificidad estructural y características fisicoquímicas de los putativos ligandos endógenos fisiológicos, ya que se esperaría que tanto la unión como la activación del AHR por estos se encuentren conservadas entre especies.

Hasta el momento, no se ha encontrado aún un verdadero ligando endógeno para el AHR, por lo que éste continúa siendo considerado un receptor huérfano. Si bien se han sugerido y propuesto numerosos candidatos potenciales, la identidad del ligando endógeno no ha sido fehacientemente identificada. La mayoría de los compuestos que se han propuesto son derivados del triptofano (Rannug *et al.*, 1987). Por ejemplo, el fotoproducto del triptofano 6-formilindol[3,2-*b*]carbazol (FICZ) tiene una alta afinidad de unión por el AHR e induce transitoriamente la expresión del gen *Cyp1a1* (Wei *et al.*, 1999; 2000). Otros ligandos relativamente potentes son el índigo y la indirubina, los cuales han sido aislados de orina humana (Adachi *et al.*, 2001) y son capaces de inducir la actividad enzimática microsomal metabolizante de drogas en ratones (Sugihara *et al.*, 2004). Además, se han identificado varios otros químicos endógenos que se unen al AHR y activan la expresión génica mediada por el receptor, por lo que serían posibles candidatos también. Estos químicos incluyen la bilirrubina y biliverdina (Sinal y Bend, 1997; Phelan *et al.*, 1998), metabolitos del ácido araquidónico como la lipoxina A4 (Schaldach *et al.*, 1999) y varias prostaglandinas (Seidel *et al.*, 2001), 7-cetocolesterol (Savouret *et al.*, 2001) y retinoideos (Soprano *et al.*, 2001; Gambone *et al.*, 2002).

La existencia de ligandos endógenos fisiológicos está apoyada indirectamente por numerosas observaciones que demuestran la activación del AHR y de respuestas mediadas por él en ausencia de ligandos exógenos, como se mencionara anteriormente. Estas

evidencias indirectas incluyen la presencia de complejos de AHR nuclear en cortes de tejido de animales no tratados (Abbott *et al.*, 1994) y en células en cultivo (Singh *et al.*, 1996; Chang y Puga, 1998); inducción de *Cyp1a1* en varios tipos celulares luego de la suspensión de las células en metil-celulosa (Sadek y Allen-Hoffman, 1994; Monk, 2001); fluctuación de la expresión del AHR a lo largo de distintos procesos biológicos (Richardson *et al.*, 1998; Chaffin *et al.*, 1999; Chaffin *et al.*, 2000) y los innumerables defectos y alteraciones observadas en los animales que carecen del receptor. Los estudios realizados con ratones *Ahr* *-/-* sugieren la presencia de ligandos fisiológicos endógenos porque ponen en evidencia que la activación fisiológica es requerida en estadios críticos del desarrollo y durante la función adulta, de lo cual se puede inferir que ligandos endógenos llevarían a cabo esa tarea en los individuos normales (revisado en Gonzalez y Fernandez-Salguero, 1998; Lahvis y Bradfield, 1998; Lahvis *et al.*, 2000).

Dentro de los genes que son regulados por el AHR, los mejor estudiados son aquellos que codifican para las enzimas metabolizantes de xenobióticos, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, se sabe que la cantidad de genes blanco para este factor de transcripción es muy alta, habiéndose descrito en los últimos años numerosos genes cuya expresión es regulada en respuesta a la activación del AHR. Por medio de la utilización de técnicas de micro-arreglos de ADN se ha mostrado que aproximadamente 300 genes son potencialmente alterados por la activación del AHR en la línea celular HepG2 (Puga *et al.*, 2000; Frueh *et al.*, 2001). Sin embargo, solo un tercio de estos genes estarían directamente regulados por el ligando del AHR utilizado (TCDD), ya que los restantes requieren de síntesis proteica para sufrir regulación en su expresión. Al agrupar los genes según sus funciones, se observó que los había involucrados en la regulación de calcio, en la función cardiovascular y pulmonar, en la regulación del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis, en el desarrollo, adhesión celular, cáncer y metástasis, tráfico de proteínas, integridad de membrana, metabolismo de drogas y estabilidad de ADN. Además se identificaron genes con funciones de quinasas asociadas a receptores, fosfatasas y sus efectores y factores de transcripción (Puga *et al.*, 2000). En otro estudio de características similares pero realizado en hepatocitos, se encontró que la expresión de *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Bad* y *cyclooxygenasa 1* es también regulada por el AHR (Kel *et al.*, 2004). La disponibilidad de las secuencias genómicas de humanos, ratón y rata han permitido la identificación y caracterización de promotores y otros elementos de regulación de distintos genes que amplían el conocimiento sobre los blancos del AHR. En un estudio propuesto para identificar putativos DREs en los genomas de humanos, ratón y rata se hallaron unos miles de genes que contienen esa secuencia de reconocimiento en sus promotores, pero solo 48 de ellos son comunes en las

tres especies. Entre ellos, 7 están involucrados en el estrés oxidativo, hipoxia y detoxificación, 5 se encuentran asociados al mantenimiento de la homeostasis de calcio y 5 codifican para proteínas que se localizan en el retículo endoplasmático (Sun *et al.*, 2004). También se han identificado genes regulados por AHR a través de estudios de genes individuales. Por ejemplo, *Hes-1*, quien juega un papel importante en la diferenciación neuronal y en el ciclo celular, así como también *Socs2*, quien suprime la señalización por citoquinas, son nuevos blancos de regulación por AHR (Boverhof *et al.*, 2004; Thomsen *et al.*, 2004). Además, varios genes que codifican para neuropéptidos contienen DREs, lo cual sugiere que TCDD puede regular directamente su expresión en neuronas hipotalámicas (Fetissov *et al.*, 2004). Es interesante que el AHR puede regular también la expresión de factores de transcripción (Puga *et al.*, 2000; Borlak *et al.*, 2002; Kel *et al.*, 2004), lo que podría explicar la regulación mediada por AHR de varios genes que no son blancos directos del receptor (Kel *et al.*, 2004).

Por otro lado, además de su rol tradicional de factor de transcripción activado por ligando, el AHR puede funcionar también como co-activador (Boutros *et al.*, 2004; Sogawa *et al.*, 2004). Río arriba del gen *Cyp1a2* de rata se ha caracterizado un nuevo elemento de respuesta (llamado XRE-II, DRE-II o AHRE-II) al cual se puede unir el heterodímero AHR-ARNT mientras está asociado a un factor aún no identificado (Sogawa *et al.*, 2004). La unión de este complejo conduce a la activación de un conjunto de genes, los cuales constituyen lo que se conoce como la batería génica AHRE-II (Boutros *et al.*, 2004). Hasta el momento se han encontrado 36 genes que contienen motivos AHRE-II y que están conservados en humanos, rata y ratón, de los cuales un tercio responde a TCDD. La batería de genes AHRE-II incluye un gran número de transportadores y canales iónicos (Boutros *et al.*, 2004). A su vez, el heterodímero AHR-ARNT puede funcionar como co-activador de otros factores de transcripción. Por ejemplo, el complejo AHR-ARNT es capaz de reclutar directamente al receptor de estrógenos vacío, y activar la transcripción de genes mediada por éste, como se detallará más adelante (Ohtake *et al.*, 2003).

A su vez, el AHR interactúa con una serie de proteínas, incluyendo factores de transcripción y co-activadores o co-represores. Como ejemplo, los co-activadores transcripcionales SRC-1, activador nuclear (NcoA) y p160 interactúan con el AHR y co-activan la transcripción de genes respondedores a TCDD (revisado en Hankinson, 2005). Por el contrario, interacciones con el mediador silenciador de ácido retinoico y receptor de hormona tiroidea (SMRT) inhiben la expresión génica mediada por el AHR (Nguyen *et al.*, 1999; Rushing y Denison, 2002; Fallone *et al.*, 2004). Existen distintos motivos en el AHR usados en el reclutamiento de co-reguladores. Por ejemplo, SRC-1 y RIP140 interactúan

con el subdominio rico en glutamina del dominio de transactivación del receptor (Kumar y Perdeu, 1999; Kumar *et al.*, 1999). Otras proteínas cruciales en la función celular con las que interactúa el AHR es Rb (Ge y Elferink, 1998, revisado en Bock y Köhle, 2005) y el receptor de estrógenos (revisado en Safe *et al.*, 2000; Pocar *et al.*, 2005), cuyas implicancias se detallarán más adelante. Además, se ha demostrado que el AHR interactúa con las vías de señalización del factor inducible por hipoxia (HIF) independientemente de la competencia por la heterodimerización con ARNT (Chan *et al.*, 1999), con la vía de NF- κ B (Tian *et al.*, 2002) y con la cascada de señalización de la proteína quinasa C (PKC) y de las MAPKs (revisado en Puga *et al.*, 2002; Minsavage *et al.*, 2004; Pocar *et al.*, 2005). Estas últimas no solo pueden ser activadas por el AHR sino que a la vez son capaces de fosforilar y activar al AHR, convirtiendo a esta interacción en una de las interrelaciones más complejas y significativas que posee el receptor. Recientemente, se ha reportado que AMPc, a través de la proteína quinasa A, es capaz de activar al AHR y translocarlo al núcleo, aunque luego éste no se une a ARNT y no activa los genes clásicos respondedores al AHR (Oesch-Bartlomowicz *et al.*, 2005). A su vez, se ha descrito que en el complejo proteico citoplasmático en el que se encuentra el AHR en ausencia de ligando está presente la proteína c-Src. Al unirse el receptor con su ligando, la quinasa c-Src activa parece ser liberada del agregado, resultando en la estimulación de otras proteínas quinasas y pudiendo fosforilar y activar receptores esteroideos como el ER, causando efectos estrogénicos en ausencia de estrógenos (revisado en Pocar *et al.*, 2005).

Dentro de las respuestas celulares mediadas por el AHR que se han señalado en la introducción general, son de particular interés para este trabajo las que ocurren dentro del tracto reproductivo femenino. Estas respuestas no solo ocurren a través del mecanismo clásico de señalización por AHR resumido en la introducción general, sino que muchas veces son originadas por interacciones entre el AHR y los receptores de hormonas esteroideas o la vía de las MAPKs, como se mencionó también con anterioridad. La mayoría de estas interacciones han sido estudiadas en líneas celulares humanas de cáncer de mama y de carcinomas endometriales.

Una de las acciones más conocidas y estudiadas de la activación del AHR es su antiestrogenicidad. *In vivo*, los efectos antiestrogénicos del TCDD más distintivos en roedores son la disminución del peso uterino, reducción en la incidencia de cáncer mamario y uterino, inhibición de la inducción del receptor de progesterona, del receptor de EGF y del proto-oncogen *c-fos* en úteros de roedores inmaduros u ovariectomizados (revisado en Safe *et al.*, 1998). *In vitro*, se han identificado varios genes que son blancos de la interacción entre el ER y el AHR. Dentro de los genes regulados por estradiol que son afectados por el

tratamiento con TCDD se encuentran la *cathepsina D*, *pS2*, el receptor de prolactina, *c-fos*, *hsp27*, *Tgf- α* , *Tgf- β* y el receptor de progesterona (revisado en Nilsson *et al.*, 2001). La proliferación celular y la producción de *foci* post-confluencia inducidas por estradiol también son disminuidas por TCDD (Biegel y Safe, 1990; White y Gasiewicz, 1993; Gierthy y Lincoln, 1988). Sin embargo, los ligandos del AHR descritos hasta el momento no son antagonistas típicos del ER, ya que no compiten con los estrógenos por la unión a ese receptor. En cambio, se han propuesto distintos mecanismos a través de los cuales el AHR podría ejercer sus efectos antiestrógenicos, los cuales se basan en numerosos estudios realizados en distintos sistemas y se describen sucintamente a continuación.

Un mecanismo posible que causaría inhibición de los efectos del estradiol por tratamiento con agonistas como el TCDD es la supresión de la transcripción de los genes inducidos por estradiol por parte del AHR. Se ha demostrado en algunos sistemas que el complejo AHR-ARNT puede inhibir competitivamente la unión del ER- α a EREs imperfectos adyacentes o solapados con sitios XRE (Klinge *et al.*, 1999). Por otro lado, el AHR unido a su ligando puede reconocer y unirse a secuencias genómicas específicas inhibitorias, llamadas elementos inhibitorios de respuesta a xenobióticos/dioxinas (iXRE/iDRE). Los iXRE funcionales están presentes dentro de las regiones promotoras de distintos genes inducibles por estrógenos como el *pS2*, la *cathepsina D* y *c-fos* (revisado en Safe *et al.*, 2000; Nilsson *et al.*, 2001). El AHR activado por TCDD inhibe la expresión de *cathepsina D* inducida por estradiol en células MCF-7 por unirse a un iXRE dentro del promotor de este gen, evitando por lo tanto la formación del complejo ER-SP1 transcripcionalmente activo (Duan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Una interacción inhibitoria similar entre el AHR y el ER ha sido demostrada para el promotor del proto-oncogen *c-fos* en células MCF-7 (revisado en Safe *et al.*, 2000). El complejo AHR-ARNT y el ER ligados cada uno por su ligando no interactúan directamente, si no que ambos complejos como factores de transcripción pueden interactuar físicamente con la proteína SP1 y competir por la unión a ella (Kobayashi *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998a). El AHR unido a su ligando también puede inhibir la unión de ER- α a un ERE en el promotor del gen *pS2* por medio de la interacción con las proteínas activadoras AP-1 (Gillesby *et al.*, 1997). Esta interacción promueve la unión a motivos del tipo XRE/AP-1 y, al mismo tiempo, previene la unión de ER- α a los EREs vecinos. Por lo tanto, el AHR puede funcionar como un represor transcripcional activado por ligando al unirse a iXREs que se solapan o están cercanos a sitios ERE/AP-1 o ERE/SP1, respectivamente, impidiendo o disminuyendo la formación de complejos ER/SP1 o ER/AP-1 transcripcionalmente activos (Figura 3.2 A). A su vez, se ha propuesto la existencia de competencia por cofactores compartidos entre ambos receptores (Figura 3.2 A). El AHR interactúa con varios factores

basales del complejo de transcripción, como la proteína de unión a TATA, el factor de transcripción IIF (TFIIF) y IIB (TFIIB) o con NF-1, mientras que el ARNT hace contacto con TFIIF y CBP. Por lo tanto, los mismos co-activadores y co-represores podrían estar involucrados en la regulación génica llevada a cabo por ambos receptores, representando sitios de competencia (revisado en Nilsson *et al.*, 2001).

Un segundo mecanismo que explicaría que la activación del AHR contrarreste la acción de los estrógenos es la disminución de los niveles de ER (Figura 3.2 B). Experimentos realizados *in vitro* han mostrado que el tratamiento de células MCF-7 y Hepa 1c1c7 con TCDD resulta en una reducción dosis-dependiente en los niveles de ER α (Harris *et al.*, 1990; Zacharewski *et al.*, 1991; Wormke *et al.*, 2000). Ésta podría deberse a degradación proteasomal, a cambios en la síntesis del ER o a alteraciones en el reciclado del receptor. Sin embargo, este fenómeno de disminución de la expresión del ER por activación del AHR no se verifica en otros sistemas, lo que sugiere que su ocurrencia depende del contexto celular (Sone y Yonemoto, 2002).

Se ha sugerido que otro de los mecanismos subyacentes al efecto antiestrogénico que es capaz de ejercer el AHR es el aumento en la tasa de metabolismo del estradiol que genera la inducción de las hidroxilasas CYP1A1 y CYP1B1 (revisado en Nilsson *et al.*, 2001).

Por otro lado, se sostiene además la existencia de interacciones positivas entre el AHR y el ER. Se ha descrito que en células MCF-7 el complejo AHR-ARNT activado por TCDD es capaz de asociarse directamente con ER- α y ER- β en ausencia de estrógenos, resultando en la activación transcripcional de los genes dependientes de ERE (Ohtake, *et al.*, 2003). Este efecto estrogénico del AHR unido a su ligando requiere de la interacción directa del complejo nuclear AHR-ARNT con el ER sin su ligando y el cofactor p300/CBP (Figura 3.2 C). Por el contrario, en presencia de estrógenos, el AHR unido a su ligando exhibe normalmente efectos anti-estrogénicos al suprimir la unión al ADN del ER unido al estrógeno. Estos resultados sugieren fuertemente que la regulación de los efectos estrogénicos mediada por el AHR depende de la concentración de estrógenos. Esto podría explicar parcialmente el efecto estrogénico leve que posee el PCB 126 en el útero de ratas ovariectomizadas y no en ratas normales (Lind *et al.*, 1999).

Todos estos posibles mecanismos de interacción hacen que la activación del AHR pueda resultar en la inhibición o promoción de la señalización por hormonas esteroideas en los tejidos reproductivos, y esto puede, en parte, explicar los resultados contradictorios estrogénicos o antiestrogénicos que pueden ejercer los ligandos del AHR.

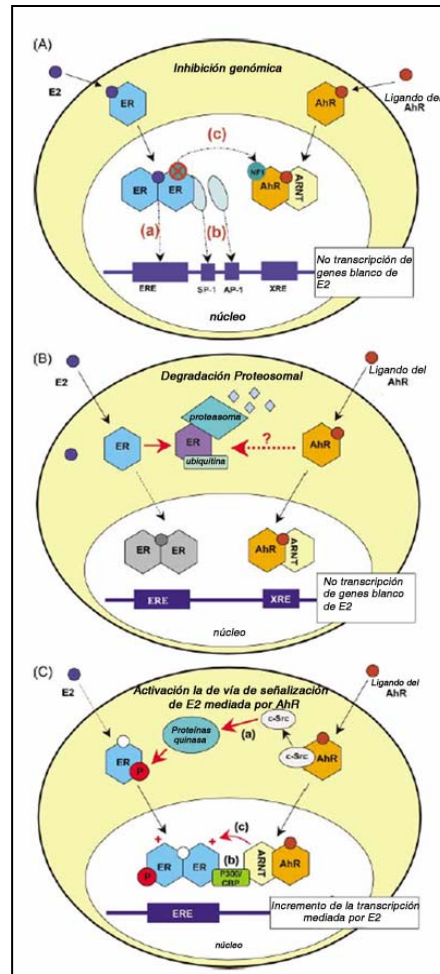


Figura 3.2. A) Mecanismos de inhibición genómica de la transcripción mediada por esteroides por parte del AHR unido a su ligando. La inhibición transcripcional depende de iXREs dentro de las regiones promotoras de genes regulados por estrógenos que impiden la actividad transcripcional del ER por: (a) estar localizados cerca de EREs vecinos; (b) evitar la formación de complejos con ADN ER-SP1 o ER-AP1; y (c) competir por co-factores limitantes (por ejemplo NF-1). Esto se aplica para la interacción del AHR con todos los receptores de hormonas esteroideas, se muestra para el ER. B) Activación del AHR por un ligando exógeno puede reducir los niveles de proteína ER por degradación proteasomal. C) Mecanismos mediados por el AHR que conducen a la activación de la señalización por receptor de hormonas sexuales en ausencia de esteroide. (a) Luego de unirse a su ligando, un cambio conformacional causa la liberación de c-Src del complejo proteico AHR citosólico. c-Src activa varias proteínas quinasas que llevan a la fosforilación y activación de ER. (b) Una asociación directa de los complejos AHR-ARNT con el ER nuclear y el cofactor p300/CBP en ausencia de estradiol. (c) La activación del receptor de hormonas esteroideas por interacción directa con el complejo AHR-ARNT en ausencia de hormona ha sido por ahora solo observada para el ER. Tomado de Pocar *et al.*, 2005.

Como se mencionó en la introducción general, la activación del AHR por un agonista puede desencadenar una variedad de respuestas diversas, entre las que se encuentra la de la regulación de la proliferación. Se ha estudiado y discutido en profundidad el importante rol que el AHR juega en la proliferación de diferentes sistemas (revisado en Puga *et al.*, 2002). Tanto la delección de este receptor como su activación producen alteraciones en el crecimiento celular. La activación del AHR, que puede ser llevada a cabo por ligandos exógenos tales como contaminantes ambientales o por su aún no identificado ligando endógeno, produce generalmente una marcada inhibición del crecimiento, pero se ha demostrado a su vez que es capaz de promover la proliferación. Por lo tanto, el AHR parece contribuir en procesos que pueden culminar tanto en el arresto del ciclo celular como en el aumento de los niveles de proliferación celular. Incluso más paradójica aparenta ser la observación de que un mismo ligando, el TCDD por ejemplo, puede inducir arresto del ciclo celular en algunos tipos celulares mientras que es simultáneamente clasificado como un potente promotor tumoral en varios estudios llevados a cabo en animales (revisado en Puga *et al.*, 2002; Elferink, 2003; Pocar *et al.*, 2005).

El AHR activado por su ligando es capaz de inhibir la inducción mediada por estrógenos de activadores del ciclo celular como la ciclina D1 o las quinasas CDK2, CDK4 y CDK7 (Wang *et al.*, 1998b). Esto sugiere un rol del AHR en el crecimiento tumoral dependiente de estrógenos en el tracto reproductivo femenino. Sin embargo, el AHR también tiene una influencia directa en el ciclo celular. Esto se ha estudiado en considerable detalle y está relacionado con la interacción entre el AHR y Rb (revisado en Safe *et al.*, 2000; Puga *et al.*, 2002). Se ha mostrado que el AHR podría mediar el arresto celular a través de mecanismos múltiples de co-activación (junto con Rb induce al inhibidor ciclina/cdk p27 -Kip 1-) y de co-represión (junto con Rb reprime la transcripción dependiente de E2F), manteniendo las células en el estadio G1 del ciclo celular (Huang y Elferink, 2005).

A su vez, el AHR puede alterar la proliferación celular al interactuar con cascadas de señalización donde están involucradas fosforilaciones de proteínas, como se detalló anteriormente (revisado en Puga *et al.*, 2002).

Por todos estos antecedentes es que se decidió evaluar en el presente estudio el posible efecto que puedan tener distintos ligandos del AHR sobre la proliferación de las células de la granulosa, tanto en condiciones control como en presencia del receptor de estrógenos activado por el agregado de estradiol.

El hecho de que el AHR activado por sus ligandos regule a nivel transcripcional a las hidroxilasas que metabolizan al estradiol en catecolestrógenos, junto con las evidencias de que estos compuestos estarían implicados en la regulación de la función ovárica, hacen que cobre gran interés la evaluación de la función o efecto de los catecolestrógenos en procesos como la diferenciación o la proliferación de células ováricas. Si bien existen varios estudios que se han centrado en el rol de los catecolestrógenos en la diferenciación celular, poco se sabe sobre estos compuestos en relación con el crecimiento de las células ováricas.

En animales, incluyendo al humano, los niveles circulantes de estrógenos elevados aumentan el riesgo de cáncer de mama y de endometrio (Nutter *et al.*, 1991). Uno de los mecanismos postulados para dicha carcinogénesis es que los estrógenos por sí mismos actúan directamente en la estimulación de la proliferación. Se ha propuesto otro mecanismo, en el cual los estrógenos actúan como pro-carcinógenos que inducen genotoxicidad. El 4OHE por ejemplo genera radicales libres originados en el ciclo redox junto con las correspondientes formas quinonas y semiquinonas, los cuales causan daño en el ADN (Nutter *et al.*, 1991; Nutter *et al.*, 1994). Se ha mostrado que el tratamiento con 4OHE induce adenocarcinoma endometrial en ratones, y se han detectado altos niveles de este metabolito además de abundante expresión de CYP1B1 en varios tumores de distintos orígenes (revisado en Tsuchiya *et al.*, 2005). Estos reportes sugieren que la formación local y específica de 4OHE a partir de estradiol es importante en la carcinogénesis, implicando a CYP1B1 en el proceso.

Por el contrario, el metabolito del estradiol 2OHE no es carcinogénico, aunque puede sufrir cambios redox que generan radicales libres y los intermediarios quinona/semiquinona. Sin embargo, como este compuesto es metilado por COMT a una tasa más rápida que el 4OHE, los radicales libres no se generan fácilmente (Emons *et al.*, 1987). Además, se ha reportado que en células MCF-7 el 2MOE posee un efecto inhibitorio (revisado en Tsuchiya *et al.*, 2005). Estas podrían ser razones que expliquen que el 2OHE no sea carcinogénico.

Dentro de los procesos del desarrollo y la selección del folículo ovárico, las acciones locales que ejerce el estradiol o factores de crecimiento como el TGF- β tienen un rol muy importante. Dadas las evidencias de que los catecolestrógenos podrían llevar a cabo acciones distintas a las del estradiol, se sugiere que estos compuestos podrían constituir un mecanismo alternativo de acción estrogénica. Por todo esto es que se consideró de gran relevancia establecer las acciones que los catecolestrógenos puedan tener sobre las células de la granulosa. En particular, evaluar el efecto de estos compuestos sobre la proliferación de estas células ováricas, en comparación con la acción clásica del estradiol.

3.2. *Objetivos*

El objetivo principal de esta parte del trabajo es determinar si distintos compuestos descritos como ligandos del AHR son capaces de regular la proliferación de células de la granulosa de rata, estudiando específicamente la posible participación e interacción de los receptores de aril hidrocarburos y de estrógenos. A su vez, se propone determinar si algunos de los ligandos son capaces de modular los niveles de secreción de estradiol de dichas células ováricas.

Dado que los agonistas del AHR inducen la expresión de las hidroxilasas CYP1A1 y CYP1B1, quienes metabolizan al estradiol en catecolestrógenos, es objetivo a su vez establecer el efecto de estos metabolitos sobre la proliferación de las células de la granulosa, determinando si ejercen acciones diferenciales con respecto al estradiol.

3.3. Resultados

3.3.1. Efecto de ligandos del AHR sobre la proliferación de células de la granulosa

- Efecto de 3-indolacético sobre la proliferación de células de la granulosa

Con el objeto de establecer si el ligando del AHR 3-indolacético es capaz de regular los niveles de proliferación de células de la granulosa, se ensayó el efecto de este compuesto (10 μ M) sobre la incorporación de timidina tritiada en células en cultivo. El ensayo fue realizado en condiciones control, en presencia de FSH (2 ng/ml) o en presencia de una combinación de FSH y estradiol.

Como puede observarse en la Figura 3.3 A, el agregado del ligando en condiciones control o en presencia de FSH no tuvo ningún efecto sobre la síntesis de ADN en este sistema.

Para evaluar si 3-indolacético es capaz de modular el efecto mitogénico que ejerce la combinación de FSH y estradiol, fue necesario establecer primero la dosis de estradiol a usar. Existe la posibilidad de que una potencial modulación por parte de 3-indolacético se evidencie sólo en presencia de dosis submáximas del esteroide.

Si bien se observó una tendencia a un sinergismo en el efecto proliferativo entre FSH, estradiol a dosis de 100 ng/ml y 3-indolacético, la variación en la magnitud de las respuestas obtenidas en los distintos ensayos hizo que dicho efecto no tuviera significancia estadística (Figura 3.3 A). De la misma manera, en algunos ensayos 3-indolacético mostró ser capaz de inhibir parcialmente el efecto comitogénico de FSH y estradiol a dosis de 1 ng/ml ó 10 ng/ml, pero nuevamente, este efecto no fue significativo estadísticamente.

- Efecto de índigo sobre la proliferación de células de la granulosa

Para llevar a cabo el objetivo de determinar si el ligando del AHR índigo posee la capacidad de regular la proliferación de las células de la granulosa, se ensayó el efecto de este compuesto sobre la incorporación de timidina de células cultivadas en medio control, en presencia de FSH, o en presencia de una combinación de FSH y estradiol.

En una serie de experimentos preliminares, se estableció 100 ng/ml como la dosis de estrógeno a utilizar para estos ensayos. Esta concentración de estradiol fue elegida según los siguientes criterios:

es relevante fisiológicamente,

es la clásicamente utilizada en este sistema de células de la granulosa en cultivo,

es a la cual se verifican las modulaciones por diversos factores, como péptidos intraováricos, citoquinas, etc.,

nos permitió observar modulación por parte de los compuestos en estudio.

De todas formas, en el caso de hallar que un ligando no ejercía ningún efecto sobre la proliferación inducida por 100 ng/ml de estrógeno, se repitió el ensayo utilizando distintas dosis de estradiol, verificándose siempre el mismo resultado, es decir, ausencia de efecto sobre la regulación inducida por el estrógeno.

Como se muestra en la Figura 3.3 B, el agregado de índigo no modifica los niveles de proliferación alcanzados por las células ni en medio control, ni en presencia de FSH, ni en presencia de esta hormona en combinación con estradiol. Estos resultados se verificaron para dosis de índigo que variaban entre 1 nM y 10 μ M. Este rango incluye las concentraciones a las que se ha demostrado en estudios previos realizados en otros laboratorios que actúa como agonista del AHR, tanto *in vitro* como *in vivo* (Adachi *et al.*, 2001; Guengerich *et al.*, 2004; Sugihara *et al.*, 2004).

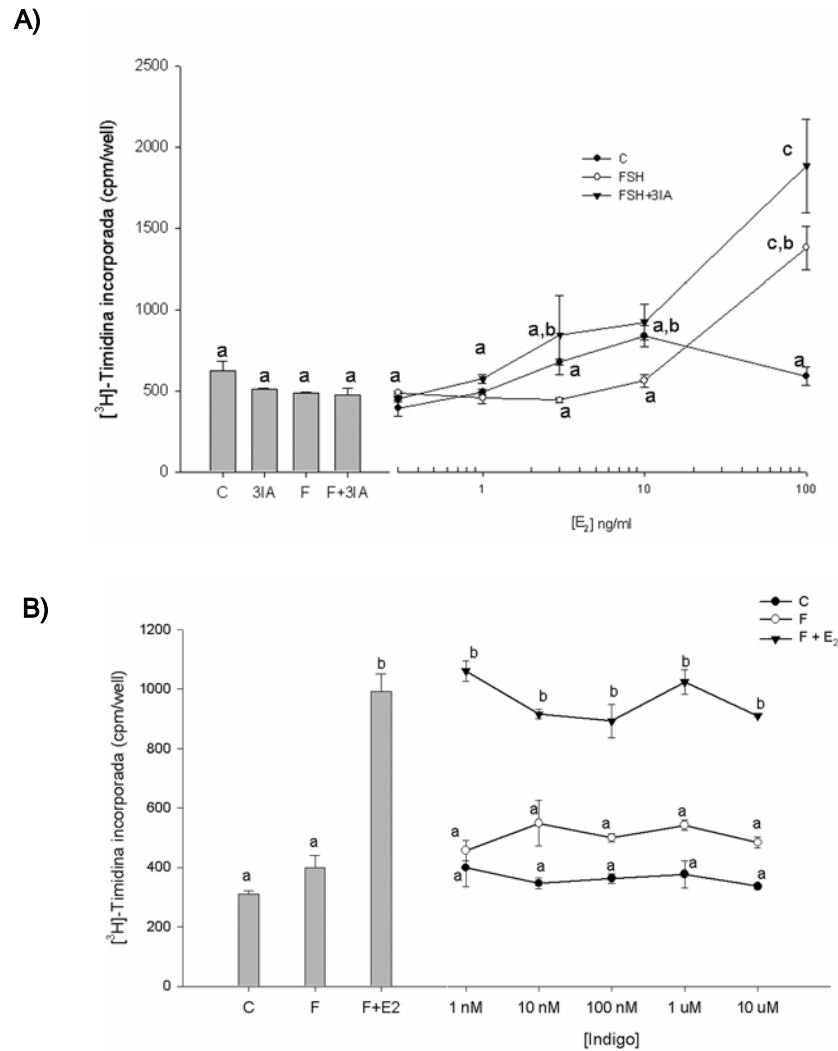


Figura 3.3. Efecto de los ligandos 3-indolacético e índigo sobre la proliferación de células de la granulosa. **A)** Las células fueron cultivadas en medio control (C), en presencia de FSH (2 ng/ml, F), o en presencia de una combinación de FSH y estradiol en dosis crecientes (E_2 , 0,1-100 ng/ml) con o sin el agregado de 3-indolacético (10 μ M, 3IA). **B)** Las células fueron cultivadas en medio control (C), con FSH (2ng/ml, F) o con una combinación de FSH y estradiol (100 ng/ml, F+E2) en ausencia o presencia de dosis crecientes de índigo (1 nM-10 μ M). La incorporación de [³H]-Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de la estimulación. Los resultados muestran las medias \pm ES de tres ensayos independientes. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

- Efecto de indol-3-carbinol sobre la proliferación de células de la granulosa

Con el objetivo de determinar si el ligando del AHR indol-3-carbinol es capaz de regular la proliferación de células de la granulosa, se ensayó el efecto de dosis crecientes de este compuesto sobre la incorporación de timidina tritiada en células en cultivo. El ensayo fue realizado en condiciones control, en presencia de FSH o en presencia de una combinación de FSH y estradiol.

Como se muestra en la Figura 3.4 A, el compuesto no tuvo efecto sobre los niveles de proliferación de las células cultivadas en condiciones control o en presencia de FSH.

Sin embargo, en presencia de FSH y estradiol, indol-3-carbinol fue capaz de inhibir parcialmente la respuesta proliferativa inducida por las hormonas mitogénicas. Dicho efecto no mostró dependencia con la dosis, evidenciándose niveles similares de inhibición a concentraciones desde 1 μ M hasta 100 μ M de indol-3-carbinol.

- Efecto de triptofano sobre la proliferación de células de la granulosa

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que compuestos derivados del triptofano tienen la capacidad de unirse y activar al AHR. Basándose en la idea de que la adición de triptofano exógeno al medio de cultivo pueda servir de sustrato para producir endógenamente un ligando de este receptor, se ensayó el efecto del agregado de dosis crecientes de triptofano sobre la proliferación de células de la granulosa. El ensayo se realizó para células cultivadas en medio control, en presencia de FSH o en presencia de la combinación de FSH y estradiol.

Como se observa en la Figura 3.4 B, el agregado de triptofano al medio de cultivo en condiciones control o en presencia de FSH no tuvo efecto sobre la proliferación celular en concentraciones de 18 μ g/ml a 900 μ g/ml (2X a 100X las veces de triptofano que se encuentra ya presente en el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de estas células). A dosis mayores de 450 μ g/ml de triptofano, se evidenció una aparente inhibición de la proliferación, pero este efecto no tuvo significancia estadística al ser comparado con los respectivos controles sin triptofano.

Cuando se ensayó el efecto de triptofano en células estimuladas para entrar en la etapa de síntesis de ADN, se observó que este compuesto es capaz de inhibir en forma dependiente de la dosis el efecto de las hormonas mitogénicas (Figura 3.4 B), teniendo este efecto significancia estadística a dosis mayores o iguales a 450 μ g/ml.

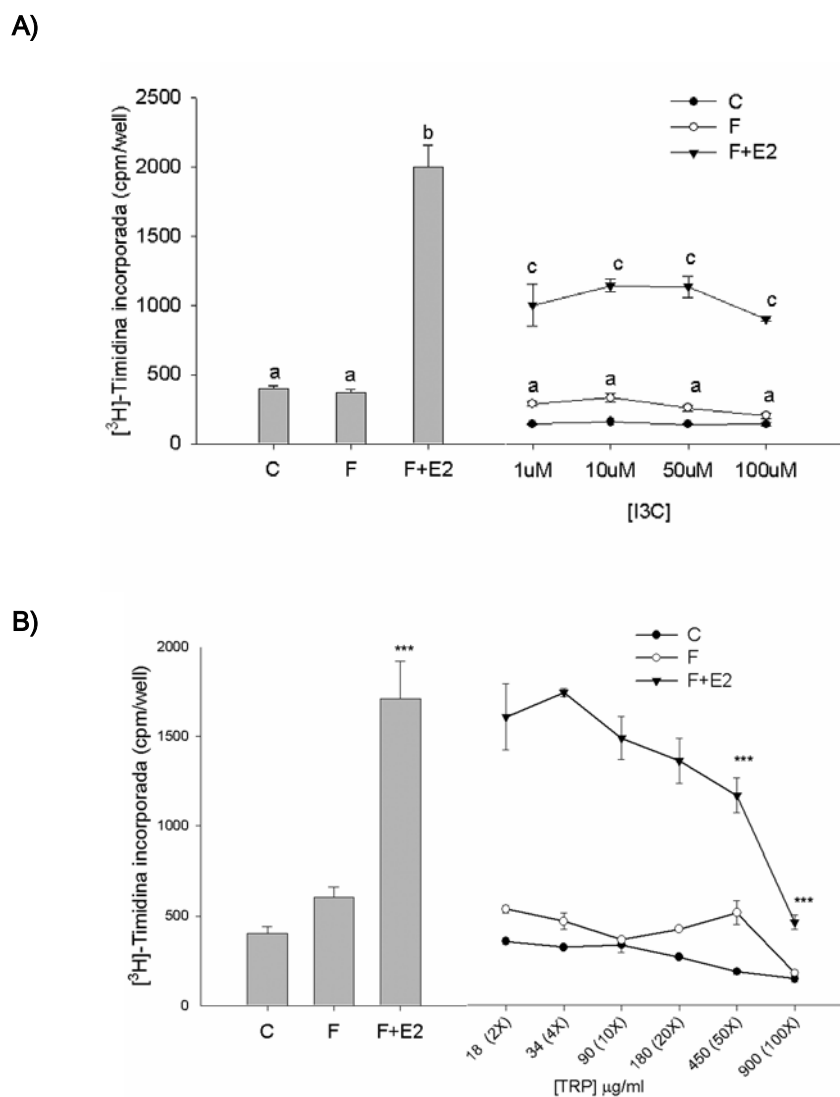


Figura 3.4. Efecto de los ligandos *Indol-3-carbinol* y *triptofano* sobre la proliferación de células de la granulosa. Las células fueron cultivadas en medio control (C), con el agregado de FSH (2 ng/ml, F), o con el agregado de una combinación de FSH y estradiol (100 ng/ml, F+E2) en ausencia o presencia de **A)** dosis crecientes de *Indol-3-carbinol* (1 µM-100 µM, I3C) **B)** dosis crecientes de *triptofano* (18 µg/ml- 900 µg/ml, TRP). La incorporación de [³H]-Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de la estimulación. Los resultados muestran las medias ± ES de tres experimentos independientes. **A)** Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$). **B)** Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas al compararse con sus respectivos controles ($P < 0.001$).

- Efecto de 3-metilcolantreno sobre la proliferación de células de la granulosa

Se estudió el efecto del ligando 3-metilcolantreno sobre la proliferación de las células de la granulosa, cultivando dichas células en medio control, en presencia de FSH o en presencia de esta hormona y estradiol, con o sin el agregado de dosis crecientes de 3-metilcolantreno y midiendo luego los niveles de incorporación de timidina alcanzados por las células que recibieron los distintos tratamientos.

Como puede observarse en la Figura 3.5, el agregado de 3-metilcolantreno a células cultivadas en medio control no tuvo ningún efecto sobre la proliferación, resultado que se mantuvo para todas las dosis del compuesto ensayadas (1-5 μM). Estas dosis de 3-metilcolantreno tampoco produjeron ningún cambio en los niveles de proliferación alcanzados por las células cultivadas en presencia de FSH. Sin embargo, este compuesto mostró ejercer un significativo efecto comitogénico con FSH y estradiol. Este efecto tuvo significancia estadística a concentraciones de 3 μM y 5 μM , sin observarse diferencias entre las respuestas provocadas por ambas dosis.

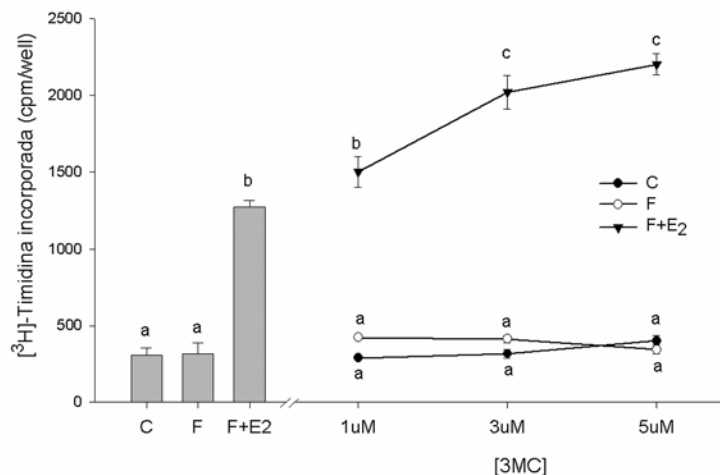


Figura 3.5. Efecto de 3-metilcolantreno sobre la proliferación de células de la granulosa. Las células fueron cultivadas en medio control (C), con FSH (2 ng/ml, F), o con FSH y estradiol (100 ng/ml, F+E2) en ausencia o presencia de dosis crecientes de 3-metilcolantreno (1 μM -5 μM , 3MC). La incorporación de [³H]-Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de la estimulación. Los resultados muestran las medias \pm ES de tres ensayos independientes. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$, excepto la comparación 3MC 1 μM vs. 3MC 3 μM en presencia de F+E2, donde $P < 0.01$).

- Efecto de β -naftoflavona sobre la proliferación de células de la granulosa

Se evaluó el efecto del ligando β -naftoflavona sobre la proliferación de las células de la granulosa midiendo los niveles de incorporación de timidina alcanzados por células cultivadas en medio control, en medio con FSH o en medio que contenía FSH y estradiol, en ausencia o presencia de dosis crecientes de esta flavona. Se ensayaron dosis de β -naftoflavona en el rango de 1 μ M hasta 20 μ M.

Como se observa en la Figura 3.6 A, el agregado de este ligando del AHR no tuvo efecto sobre la proliferación celular en condiciones control o en presencia de FSH. Este resultado se obtuvo incluso con la mayor dosis del compuesto ensayada.

Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con FSH y estradiol promoviéndose la proliferación, β -naftoflavona fue capaz de sinergizar con estas hormonas provocando un aumento aún mayor de la síntesis de ADN. Este aumento fue de alrededor de 2 veces cuando se utilizó el ligando a concentraciones de 10 μ M y de casi 3 veces cuando se usaron dosis de la flavona de 20 μ M. Este efecto mostró ser dependiente de la dosis, siendo estadísticamente significativo a dosis mayores o iguales a 10 μ M.

Como siguiente paso, se decidió corroborar los resultados de incorporación de timidina por medio de otra técnica independiente, realizándose *Western Blot* para el antígeno nuclear marcador de proliferación celular PCNA. Como se muestra en la Figura 3.6 B, panel superior, β -naftoflavona (20 μ M) es capaz de aumentar aún más los niveles de expresión de PCNA causado por el agregado de las hormonas mitogénicas FSH y estradiol. La misma respuesta se obtuvo estimulando con β -naftoflavona 10 μ M.

Como se explicó anteriormente, puesto que la ciclina D2 (CCND2) es la ciclina limitante para la proliferación de las células de la granulosa, y es a nivel de su expresión donde tiene lugar el efecto sinérgico entre FSH y estradiol, se decidió determinar la participación de β -naftoflavona en el efecto estimulador de los niveles de expresión de esta ciclina. Como se observa en el panel inferior de la Figura 3.6 B, el agregado de β -naftoflavona provocó un aumento en los niveles de esta proteína en comparación con los alcanzados por células estimuladas solo con las dos hormonas. Esto también se verificó para dosis de β -naftoflavona de 10 μ M.

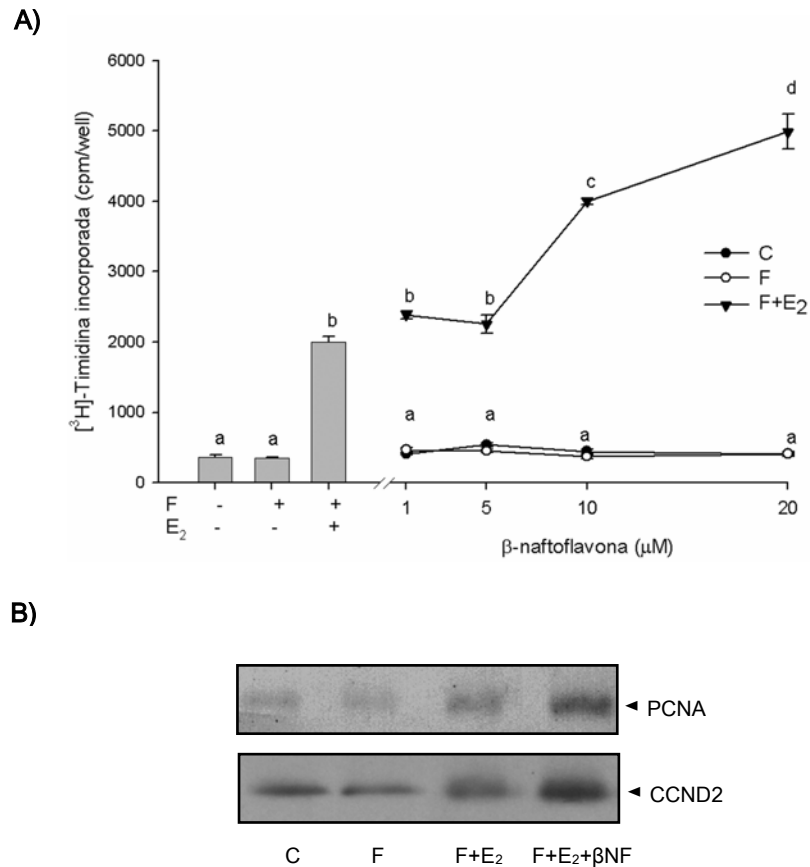


Figura 3.6. Efecto de β -naftoflavona sobre la proliferación de células de la granulosa.

A) Las células fueron cultivadas en medio control (C), con FSH (2 ng/ml, F), o con una combinación de FSH y estradiol (100 ng/ml, F+E₂) en ausencia o presencia de dosis crecientes de β -naftoflavona (1 μM -20 μM). La incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de la estimulación. Los resultados muestran las medias \pm ES de cuatro experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$). **B)** Las células de la granulosa fueron cultivadas por 36 h en medio control (C), con FSH (2 ng/ml, F), con FSH y E_2 (100 ng/ml, F+E₂), o con una combinación de ambas hormonas y β -naftoflavona (20 μM , βNF). Se extrajeron proteínas totales y se realizó *Western Blot* como se describe en Materiales y Métodos, utilizando un anticuerpo que reconoce a PCNA (panel superior) o a CCND2 (panel inferior). Se muestra un experimento representativo de un total de tres, realizados en forma independiente.

- Efecto de α -naftoflavona sobre la proliferación de células de la granulosa

Se evaluó el efecto del ligando α -naftoflavona sobre la proliferación de las células de la granulosa midiendo los niveles de incorporación de timidina de células control, células cultivadas en medio con FSH o en medio que contenía FSH y estradiol, en ausencia o presencia de dosis crecientes de la flavona. Se ensayaron dosis de α -naftoflavona en el rango de 1 μ M hasta 20 μ M.

Como se observa en la Figura 3.7 A, el agregado de este ligando del AHR no tuvo efecto sobre la proliferación celular en condiciones control o en presencia de FSH. Este resultado se obtuvo incluso con la mayor dosis de flavona ensayada. Sin embargo, cuando las células entrarían en una fase de activa proliferación por la estimulación con FSH y estradiol, α -naftoflavona fue capaz de inhibir la acción mitogénica de ambas hormonas. Este efecto mostró ser dependiente de la dosis, siendo significativo a dosis mayores o iguales a 5 μ M (Figura 3.7 A).

Como siguiente paso, se decidió corroborar los resultados de incorporación de timidina por medio de otra técnica independiente, realizándose *Western Blot* para el antígeno nuclear marcador de proliferación celular PCNA. Como se muestra en la Figura 3.7 B, panel superior, α -naftoflavona (20 μ M) es capaz de inhibir el aumento en la expresión de PCNA causado por el agregado de las hormonas mitogénicas FSH y estradiol. La misma respuesta se obtuvo estimulando con α -naftoflavona 10 μ M.

Dado que la ciclina D2 es la ciclina limitante para la proliferación de las células de la granulosa, y es a nivel de su expresión donde tiene lugar el efecto sinérgico entre FSH y estradiol, se decidió corroborar el efecto de α -naftoflavona sobre la proliferación evaluando los niveles de expresión de CCND2. Como se observa en el panel inferior de la Figura 3.7 B, el agregado de α -naftoflavona provocó una marcada disminución en los niveles de esta proteína. Esto también se verificó para dosis de α -naftoflavona de 10 μ M.

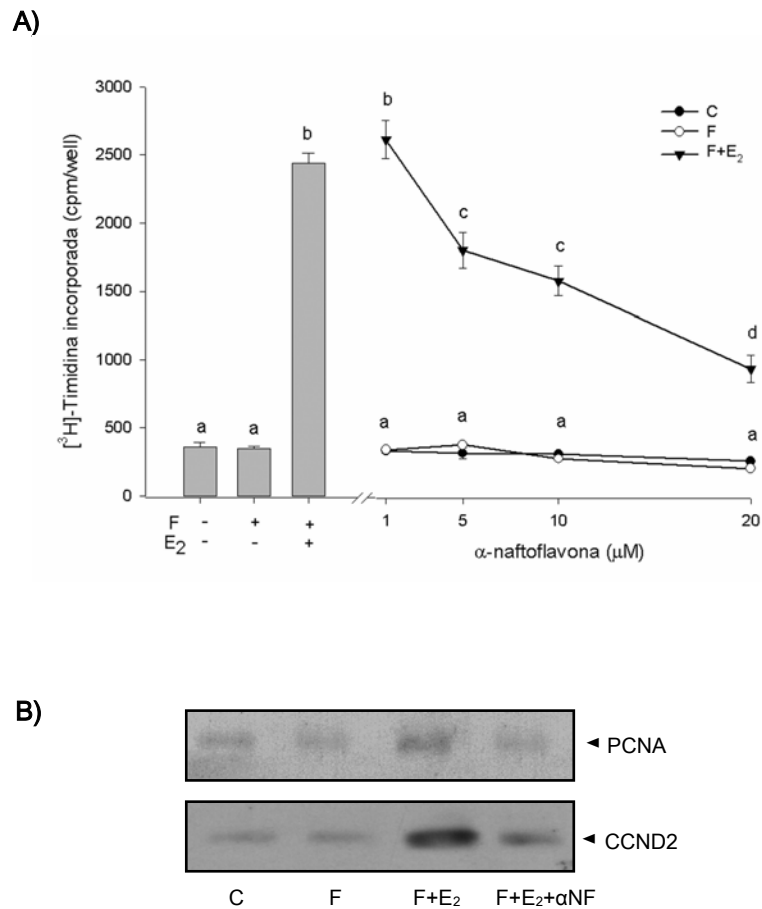


Figura 3.7. Efecto de α -naftoflavona sobre la proliferación de células de la granulosa.

A) Las células fueron cultivadas en medio control (C), con FSH (2 ng/ml, F), o con una combinación de FSH y estradiol (100 ng/ml, F+E₂) en ausencia o presencia de dosis crecientes de α -naftoflavona (1 μ M-20 μ M). La incorporación de [³H]-Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de la estimulación. Los resultados muestran las medias \pm ES de cuatro experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$). **B)** Las células de la granulosa fueron cultivadas por 36 h en medio control (C), con FSH (F, 2 ng/ml), con FSH y E₂ (F+E₂, 100 ng/ml) o con una combinación de ambas hormonas y α -naftoflavona (α -NF, 20 μ M). Se extrajo proteínas totales y se realizó *Western Blot* como se describe en Materiales y Métodos, utilizando un anticuerpo que reconoce a PCNA (panel superior) o a CCND2 (panel inferior). Se muestra un experimento representativo de un total de tres, realizados en forma independiente.

El sinergismo que mostraron tener 3-metilcolantreno y β -naftoflavona con estradiol resultó llamativo y de gran interés, ya que estos ligandos son conocidos agonistas del AHR (Safe, 1995; Whitlock *et al.*, 1996; Brauze *et al.*, 1997; Navas y Segner, 2000; Henry y Gasiewicz, 2003; Kondraganti *et al.*, 2005), quienes clásicamente poseen un efecto antiestrogénico en presencia de estrógenos. Por otro lado, la regulación que ejerció β -naftoflavona sobre la proliferación inducida por FSH y estradiol en células de la granulosa fue de notable magnitud, dosis dependiente y con alta significancia estadística. Por todo esto es que se decidió en adelante centrar el estudio en este ligando del AHR, el cual mostró una novedosa acción sinérgica con estrógenos sobre la proliferación celular.

- *Caracterización de β -naftoflavona en términos de su capacidad de actuar como agonista del AHR*

Translocación del AHR al núcleo

Se ha demostrado que β -naftoflavona actúa como agonista del AHR en numerosos sistemas. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, pueden existir diferencias en cuanto a la capacidad que tienen distintos ligandos de activar respuestas mediadas por el AHR dependiendo del tipo celular o especie en estudio. Por esto, se decidió establecer como primera mediada si β -naftoflavona está efectivamente funcionando como agonista del AHR y es capaz de activar al receptor en nuestro sistema de estudio.

En primer término, se evaluó si β -naftoflavona es capaz de provocar la translocación del AHR al núcleo, resultado de la activación del receptor por agonistas y evento indispensable para su actividad transcripcional en ese compartimiento celular. Para llevar a cabo este análisis, se realizó inmunofluorescencia para el receptor en cultivos control o en cultivos tratados con β -naftoflavona. Como puede observarse en la Figura 3.8 A, el AHR tiene una localización mayoritariamente citoplasmática en condiciones control. Luego de estimular las células con β -naftoflavona 10 μ M, puede observarse que la localización del receptor es principalmente nuclear, lo que pone en evidencia la translocación nuclear del AHR por el tratamiento con la flavona (Figura 3.8 B). Los mismos resultados se obtuvieron al realizar las incubaciones en presencia de las hormonas FSH y estradiol (Figura 3.8 C y D).

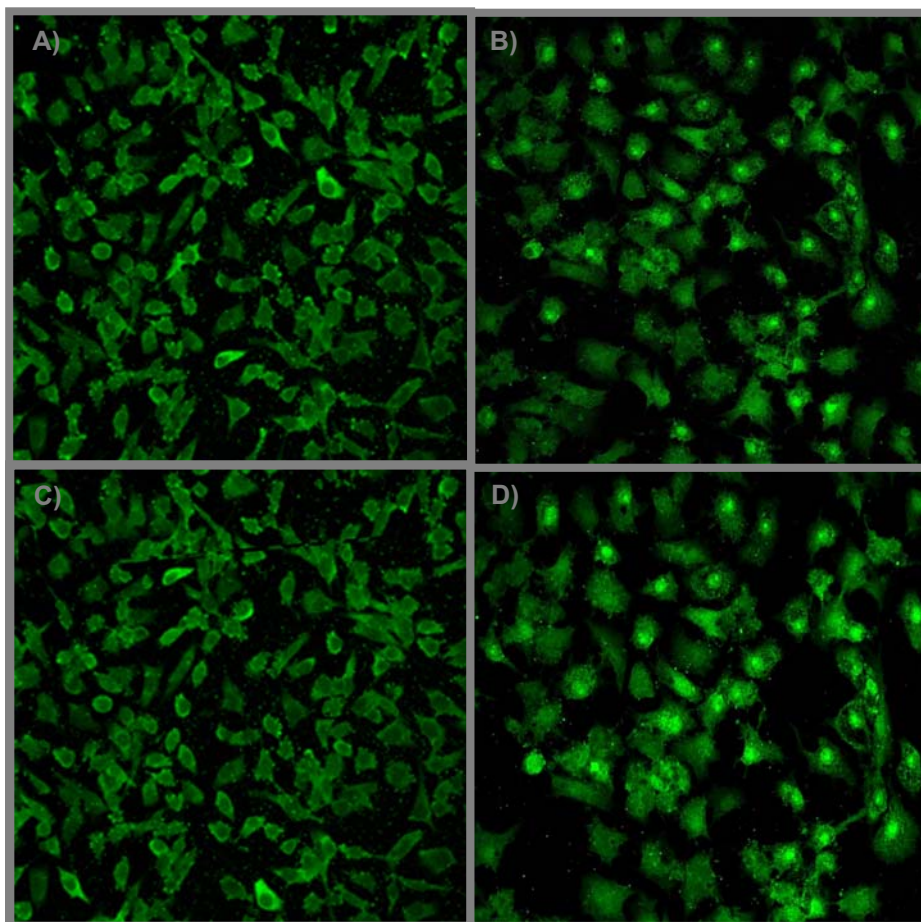


Figura 3.8. *Translocación del AHR al núcleo por β -naftoflavona.* Las células de la granulosa fueron cultivadas en medio control (**A** y **B**) o con FSH y estradiol (2 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente, **C** y **D**) en ausencia (**A** y **C**) o presencia (**B** y **D**) de 10 μ M β -naftoflavona. Luego de la incubación con los diferentes estímulos, se fijaron las células y se realizó inmunofluorescencia para el AHR como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de tres, realizados en forma independiente.

Inducción de los transcriptos para Cyp1a1 y Cyp1b1

Dado que la inducción de los transcriptos para *Cyp1a1* es uno de los efectos mejor descritos y caracterizados de los agonistas del AHR y una propiedad típica de la respuesta celular a aril hidrocarburos por la activación del receptor (Thomsen *et al.*, 1994; Kharat y Saatcioglu, 1996; Hoivik *et al.*, 1997; Hahn, 1998; Whitlock, 1999; Klinge *et al.*, 2000; Gu, 2000; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005), se decidió evaluar el efecto de β -naftoflavona sobre los niveles de esos transcriptos en células de la granulosa. A su vez, se ensayó el efecto de la flavona sobre la expresión del ARNm para *Cyp1b1*, otra hidroxilasa cuya transcripción se encuentra regulada por el AHR.

Los ensayos que se describen a continuación fueron realizados con β -naftoflavona a concentraciones de 10 μ M y 20 μ M. Dado que en ambos casos se obtuvieron resultados similares, apreciándose la misma respuesta, se muestran como representativos los datos arrojados por los experimentos donde se utilizó la flavona a concentraciones de 10 μ M.

Como puede observarse en la Figura 3.9 A, β -naftoflavona induce los niveles de ARNm para *Cyp1a1* alrededor de 4,5 veces, según se determinó por medio de la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa. Este efecto fue completamente abolido por el co-tratamiento con α -naftoflavona a dosis de 0,5 μ M y parcialmente revertido por α -naftoflavona a dosis de 1 μ M. El agregado de α -naftoflavona sola a dosis de 0,5 μ M no tuvo efecto sobre la inducción de la expresión de los transcriptos para *Cyp1a1*. El tratamiento con esta última flavona a dosis de 1 μ M produjo un aumento modesto y marginalmente significativo en los niveles de ARNm para la hidroxilasa (Figura 3.9 A).

La habilidad de β -naftoflavona de inducir la expresión de los transcriptos para *Cyp1a1* y el efecto antagonista de α -naftoflavona sobre esta inducción se verificaron también en presencia de FSH (Figura 3.9 B).

Al evaluar el efecto de β -naftoflavona sobre los niveles de transcriptos para *Cyp1b1*, se observó que esta flavona es a su vez capaz de causar un aumento en estos mensajeros al compararlos con los niveles basales (Figura 3.9 C). Sin embargo, la inducción fue de menor magnitud que la ejercida sobre los niveles de ARNm para *Cyp1a1*. Debe notarse que los niveles basales de transcriptos para *Cyp1b1* en células de la granulosa control son mucho más altos que los correspondientes a la hidroxilasa *Cyp1a1* (Figura 3.9 D).

Por otro lado, el agregado de estradiol no tuvo efecto sobre la inducción de los mensajeros de ambas hidroxilasas inducido por β -naftoflavona. Estos datos se muestran en las Figuras 3.9 B y C.

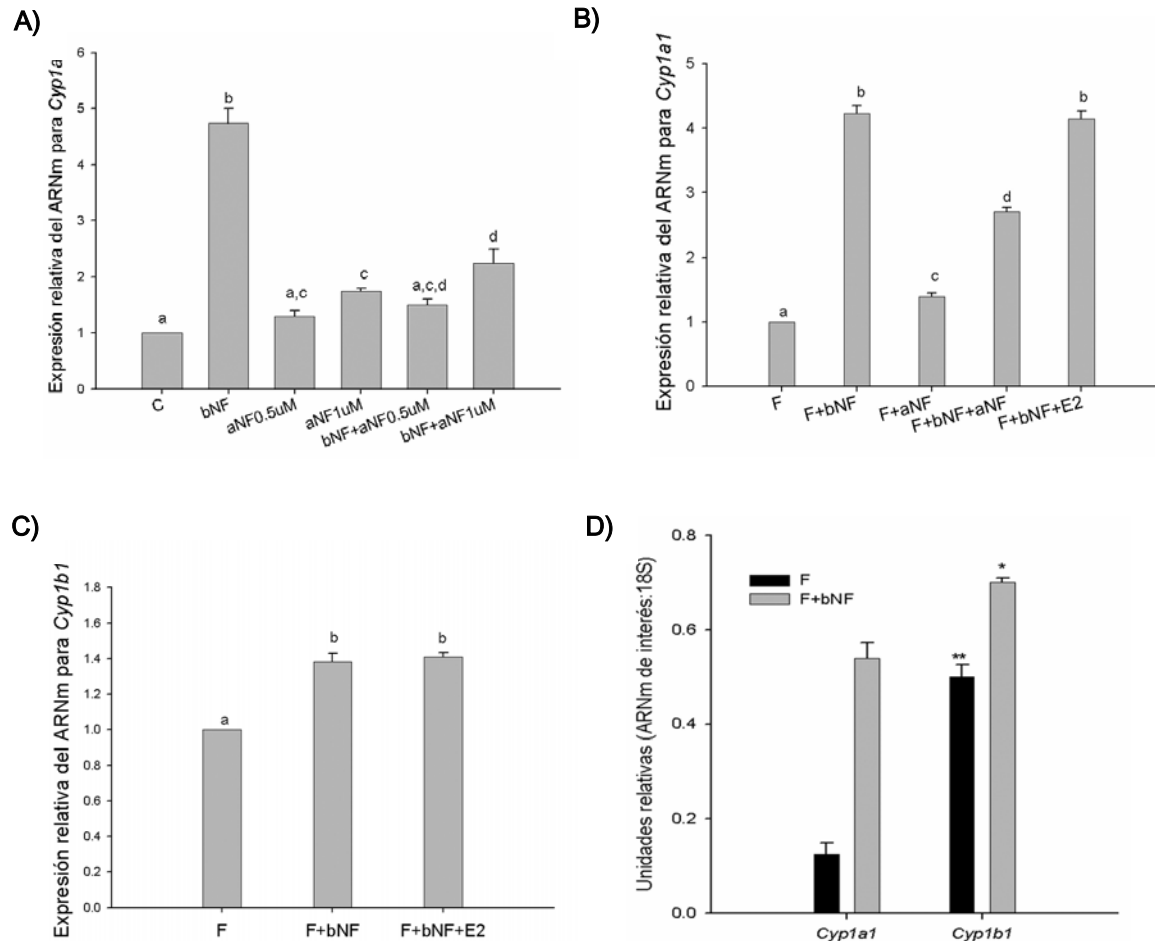


Figura 3.9. **A)** Se cultivaron las células de la granulosa durante 24 h en medio control (C), con β -naftoflavona (bNF, 10 μ M) o α -naftoflavona a dosis de 0,5 μ M (aNF_{0.5uM}) o 1 μ M (aNF_{1uM}), o con una combinación de ambas flavonas. Se extrajo el ARN total y se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para el ARNm de *Cyp1a1* como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de cada ARNm fue normalizado por la señal de amplificación del 18S ribosomal, y los valores resultantes (relativos a las células control) se graficaron como la media \pm ES de cinco experimentos independientes. Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.001$, excepto para las siguientes comparaciones: C vs. aNF_{1uM} $P < 0.05$; aNF_{0.5uM} vs. bNF+aNF_{1uM} $P < 0.05$; C vs. bNF+aNF_{1uM} $P < 0.01$). **B)** Las células de la granulosa fueron cultivadas durante 24 h en medio control conteniendo 2 ng/ml FSH (F) o tratadas con β -naftoflavona (10 μ M, F+bNF), con α -naftoflavona (1 μ M, F+aNF), con una combinación de ambas flavonas (F+bNF+aNF), o con β -naftoflavona y E₂ (100 ng/ml, F+bNF+E₂). Se extrajo ARN total y

se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para el ARNm de *Cyp1a1* como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de cada ARNm fue normalizado por la señal de amplificación del 18S ribosomal, y los valores resultantes (relativos a las células control) se graficaron como la media \pm ES de cinco experimentos independientes. Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.001$, excepto a vs. c: $P < 0.05$). **C)** Las células de la granulosa se cultivaron durante 6 h en medio control conteniendo 2 ng/ml FSH en ausencia o presencia de β -naftoflavona sola (10 μ M, F+bNF) o en combinación con E₂ (100 ng/ml, F+bNF+E₂). Se extrajo ARN total y se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para el ARNm de *Cyp1b1* como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de cada ARNm fue normalizado por la señal de amplificación del 18S ribosomal, y los valores resultantes (relativos a las células control) se graficaron como la media \pm ES de cinco experimentos independientes. Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.001$). **D)** La cuantificación de las señales del ARNm para *Cyp1a1* y *Cyp1b1* en muestras corridas en paralelo en el mismo experimento y cada una de ellas normalizadas a su señal de 18S correspondiente se graficaron como la media \pm ES de cinco experimentos independientes. *, $P < 0.05$ vs. el mismo tratamiento en el otro grupo; **, $P < 0.01$ vs. el mismo tratamiento en el otro grupo.

- *Participación del AHR y del receptor de estrógenos en la acción comitogénica de estradiol y β -naftoflavona*

Con el objetivo de determinar si el sinergismo antes descrito entre β -naftoflavona y estradiol es realmente mediado por el receptor de estrógenos y por el AHR, se decidió ensayar el efecto de antagonistas de ambos receptores sobre la respuesta en proliferación.

Como antagonista del receptor de estrógenos se utilizó el antiestrógeno puro ICI 182,780. Como antagonista del AHR se usó el ligando α -naftoflavona a dosis de 1 μ M, ya que no solo está reportado que a estas dosis o menores la flavona funcionan como antagonistas de este receptor en diversos sistemas (como ejemplos, ver Gasiewicz y Rucci, 1991; Merchant *et al.*, 1993; Merchant y Safe, 1995; Henry y Gasiewicz, 2003), sino que además se ha confirmado que esto también se verifica en células de la granulosa de rata en cultivo.

Como se muestra en la Figura 3.10 A, el efecto estimulador sinérgico que ejercen estradiol y β -naftoflavona sobre la proliferación de las células de la granulosa es inhibido por el tratamiento simultáneo con el antagonista del receptor de estrógenos, es decir, ambos compuestos no son capaces de sinergizar en la inducción de la proliferación si se encuentra bloqueado el receptor de estrógenos.

Similarmente, el efecto de β -naftoflavona fue revertido por α -naftoflavona, impidiendo ahora que la primera ejerza su efecto comitogénico con estradiol (Figura 3.10 B). Por lo tanto, el estrógeno y el agonista del AHR no son capaces de sinergizar en la estimulación de la proliferación si se encuentra bloqueado el AHR.

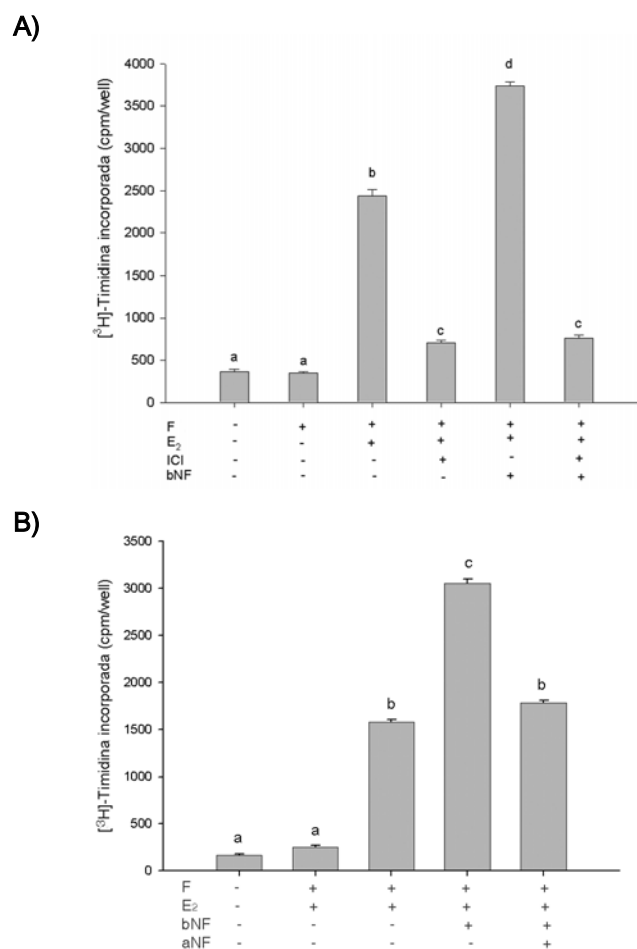


Figura 3.10. Participación del receptor de estrógenos y del AHR en el efecto comitogénico de estradiol y β -naftoflavona. **A)** Efecto de ICI sobre la acción mitogénica de estradiol y β -naftoflavona. Se cultivaron las células de la granulosa en medio control, con FSH (2 ng/ml, F), con FSH y E₂ (100 ng/ml) o con una combinación de ambas hormonas y β -naftoflavona (10 μ M, bNF), en ausencia o presencia del antagonista del receptor de estrógenos ICI 182,780 (10 μ M, ICI). **B)** Efecto de α -naftoflavona sobre la acción mitogénica de estradiol y β -naftoflavona. Las células de la granulosa fueron cultivadas en medio control, con FSH (2 ng/ml, F), con FSH y E₂ (100 ng/ml) o con una combinación de ambas hormonas y β -naftoflavona (10 μ M, bNF), en ausencia o presencia de α -naftoflavona (1 μ M, aNF). La incorporación de [³H]-Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de la estimulación. Los resultados se expresan como la media \pm ES de tres experimentos independientes. Los valores que no comparten letras son significativamente diferentes ($P < 0.001$).

Con el objetivo de obtener más evidencias sobre la participación del AHR en la acción mitogénica que es capaz de ejercer β -naftoflavona con estradiol, se ensayó el efecto de esta flavona en la proliferación de células de la granulosa que sobre-expresan el AHR. Para esto, luego de transfectar estas células con un vector de expresión que codifica para el AHR y dejar transcurrir el tiempo necesario para su expresión, se trataron los cultivos con los estímulos mitogénicos y se evaluaron luego los niveles de proliferación por medio de inmunofluorescencia o *Western Blot* contra ciclina D2.

Como puede observarse en la Figura 3.11 A, la inmunofluorescencia contra ciclina D2 muestra que las células que sobre-expresan el AHR poseen niveles mayores de expresión de ciclina D2 al ser tratadas con FSH, estradiol y β -naftoflavona que aquellas también tratadas con ambas hormonas y la flavona pero que poseen solo los niveles endógenos del AHR.

El aumento de la acción comitogénica de β -naftoflavona cuando se sobre-expresa el AHR también se evidenció evaluando los niveles de ciclina D2 por *Western Blot* (Figura 3.11 B). Los datos arrojados por estos experimentos mostraron una inducción en la expresión de la ciclina por β -naftoflavona de alrededor de 1,5 veces en células control, en comparación con 2 veces de inducción de la proteína con este compuesto en células que sobre-expresan el AHR.

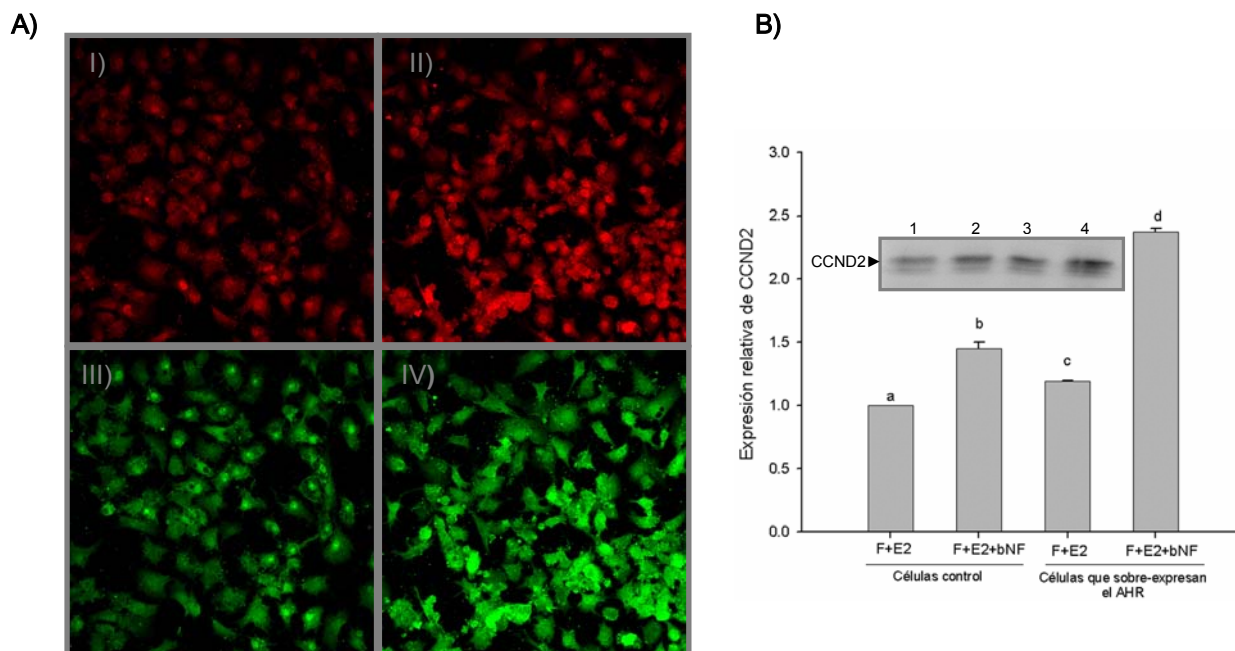


Figura 3.11. Participación del AHR en el efecto comitogénico de β -naftoflavona y estradiol. Las células de la granulosa fueron transfectadas transitoriamente con un vector de expresión que codifica para AHR como se explica en Materiales y Métodos. Se cultivaron en medio conteniendo FSH (2 ng/ml, F) y estradiol (100 ng/ml), en ausencia o presencia de β -naftoflavona (10 μ M). **A)** Se realizó inmunofluorescencia para CCND2 y AHR como se describe en Materiales y Métodos. Panel I y II: inmunofluorescencia representativa para CCND2 en células control (I) o en células que sobre-expresan el AHR (II) tratadas con FSH, E₂ y β -naftoflavona. Panel III y IV: inmunofluorescencia representativa para AHR en células control (III) o células que sobre-expresan el AHR (IV). Se obtuvo el mismo patrón de respuesta en dos experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por duplicado. Aumento: 400X. **B)** Se realizó *Western Blot* para CCND2 como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media \pm ES de dos experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por duplicado. Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.001$ excepto a vs. b: $P < 0.01$, a vs. c: $P < 0.05$, b vs. c: $P < 0.05$). Inserto: Se muestra un *Western Blot* representativo; calle 1: células control tratadas con FSH y E₂; calle 2: células control tratadas con FSH, E₂, y β -naftoflavona; calle 3: células que sobre-expresan el AHR tratadas con FSH y E₂; calle 4: células que sobre-expresan el AHR tratadas con FSH, E₂ y β -naftoflavona.

- Efecto de β -naftoflavona sobre la transcripción inducida por estrógenos

El sinergismo observado entre el agonista del AHR y el estradiol en la estimulación de la síntesis de ADN parecería contrastar con el efecto antiestrogénico clásico a nivel genómico que se ha reportado que ejercen los agonistas del AHR en presencia de estrógenos en otros tipos celulares (como ejemplos ver Safe, 1995; Safe *et al.*, 1998; Wormke *et al.*, 2000; Safe *et al.*, 2000; Pocar *et al.*, 2005).

Por esta razón, se decidió investigar si en el sistema de estudio también se produce la interacción negativa a nivel transcripcional descrita anteriormente. Con este objetivo, se transfectaron en forma transitoria células de la granulosa en cultivo con la construcción *pTK-Red-ERE-LUC*, y se trataron las células con los distintos estímulos. Esta construcción consta de un promotor respondedor a estrógenos (debido a la presencia de secuencias consenso de reconocimiento para el receptor correspondiente) y el gen de la luciferasa clonado río abajo.

Como se esperaba, estradiol produjo un aumento en la actividad luciferasa, reflejo de la activación de la transcripción causada por la unión del receptor de estrógenos a sus secuencias consenso en el promotor de dicho gen y reclutamiento de los co-activadores necesarios. La estimulación en la actividad luciferasa obtenida por el agregado del estrógeno fue de alrededor de 2 veces (Figura 3.12). Este efecto fue bloqueado por el co-tratamiento con ICI 182,780 (Figura 3.12).

La adición de β -naftoflavona a las células de la granulosa en cultivo produjo una dramática inhibición de la expresión de luciferasa inducida por estradiol, alcanzándose niveles aún menores que los observados en las células control (Figura 3.12).

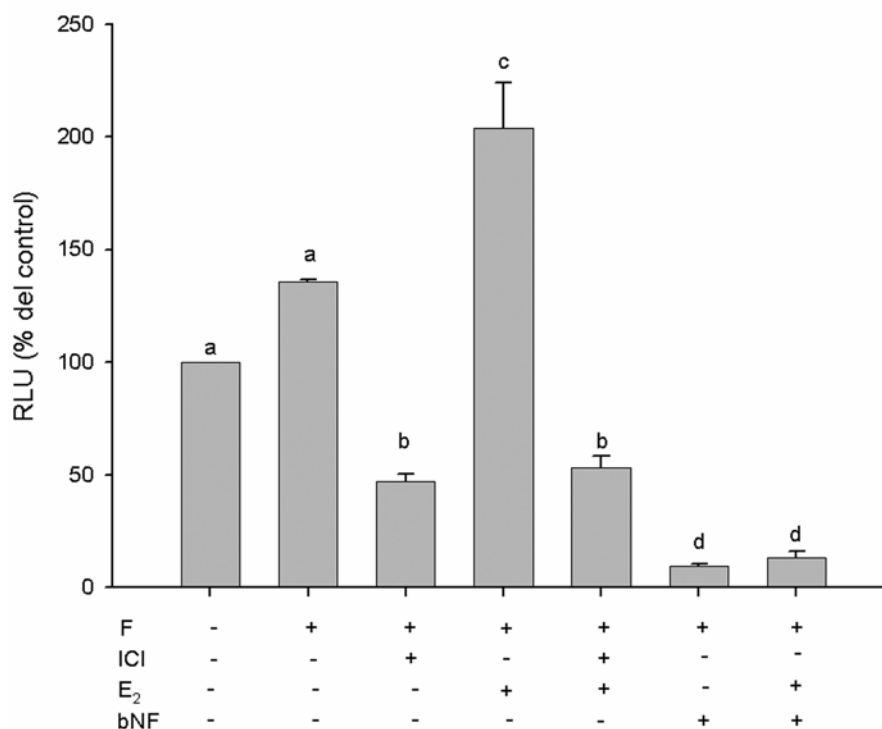


Figura 3.12. Efecto de β -naftoflavona sobre la transcripción estimulada por el ER. Las células de la granulosa fueron transfectadas transitoriamente con la construcción reportera *pTK-Red-ERE-LUC* y el plásmido reportero control *pCMV- β -Galactosidasa*, como se describe en Materiales y Métodos. Luego de la transfección (18 h después) las células fueron tratadas sólo con vehículo o con FSH (2 ng/ml, F), FSH y ICI 182,780 (10 μ M), FSH y E₂ (100 ng/ml), ambas hormonas y ICI 182,780, FSH y β -naftoflavona (10 μ M, bNF) o una combinación de ambas hormonas y β -naftoflavona durante 24 h, y luego se procesaron para el ensayo de actividad luciferasa. Los resultados (normalizados por actividad β -Galactosidasa) se expresan como porcentaje de unidades de luz relativas (RLU) al compararse con las células control (agregado de vehículo solo, tomado como el 100%). Los valores graficados representan las medias \pm ES de dos experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por duplicado. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

3.3.2. Efecto de ligandos del AHR sobre los niveles de estradiol en células de la granulosa

Con el objetivo de evaluar la posible modulación que ejerzan ligandos del AHR sobre otra respuesta celular, se decidió establecer si estos compuestos tienen la capacidad de inducir cambios en los niveles de estradiol producidos por las células de la granulosa. Se eligió determinar este parámetro para ligandos que hayan tenido distinto comportamiento en cuanto a la regulación de la proliferación. Por esto, se ensayó el efecto de β -naftoflavona, ligando que fue capaz de sinergizar con las hormonas FSH y estradiol en la proliferación de las células de la granulosa; el efecto de α -naftoflavona, ligando que inhibió el efecto mitogénico de dichas hormonas; y el efecto de 3-indolacético, ligando que no mostró modular la estimulación de la proliferación que ejerce FSH y estradiol sobre este sistema.

- Efecto de β -naftoflavona sobre los niveles de estradiol secretados por células de la granulosa

Se ensayó el efecto de dosis crecientes de β -naftoflavona (1 μ M a 20 μ M) sobre los niveles de estradiol de células de la granulosa tratadas con FSH. Como puede verse en la Figura 3.13 A, el tratamiento con este agonista del AHR no produjo cambios en los niveles endógenos del estrógeno secretados al medio. Este resultado se observó para todas las dosis ensayadas.

- Efecto de α -naftoflavona sobre los niveles de estradiol secretados por células de la granulosa

Se determinó el efecto del tratamiento con α -naftoflavona (1 μ M a 20 μ M) sobre los niveles endógenos de estradiol de células de la granulosa tratadas con FSH. Este ligando fue capaz de producir una disminución en los niveles del estrógeno secretados por las células. Este efecto mostró ser dependiente de la dosis, hallándose diferencias significativas con dosis de 10 μ M o mayores. Estos resultados se muestran en la Figura 3.13 A.

- Efecto de 3-indolacético sobre los niveles de estradiol secretados por células de la granulosa

Se ensayó el efecto del tratamiento con dosis crecientes (1 μM a 20 μM) de 3-indolacético sobre los niveles de estradiol en cultivos de células de la granulosa de rata tratadas con FSH. Como se muestra en la Figura 3.13 B, el agregado de este ligando del AHR no produjo cambios en los niveles de estrógeno secretado, ni aún a la mayor concentración utilizada.

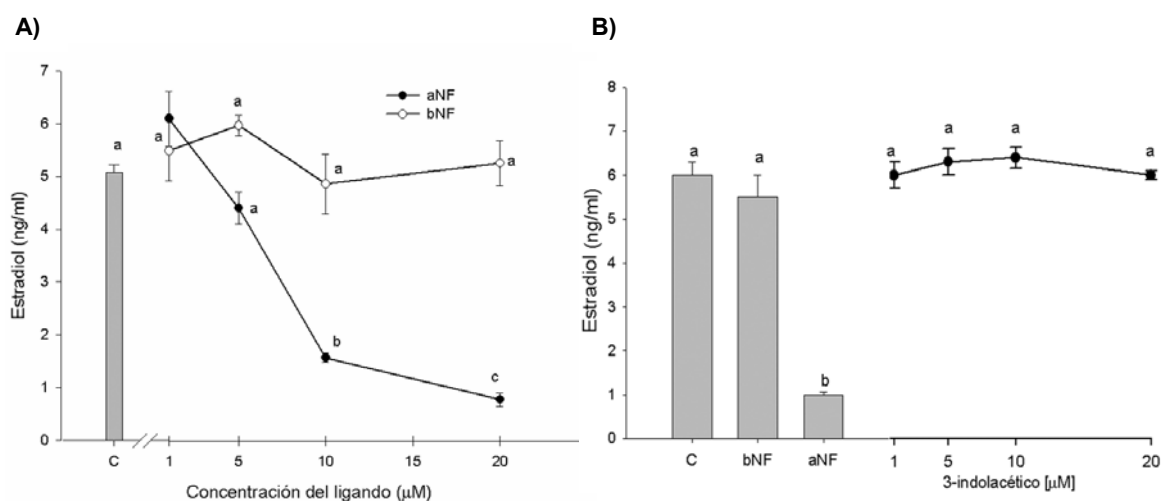


Figura 3.13. Efecto de β -naftoflavona, α -naftoflavona y 3-indolacético sobre los niveles de estradiol producidos en células de la granulosa. Las células de la granulosa fueron cultivadas en condiciones control (FSH 2 ng/ml) o con FSH y dosis crecientes de **A)** β -naftoflavona (-○-, bNF) o α -naftoflavona (-●-, aNF); **B)** 3-indolacético (controles: bNF 10 μM , aNF 20 μM). Se agregó androstenodiona (0,35 μM) a los cultivos como andrógeno aromatizable. Se determinó el estradiol en los medios de cultivo por RIA. Los resultados se expresan como las medias \pm ES de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Los valores que no comparten letras comunes son significativamente distintos ($P < 0.001$).

3.3.3. Efecto de los catecolestrógenos sobre la proliferación de células de la granulosa

Como ya se ha detallado anteriormente, los agonistas del AHR inducen la expresión de las enzimas del grupo CYP1/2, lo cual provoca un aumento en la hidroxilación del estradiol y consecuentemente mayores niveles de catecolestrógenos en la célula.

Basándonos en la hipótesis de que estos metabolitos del estradiol ejercerían acciones distintas a las del estradiol sobre la función de las células de la granulosa, se decidió evaluar la respuesta proliferativa de estas células al ser tratadas con los compuestos mencionados. Dado que FSH no es mitogénica por sí misma en la concentración usada normalmente en los cultivos (2 ng/ml), no resultaba éste el sistema indicado para observar modulación del crecimiento por parte de los catecolestrógenos (si existiera inhibición de la síntesis de ADN inducida por los catecolestrógenos, ésta probablemente no se evidenciaría). Por lo tanto, se decidió utilizar dosis de FSH de 10 ng/ml, las cuales son capaces de estimular por sí mismas la síntesis de ADN de células de la granulosa de rata en cultivo. De todas formas, se realizaron a su vez las determinaciones en condiciones de FSH 2 ng/ml para todos los catecolestrógenos ensayados, sin encontrarse efecto alguno de estos compuestos sobre la proliferación.

- Efecto de 2-hidroxiestradiol sobre la proliferación de células de la granulosa

Se ensayó el efecto de dosis crecientes (1 ng/ml a 1000 ng/ml) del catecolestrógeno 2-hidroxiestradiol (2OHE) sobre la proliferación de células de la granulosa cultivadas en medio control o en medio con FSH a dosis de 10 ng/ml. Al igual que el estradiol, el 2OHE no tuvo efecto sobre la proliferación en condiciones control. Sin embargo, y a diferencia del estradiol, este catecolestrógeno no fue capaz de sinergizar con la gonadotropina e inducir la síntesis de ADN, produciendo incluso una inhibición de la misma a concentraciones de 1µg/ml. Estos resultados se muestran en la Figura 3.14.

Se decidió establecer si la acción diferencial con respecto al estradiol que ejerce 2OHE está restringida a la proliferación inducida por FSH. Para esto, se evaluó el efecto de este catecolestrógeno sobre la síntesis de ADN estimulada por TGF- β , otro factor mitogénico para las células de la granulosa con el cual sinergiza estradiol. Este metabolito tampoco fue capaz de sinergizar con el factor de crecimiento en la proliferación de las células, como sí lo hace estradiol (Figura 3.15 A). Sin embargo, no produjo inhibición de la

inducción de la proliferación a ninguna de las dosis probadas, no encontrándose diferencias significativas al compararse con las células tratadas sólo con TGF β .

- Efecto de 2-metoxiestradiol sobre la proliferación de células de la granulosa

Se determinó el efecto del agregado de dosis crecientes (1 ng/ml a 1000 ng/ml) de 2-metoxiestradiol (2MOE) sobre la síntesis de ADN de células de la granulosa en condiciones control o en medio con FSH (10 ng/ml). Como se muestra en la Figura 3.14, el 2MOE no tuvo acción sobre la proliferación en condiciones control, al igual que el estradiol. Al tratar los cultivos con la combinación de FSH y este catecolestrógeno, se observó que él es incapaz de sinergizar con la hormona en un efecto mitogénico, acción característica que sí posee el estradiol. Más aún, dosis de 100 ng/ml o superiores de 2MOE produjeron una marcada inhibición en la proliferación inducida por FSH en las células de la granulosa.

Al ensayar el posible efecto de este catecolestrógeno sobre la proliferación inducida por TGF β , se observó que a diferencia del estradiol, no produce estimulación alguna de la proliferación inducida por el péptido. Sin embargo, a diferencia de su efecto inhibitorio descrito más arriba, el 2MOE no produjo inhibición alguna sobre la proliferación inducida por TGF- β (Figura 3.15 B).

- Efecto de 4-hidroxiestradiol sobre la proliferación de células de la granulosa

No se encontró ningún cambio significativo al ensayar el efecto de dosis crecientes (1 ng/ml a 1000 ng/ml) del catecolestrógeno 4-hidroxiestradiol (4OHE) sobre la proliferación de células de la granulosa cultivadas en medio control o en medio con FSH (10 ng/ml), aún a la mayor dosis probada (Figura 3.14). Es decir, al igual que los demás catecolestrógenos, 4OHE no es capaz de estimular la proliferación al ser agregado con FSH, como sí lo hace el estrógeno estradiol.

Al evaluar el efecto de 4OHE sobre la proliferación estimulada por TGF β , se verificó que este compuesto tampoco fue capaz de sinergizar con el factor de crecimiento en la proliferación de las células, como sí lo hace el estradiol. Al igual que al agregarse con FSH, no produjo inhibición de la inducción de la proliferación a ninguna de las dosis ensayadas, no encontrándose diferencias significativas al compararse con las células tratadas solo con TGF β . Estos resultados se muestran en la Figura 3.15 C.

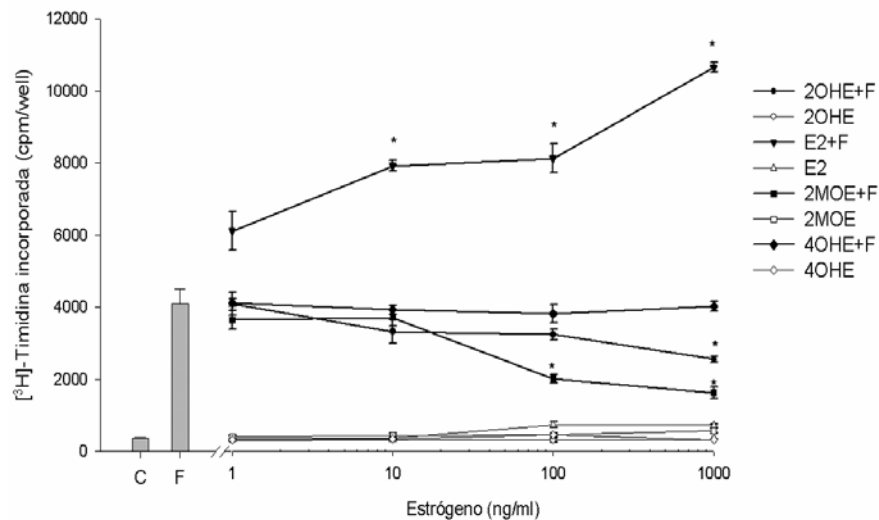


Figura 3.14. Efecto de los catecolestrógenos 2-hidroxiestradiol, 2-metoxiestradiol y 4-hidroxiestradiol sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa. Las células de la granulosa fueron cultivadas en ausencia o con concentraciones crecientes de estradiol (E2), 2-hidroxiestradiol (2OHE), 2-metoxiestradiol (2MOE) o 4-hidroxiestradiol (4OHE) en medio control o en presencia de FSH (10 ng/ml). La incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de sembrar las células. Los resultados muestran las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas al compararse con sus controles correspondientes ($P < 0.001$).

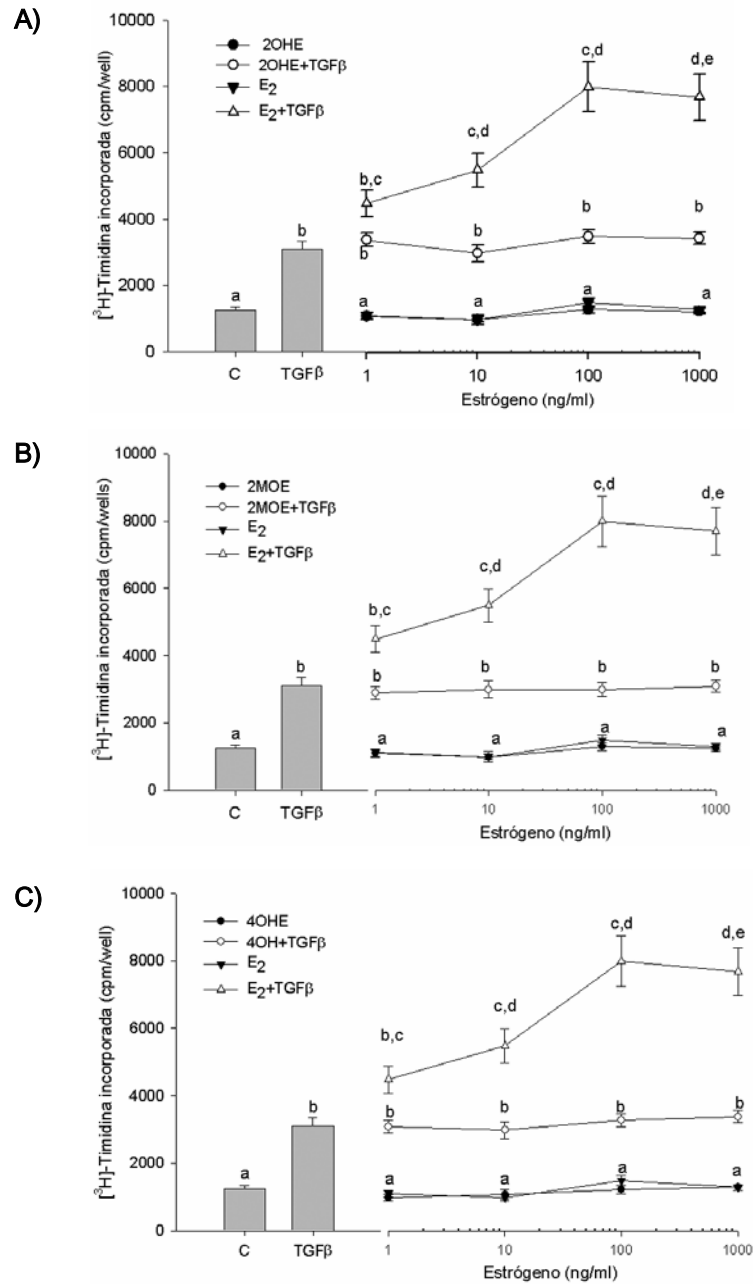


Figura 3.15. Efecto de los catecolestrógenos 2-hidroxiestradiol, 2-metoxiestradiol y 4-hidroxiestradiol sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa. Las células de la granulosa fueron cultivadas en ausencia o con concentraciones crecientes de estradiol (E₂) o **A)** 2-hidroxiestradiol (2OHE), **B)** 2-metoxiestradiol (2MOE), **C)** 4-hidroxiestradiol (4OHE); en medio control o con TGFβ (5 ng/ml). La incorporación de [³H]-Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego del sembrado de las células. Los resultados muestran las medias ± ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$).

3.4. *Discusión*

Los estudios presentados en esta sección se han centrado en establecer las acciones que ejercen distintos ligandos del AHR sobre la proliferación de células de la granulosa. Evaluando este parámetro, se encontró que compuestos que tienen la capacidad de unirse al AHR y activarlo transcripcionalmente pueden desencadenar diversas respuestas en cuanto a la regulación del crecimiento de las células en estudio. Algunos de los resultados arrojados luego del uso de los distintos agonistas del receptor parecerían en principio contradictorios entre sí. Sin embargo, solo ponen en evidencia una vez más la variabilidad existente entre los efectos inducidos por la activación de este receptor, la cual puede llevar a distintos patrones de respuesta incluso en el mismo tipo celular. Los datos obtenidos ponen de manifiesto claramente que las acciones mediadas por el AHR no pueden ser explicadas por la mera actividad transcripcional del receptor.

El compuesto 3-indolacético puede formarse a partir del metabolismo del triptofano. Se ha demostrado que funciona como agonista del AHR *in vitro*, en levaduras y en líneas celulares, ya que es capaz de unirse a este receptor competitivamente, estimular su transformación y su unión al ADN, e inducir la expresión de genes reporteros dependientes de AHR (Miller, 1997; Heath-Paglusio *et al.*, 1998). Sobre la base de estos antecedentes puede esperarse que este compuesto funcione como agonista del AHR en nuestro sistema de estudio. No se halló ninguna modulación significativa de la proliferación de las células de la granulosa de rata inducida por este compuesto, ni en situaciones control ni en presencia de las hormonas FSH y estradiol, según la evaluación de incorporación de timidina. Estos resultados sugieren que la activación del AHR por parte de 3-indolacético no modula la síntesis de ADN en este sistema. Esto no descarta la posibilidad de que el AHR activado por otros agonistas posea un efecto en la proliferación de las células de la granulosa, ya que existen antecedentes de que el AHR puede inducir distintas respuestas en un mismo sistema dependiendo del agonista que lo active (Matikainen *et al.*, 2001). Otra posible interpretación de los resultados obtenidos es que en nuestro sistema de estudio, o en cultivos primarios en general, 3-indolacético no funcione como agonista del AHR, o no lo haga a la concentración ensayada, lo cual sería coherente con el hecho de que se ha demostrado que en distintos sistemas los ligandos del AHR pueden funcionar o no como agonistas. Futuros estudios que contemplen la capacidad de 3-indolacético de unirse al AHR en células de la granulosa, transformarlo en su forma activa e inducir determinadas respuestas podrán discernir entre las distintas interpretaciones aquí planteadas.

El índigo se ha aislado de orina humana y ha demostrado ser agonista del AHR en ensayos de activación del receptor en levaduras recombinantes (Adachi *et al.*, 2001) y en sistemas reporteros de células de hepatoma (Peter Guengerich *et al.*, 2004). A su vez, se ha sugerido que funcionaría como agonista del receptor a partir de estudios realizados en roedores *in vivo* (Sugihara *et al.*, 2004; Peter Guengerich *et al.*, 2004) y demostrado que induce la unión de proteínas relacionadas con el AHR a los XRE en fracciones microsomales y nucleares de neuronas de rata (Kuramoto *et al.*, 2003). Dados estos reportes, se decidió ensayar el efecto del índigo en la proliferación en nuestro sistema. En cultivos primarios de células de la granulosa de rata el tratamiento con índigo no induce cambios en la síntesis de ADN. Esto se verifica tanto para condiciones de cultivo control como para condiciones en las cuales las células se encuentran proliferando activamente debido al agregado de hormonas mitogénicas. Si bien no puede descartarse completamente que en las condiciones de trabajo el índigo no esté activando al AHR, los resultados presentados brindan evidencia que apoya la idea de que la activación del AHR por parte del índigo no regula los niveles de síntesis de ADN de células de la granulosa ni es capaz de modular la regulación ejercida por FSH y estradiol. Esto es consistente con experimentos realizados en células de Leydig TM3, donde índigo, a diferencia de otro agonista del AHR utilizado, no regula el crecimiento celular a pesar de ser capaz de inducir la transcripción de genes blanco del AHR (Iseki *et al.*, 2005).

El compuesto aromático heterocíclico indol-3-carbinol había sido clásicamente reportado como un agonista débil del AHR, pero ha demostrado ser un muy potente agonista de este receptor en algunos modelos, como en sistemas reporteros de levaduras, siendo su EC_{50} de alrededor de 10 μ M (Miller, 1997). Se conoce extensamente el efecto antiproliferativo y antitumoral que posee este indol, habiéndose también reportado en varios sistemas celulares y en tratamientos *in vivo* su capacidad antiestrogénica en el crecimiento (revisado en Sarkar y Li, 2004). En líneas celulares de cáncer humanas se ha demostrado que el tratamiento con indol-3-carbinol es independiente de la señalización por el receptor de estrógenos y se debe al arresto en fase G1 del ciclo celular provocado por inhibición de la quinasa CDK6 (Cover *et al.*, 1998), habiéndose demostrado también en otros sistemas la inducción por parte de este compuesto del inhibidor de ciclina p27 e interacciones con Rb que llevan al ulterior arresto del ciclo (revisado en Puga *et al.*, 2002; Bock y Köhle, 2005). Los resultados presentados indican que si bien el tratamiento con indol-3-carbinol no tiene efecto sobre la proliferación de células en condiciones control o tratadas con FSH, es capaz de producir una inhibición de la estimulación de la síntesis de ADN inducida por la gonadotropina y estradiol en células que entrarían en fase proliferativa. Esta acción

antiestrogénica sobre el crecimiento concuerda con el efecto ya reportado para este compuesto en otros sistemas, como se mencionó anteriormente. Se ha sugerido que parte de esta acción se debe a la inducción del metabolismo del estradiol, principalmente a la formación de 2OHE luego de la hidroxilación en la posición 2 del estrógeno, causada por la actividad transcripcional del AHR. Este fenómeno podría dar cuenta, al menos en parte, del efecto que se verifica en nuestro sistema de estudio. Alternativamente, indol-3-carbinol podría estar ejerciendo su efecto de inhibición de la proliferación por medio de mecanismos no relacionados con los estrógenos, como regulación directa o indirecta de la expresión de proteínas involucradas en el ciclo celular, que impiden que las células entren a la etapa de síntesis de ADN del ciclo celular.

El triptofano y sus metabolitos resultantes por conversión celular o por irradiación con luz UV han demostrado ser agonistas del AHR en ensayos *in vitro*, en sistemas recombinantes de levaduras, en células Hepa1c1c7 y en queratinocitos humanos (Helferich y Denison, 1991; Miller, 1997; Heath-Pagliuso *et al.*, 1998; Sindhu *et al.*, 1996; Sindhu *et al.*, 2003). Por lo tanto, se decidió evaluar si el tratamiento con este agonista regula la síntesis de ADN en el sistema de estudio. En células de la granulosa se halló que el triptofano no posee efectos sobre este parámetro cuando a las células no llegan señales mitogénicas, pero es capaz de inhibir la estimulación de la proliferación inducida por estradiol y FSH a dosis iguales o mayores a 450 μM , concentración a la que se ha reportado que activa al AHR (Heath-Pagliuso *et al.*, 1998). Por lo tanto, se puede inferir que en células de la granulosa la activación del AHR por el triptofano en sí mismo o por alguno de sus metabolitos ejercería un efecto inhibitorio sobre la proliferación inducida por FSH y estradiol. Esta acción antiestrogénica evidenciada en la proliferación concuerda con la de varios agonistas del receptor, como se explicara anteriormente, y puede estar siendo ocasionada por alguno o varios de los mecanismos subyacentes ya mencionados.

El compuesto 3-metilcolantreno ha demostrado ser un potente agonista del AHR en una gran variedad de modelos, incluyendo sistemas de expresión de levaduras, distintas líneas celulares y células mononucleares (Kawanishi *et al.*, 2003; Iseki *et al.*, 2005; Elbeaki *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004). Al ensayar el efecto de este compuesto en la proliferación de células de la granulosa hallamos que si bien no tiene efecto sobre la síntesis basal de ADN, es capaz de modular las señales mitogénicas a dosis de 3 ó 5 μM , amplificando la proliferación inducida por las hormonas. Este resultado contrasta con el efecto de inhibición de la proliferación reportado en otros sistemas como osteoblastos (Naruse *et al.*, 2002), células de Leydig TM3 (Iseki *et al.*, 2005) y líneas celulares de mama (Chaloupka *et al.*, 1992). Sin embargo, se ha reportado que este agonista como único

estímulo induce la proliferación de células foliculares de la tiroides (Hood *et al.*, 2003) o es capaz de inducir crecimiento tumoral en algunas cepas de ratones (Gressani *et al.*, 1999), efectos quizás relacionados a los observados en células de la granulosa.

El ligando del AHR α -naftoflavona ha demostrado ser capaz de actuar tanto como agonista o como antagonista del AHR, dependiendo de la dosis utilizada, del sistema en estudio y de la presencia o ausencia de agonistas exógenos agregados concomitantemente. En líneas celulares de hepatoma se ha reportado que a dosis entre 10 μ M y 50 μ M α -naftoflavona funciona como agonista débil del receptor, ya que ejerce solo un porcentaje del efecto inducido por los típicos agonistas del AHR, como TCDD, 3-metilcolantreno o β -naftoflavona (Wilhelmsson *et al.*, 1994). Sin embargo, incluso a esas dosis a las que agregado como único estímulo activa al AHR, es capaz de antagonizar los efectos de un agonista fuerte en células Hepa1c1c7 (Wilhelmsson *et al.*, 1994). En otros sistemas, como complejos cúmulus-ovocito bovinos, esta flavona como único estímulo es considerada antagonista a concentraciones de 10 μ M (Pocar *et al.*, 2004). Por otro lado, en una gran variedad de modelos se ha demostrado que α -naftoflavona en co-tratamiento con un agonista del receptor es capaz de funcionar como antagonista a concentraciones de entre 0.1 μ M y 1 μ M, dependiendo el sistema (Gasiewicz y Rucci, 1991; Santostefano *et al.*, 1993; Merchant *et al.*, 1993; Merchant y Safe, 1995; Matikainen *et al.*, 2002). En nuestro sistema de estudio, α -naftoflavona a dosis de 1 μ M produjo una leve inducción de los niveles estacionarios de transcritos *Cyp1a1* (este parámetro, como se mencionó anteriormente, es ampliamente usado para caracterizar a un compuesto como agonista del AHR, pues muestra su capacidad de activar al AHR e inducir respuestas mediadas por éste). Sin embargo, esta flavona antagoniza el efecto del agonista β -naftoflavona sobre aquellos mensajeros a dosis de 1 μ M, lo cual indica que la primera puede actuar como antagonista del AHR en presencia de agonistas fuertes incluso a dosis a las cuales agregada como único estímulo induce los transcritos para *Cyp1a1*. A dosis inferiores a 1 μ M, α -naftoflavona no aumenta los niveles de ARNm para la hidroxilasa al ser utilizada como único tratamiento y antagoniza a su vez la inducción ejercida por β -naftoflavona. Todo esto sugiere que el comportamiento reportado para α -naftoflavona en otros sistemas en cuanto a funcionar como agonista o antagonista del AHR a nivel transcripcional se verifica también en las células de la granulosa. Al ensayar el efecto de α -naftoflavona sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata no hallamos ningún efecto de la flavona agregada sola o en combinación con FSH en ninguna de las dosis probadas. Al ser agregada junto con FSH y estradiol, no se observó efecto a concentraciones de 1 μ M. Sin embargo, a concentraciones mayores o iguales a 10 μ M se evidenció una inhibición dependiente de la dosis de la

proliferación inducida por las hormonas que se verificó también a nivel de la expresión de PCNA o ciclina D2. Este comportamiento es consistente con reportes en la línea celular MCF-7, donde la flavona no modula la acción de estradiol a dosis menores a 1 μM (Merchant *et al.*, 1993). Sobre la base de todo lo expuesto, nuestras observaciones podrían indicar que el efecto inhibitorio de la proliferación que ejerce α -naftoflavona a dosis de entre 5 μM y 20 μM en nuestro sistema podría deberse a una acción como agonista del AHR. Este efecto de inhibición de la proliferación concordaría con los de otros agonistas del AHR, pudiéndose hipotetizar que estarían ocasionados por algunos o varios de los mecanismo antiestrogénicos reportados para la activación del AHR.

Beta-naftoflavona es considerado un clásico agonista del AHR, existiendo innumerables reportes sobre su capacidad de activar a este receptor en una amplia variedad de sistemas y tipos celulares y desencadenar las respuestas por él mediadas (como ejemplos ver Brauze *et al.*, 1997; Miller, 1997; Navas y Segner, 2000; Huang *et al.*, 2002; Kawanishi *et al.*, 2003; Hestermann y Brown, 2003; Henry y Gasiewicz, 2003; Granberg *et al.*, 2003; Aluru *et al.*, 2005). Los efectos reportados para esta flavona son clásicamente antiestrogénicos, habiéndose demostrado que es capaz de inhibir la síntesis de vitelogenina inducida por estradiol en hepatocitos de peces (Navas y Segner, 2000; Navas *et al.*, 2004), inducir apoptosis en ovario de peces (Weber y Janz, 2001), provocar disfunciones en la esteroidogénesis (Aluru *et al.*, 2005) y disminuir la actividad peroxidasa uterina y los niveles de receptor de estrógeno hepático en ratas *in vivo* (Brauze *et al.*, 1997). A través de ensayos de inmunofluorescencia se pudo observar que β -naftoflavona es capaz de translocar al AHR al núcleo e inducir los niveles de transcritos para *Cyp1a1* y *Cyp1b1* en cultivos de células de la granulosa, efecto que es revertido por el tratamiento con α -naftoflavona en dosis a las que funciona como antagonista del receptor. Por lo tanto, también en células de la granulosa de rata β -naftoflavona funciona como agonista del AHR, siendo capaz de activarlo e inducir la respuesta transcripcional típica de este receptor. La magnitud de la inducción de los mensajeros de *Cyp1b1* por parte de β -naftoflavona fue modesta en comparación con el efecto ejercido sobre *Cyp1a1*. Resultados similares han sido reportados para otros agonistas del AHR en diferentes modelos (como ejemplo, ver Dasmahapatra *et al.*, 2002). El mecanismo exacto que subyace este fenómeno no ha sido aún establecido, pero una posible razón es el hecho de que en tejidos esteroidogénicos los niveles constitutivos de expresión de los transcritos *Cyp1b1* son considerablemente altos.

En células de la granulosa en cultivo el tratamiento con β -naftoflavona sola o en combinación con FSH no produjo cambios en los niveles de proliferación. Sin embargo, este ligando del AHR es capaz de amplificar, en forma dosis-dependiente, la estimulación de la

proliferación ejercida por las hormonas FSH y estradiol. Como se mencionara anteriormente, el efecto comitogénico que ejerció β -naftoflavona (al igual que 3-metilcolantreno) con estradiol resulto muy interesante, puesto que las interacciones descritas entre agonistas del AHR y del receptor de estrógenos son clásicamente negativas. Dado que el efecto de β -naftoflavona fue de notable magnitud, dosis dependiente y con alta significancia estadística, se decidió en adelante centrar el estudio en este ligando del AHR, el cual mostró una novedosa acción sinérgica con estrógenos sobre la proliferación celular.

Existía la posibilidad de que los efectos ejercidos por β -naftoflavona sobre la proliferación inducida por estradiol no fueran dependientes del AHR, por lo que se procedió a establecer la participación de los correspondientes receptores en el sinergismo observado. Los resultados obtenidos indican que la acción comitogénica de β -naftoflavona y estradiol es mediada por el AHR y por el receptor de estrógenos, ya que fue suprimida por co-tratamiento con antagonistas de los respectivos receptores y fue amplificada en células que sobre-expresan el AHR.

El sinergismo que se evidenció entre β -naftoflavona y estradiol sobre la proliferación celular no se verificó sobre la transcripción de genes inducibles por el receptor de estrógenos, nivel al cual en nuestro sistema se encontró el clásico efecto antiestrogénico reportado para este agonista. Es interesante notar que este fenómeno negativo no es bidireccional, ya que el estradiol no ejerció efecto inhibitorio sobre la expresión de los transcriptos *Cyp1a1* o *Cyp1b1* inducida por β -naftoflavona. Este efecto unidireccional concuerda con reportes en hepatocitos de peces (Bermanian *et al.*, 2004), pero contrasta con hallazgos en líneas celulares humanas o murinas, donde estradiol puede disminuir o aumentar los niveles de ARNm para *Cyp1a1* inducidos por TCDD (como ejemplo, ver Navas y Segner, 2001). Por lo tanto, la interacción mutua a nivel transcripcional parece ser específica para cada célula y está seguramente regulada por factores (co-activadores o co-represores) que se restringen a cada tipo celular. Se han demostrado en diferentes sistemas la existencia de interacciones funcionales y físicas entre el AHR y el receptor de estrógenos, como se detalló en la introducción. Por ejemplo, en células MCF-7 el AHR activado inhibe las respuestas mediadas por el receptor de estrógenos (revisado en Safe *et al.*, 2000; Kohle *et al.*, 2002) y el estradiol ejerce transrepresión de la transcripción de genes inducida por dioxinas a través de interacciones proteína-proteína entre el complejo ER α -AHR-ARNT (Beischlag y Perdew, 2005).

Si bien se ha reportado que β -naftoflavona puede ejercer un efecto mitogénico en una línea celular de hepatoma (Gujavea *et al.*, 1999) y en una línea celular derivada de carcinoma pulmonar (Shimba *et al.*, 2002) cuando es agregada como único estímulo, no

existen antecedentes de sinergismo con estrógenos. Se ha demostrado que en células MCF-7 la activación del AHR por un agonista puede a su vez activar al receptor de estrógenos vacío a través de interacciones no genómicas y resultar por lo tanto en efectos estrogénicos por aumento de la transcripción mediada por el receptor de estrógenos (Ohtake *et al.*, 2003). Sin embargo, las evidencias presentadas en este trabajo indican que este mecanismo no sería el subyacente en nuestro sistema, ya que el efecto de estimulación de la proliferación de β -naftoflavona se verifica solo en presencia de estradiol, es decir, con el receptor de estrógenos ocupado, y además no se verifica a nivel de la transcripción mediada por estrógenos. Los resultados del estudio sugieren por lo tanto que existirían otros mecanismos de interacción positiva entre el receptor de estrógenos y el AHR aún no descritos, en condiciones donde ambos están ocupados por sus ligandos, los cuales explicarían los efectos sinérgicos entre el estradiol y β -naftoflavona en la proliferación de células de la granulosa. Este mecanismo alternativo se sumaría a los ya propuestos, los cuales se detallaron en la introducción general. Es razonable especular que la vía de las MAPKs podrían estar implicadas en este fenómeno, ya que se han descrito interacciones entre las vías de señalización del AHR y de las MAPKs (revisado en Puga *et al.*, 2002; Pocar *et al.*, 2005) y entre ésta última y la vía de señalización del receptor de estrógenos (como ejemplos, ver revisiones de Nilsson, 2001; Lösel y Wehling, 2003; Levin, 2005). Sobre la base de todos los antecedentes descritos sobre la interacción entre ambas vías de transducción y las cascadas de fosforilaciones, podría hipotetizarse que tanto el receptor de estrógenos activado por el estradiol como el AHR activado por β -naftoflavona podrían activar cascadas de quinasas que llevarían en última instancia a un sinergismo en la expresión de ciclina D2 y el correspondiente aumento en la proliferación. Futuras investigaciones podrán establecer el mecanismo subyacente a este sinergismo observado en la proliferación.

Se ha demostrado que el agonista del AHR TCDD produce alteraciones en la regulación de la esteroidogénesis en algunos sistemas, inhibiendo por ejemplo los niveles de síntesis de testosterona en testículo de roedores adultos por un mecanismo dependiente de su receptor que involucraría la inhibición de la enzima P450_{scc} (Fukuzawa *et al.*, 2004). En células de la granulosa luteinizadas humanas, este compuesto causa una inhibición de la producción de estradiol sin alterar el metabolismo del mismo o la actividad de la enzima aromatasa P450, existiendo evidencias de que el punto de regulación sería la actividad 17,20-liasa de la enzima P450_{c17} (Morán *et al.*, 2003). En células de la granulosa luteinizadas de rata, se ha demostrado que TCDD también inhibe la secreción de estradiol,

debido (por lo menos en parte) a la alteración de varios genes de enzimas esteroidogénicas, principalmente la aromatasa (Dasmahapatra *et al.*, 2002). En cambio, en células de la granulosa y de la teca-intersticiales de ratas hipofisectomizadas se ha reportado que el tratamiento con TCDD, a pesar de bloquear la ovulación, no altera la esteroidogénesis (Son *et al.*, 1999). En cerdo, TCDD disminuye la secreción de estradiol por parte de las células foliculares, interfiriendo en la esteroidogénesis a través de su influencia en la actividad de enzimas involucradas en la cascada de biosíntesis de esteroides. En las células luteales, esta acción es mediada por el AHR y probablemente independiente de la estimulación del receptor de estrógenos (Gregoraszcuk, 2002). Se ha demostrado también que esta dioxina aumenta la secreción de estradiol y de progesterona por parte de las células de la teca, pero disminuye la secreción del estrógeno y de progesterona en células de la granulosa, poniendo en evidencia que este agonista del AHR puede ejercer tanto efectos estrogénicos como antiestrogénicos dependiendo el tipo celular (Grochowalski *et al.*, 2001). Recientemente, se ha demostrado que la activación del AHR por parte de 9,10-dimetil-1,2-benzoantraceno (DMBA) lleva a la inducción de la transcripción del gen de la aromatasa en células de la granulosa murinas, reportándose además que animales que carecen del receptor poseen niveles disminuidos de esta enzima (Baba *et al.*, 2005). Por lo tanto, también en esta clase de respuestas se evidencia la capacidad que tiene el AHR de desencadenar acciones distintas, incluso totalmente opuestas, dependiendo de la especie, el tipo celular o el estado de diferenciación del modelo en estudio. Debido a estos antecedentes se decidió ensayar el efecto de ligandos del AHR sobre los niveles de estradiol producidos por células de la granulosa de rata.

Distintos ligandos del AHR han mostrado ejercer una acción diferencial sobre los niveles de estradiol secretados por células de la granulosa. El tratamiento con el agonista β -naftoflavona no produjo cambios sobre dicho parámetro, aún en la mayor dosis ensayada. Estos resultados parecerían contrastar con los obtenidos mediante el tratamiento *in vivo* con dosis bajas de esta flavona a ratas preñadas durante los días 7-14 de gestación, donde se observó que se produjo una inducción de la actividad aromatasa en los microsomas ováricos (Fuhrman-Lane *et al.*, 1983), o con los datos obtenidos al estimular células de la granulosa con DMBA (Baba *et al.*, 2005). Sin embargo, una posible explicación que concilia la ausencia de efecto de β -naftoflavona sobre los niveles de estrógeno secretados en células de la granulosa con los datos previamente reportados, es que este agonista está a su vez induciendo la expresión de *Cyp1a1*, lo que resultaría en un mayor metabolismo del estradiol a catecolestrógenos. Por lo tanto, es posible que los niveles de estradiol se mantengan constantes a pesar del tratamiento con β -naftoflavona porque la diferencia entre

su tasa de síntesis y de metabolismo iguala a la presente en las células control. De todas formas, no puede descartarse que β -naftoflavona a las dosis ensayadas simplemente no induzca cambios ni en la síntesis ni en el metabolismo del estradiol, o que posea efecto pero éste ya no sea evidente luego de 72 h (tiempo de estimulación en estos experimentos). Por otro lado, en hepatocitos de trucha se ha demostrado que esta flavona inhibe la esteroidogénesis, pero las evidencias indican que los puntos de regulación serían las enzimas StAR y P450_{scc}, las cuales catalizan reacciones anteriores a la formación de androstenediona, esteroide que es agregado en nuestro ensayo para evaluar la actividad aromatasa (Aluru *et al.*, 2005). De la misma forma, el tratamiento con 3-indolacético tampoco produjo cambios en los niveles de estradiol secretado por estas células, reproduciéndose quizás también el mismo escenario planteado para β -naftoflavona.

Por el contrario, el tratamiento con α -naftoflavona produce una marcada disminución en los niveles de estradiol en células de la granulosa, que se verifica a partir de dosis de 10 μ M. Este hallazgo es consistente con el hecho de que se ha demostrado que esta flavona inhibe la actividad aromatasa en otras especies (Kellis y Vickery, 1984; Campbell y Kurzer, 1993; Pelissero *et al.*, 1996), compartiendo en nuestro sistema el efecto que otros ligandos como TCDD ejerce en otros modelos. Futuras investigaciones podrán establecer si la disminución en los niveles de estradiol aquí observada se debe a inhibición de la aromatasa, a un aumento en el metabolismo del estradiol o a una combinación de ambas acciones.

Los resultados arriba planteados muestran que el ligando del AHR α -naftoflavona disminuye los niveles de secreción de estradiol en células de la granulosa (por inhibición de la expresión y/o la actividad de la aromatasa y/o inducción de un aumento en el metabolismo del estradiol), mientras que los ligandos β -naftoflavona y 3-indolacético no modifican en forma neta los niveles de secreción de estradiol (por inducción del metabolismo de estradiol y concomitante inducción de la aromatasa o porque simplemente no regula los niveles del estrógeno a esas dosis en nuestro sistema o los cambios ya no son evidentes a los tiempos estipulados).

Se ha estudiado en muchos sistemas y especies la implicancia de los catecolestrógenos en carcinogénesis, en el sistema nervioso, en la regulación de la función ovárica y en la interacción embrión-uterina durante la implantación (revisado en Spicer y Hammond, 1989; Liehr, 1997; Paria *et al.*, 2001; Teepker *et al.*, 2003). Como se mencionó en la introducción, si bien el efecto de los catecolestrógenos sobre la diferenciación se encuentra bien establecido, no se ha investigado tanto sobre la acción de estos compuestos en el crecimiento celular. Además, existen evidencias de que sería a nivel de la regulación de la proliferación celular donde podrían observarse mayores diferencias entre los efectos de

estos compuestos y la acción clásica de los estrógenos. Dado que las acciones locales que ejerce el estradiol, fundamentalmente la amplificación de la acción de FSH, juegan un papel fundamental en el desarrollo y la selección del folículo ovulatorio, y dado que los agonistas del AHR inducen la conversión de este estrógeno a catecolestrógenos, se decidió determinar si estos últimos ejercen una acción diferencial sobre la proliferación celular de las células de la granulosa.

Ninguno de las catecolestrógenos estudiados han mostrado tener la capacidad de amplificar la señal de FSH o TGF β y provocar una estimulación en la proliferación de las células de la granulosa. Esto difiere del clásico efecto que posee estradiol, quien es capaz de sinergizar con la gonadotropina o el factor de crecimiento y estimular la síntesis de ADN. Esto indicaría que la conversión de estradiol a catecolestrógenos en las células de la granulosa jugaría un rol importante en la función ovárica, señalando que la modulación a nivel de las enzimas CYPs sería un significativo punto de regulación en el crecimiento de las células de la granulosa. Además, los compuestos 2OHE y 2MOE a dosis altas mostraron ser capaces de inhibir la síntesis de ADN estimulada hormonalmente, lo cual sugiere que una marcada inducción de las hidroxilasas resultante de la activación del AHR por agonistas como contaminantes ambientales podría resultar en acumulación de estos compuestos y una posible inhibición de la proliferación celular. El efecto inhibitorio de 2OHE y 2MOE sobre la proliferación de las células de la granulosa de rata es consistente con acciones similares en células de la granulosa de cerdo (Spicer y Hammond, 1989). El efecto de 2MOE podría estar reflejando una inhibición de la mitosis por inhibición de la polimerización de tubulina, ya que se ha demostrado que este metabolito posee esta capacidad *in vitro* (D'Amato *et al.*, 1994). Por otro lado, la incapacidad de los catecolestrógenos de estimular la proliferación o su efecto inhibitorio sobre la síntesis de ADN descarta completamente la posibilidad de que β -naftoflavona ejerza su acción sobre la proliferación a través de la inducción del metabolismo del estradiol a catecolestrógenos. La acción inhibitoria de la síntesis de ADN que ejercen los metabolitos en presencia de FSH no se verificó en el caso de estimulación con TGF β , lo cual sugiere que estos catecolestrógenos inhibirían puntos claves particulares de la señalización por la gonadotropina.

Por todo lo discutido en esta sección, nuestro estudio sugiere que el AHR está involucrado en la regulación de la proliferación de las células de la granulosa a través de la modulación de las acciones de las hormonas clásicas. Se demuestra además un novedoso sinergismo entre agonistas del AHR y del receptor de estrógenos sobre la proliferación, el cual implicaría una interacción positiva entre ambos receptores ocupados.

4. Módulo II

***Regulación de la expresión del
receptor de aril hidrocarburos en
células de la granulosa***

4.1. *Introducción*

En el estudio de la biología y la función de un receptor celular tiene gran interés el análisis de los mecanismos y las posibles interacciones que dan como resultado una respuesta determinada. Por esto es que se ha investigado intensamente el camino de transducción de la señal desencadenada por el AHR, avanzando con esto considerablemente en el conocimiento de la biología del receptor y de los efectos que él media, ya reportados con anterioridad.

Numerosos aspectos de la señalización mediada por el AHR se encuentran actualmente bien establecidos, como se explicara en secciones anteriores. La mayoría de los estudios en esta área se han centrado en definir los componentes de la vía, comprender las interacciones existentes entre éstos últimos y distintas proteínas o el ADN y establecer la batería de genes que sufren regulación por la activación de este receptor. Tanto los mecanismos por los cuales la activación del AHR altera la expresión génica a través de los XREs, como las interacciones entre este receptor y otras vías de transducción que regulan respuestas a niveles no genómicos, han sido muy investigados (revisado en Ma, 2001; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005; Pocar *et al.*, 2005).

Por el contrario, se ha puesto considerablemente menos énfasis en el estudio de la regulación que sufre la expresión del propio AHR. Tanto el destino del receptor luego de ser activado por ligandos y unirse a los XREs como los mecanismos involucrados en apagar o atenuar su señal, por ejemplo, son de gran importancia para la comprensión de la vía de señalización mediada por el AHR y de las respuestas que ésta induce. Esto es así, ya que es la tasa de atenuación la que en última instancia determina la duración y magnitud de la respuesta de regulación génica. Esta noción ha motivado a la realización, relativamente reciente, de varios estudios centrados en determinar la regulación que experimenta el AHR luego de la exposición a sus ligandos.

Se ha mostrado en varios sistemas que agonistas del AHR son capaces de inducir una marcada disminución en los niveles celulares totales de proteína AHR. Por ejemplo, se ha observado la depleción de AHR en células de múltiples tejidos luego del tratamiento *in vivo* con TCDD (Pollenz *et al.*, 1998) y luego del tratamiento de células de hepatoma en cultivo con esta dioxina (Giannone *et al.*, 1995; Giannone *et al.*, 1998; Pollenz, 1996). Las evidencias arrojadas por resultados obtenidos en varias líneas celulares en cultivo y modelos de roedores expuestos *in vivo* a TCDD y otros agonistas indican que esta regulación negativa que sufre la proteína AHR como consecuencia de la unión de ligandos en esos sistemas no es causada por una disminución en los niveles de mensajeros para el

receptor. En cambio, los resultados sugieren fuertemente que es debida a degradación mediada por la vía del proteasoma 26S luego de ubiquitinación (revisado en Pollenz, 2002). Se ha propuesto a su vez que el rol fisiológico de este fenómeno de degradación sería el de modular la regulación génica mediada por el AHR, atenuando y apagando la señal desencadenada por la activación del receptor (revisado en Pollenz, 2002).

Mediante el uso de líneas celulares que expresan variantes del receptor deficientes en la importación o la exportación nuclear, se ha postulado que tanto la maquinaria proteolítica presente en el compartimiento citosólico como la que se encuentra en el núcleo serían suficientes para degradar el AHR (Song y Pollenz, 2003; Roberts y Whitelaw, 1999; Lees *et al.*, 2003). Aunque existe controversia sobre este punto, se sugiere que ni la unión del AHR a ARNT o al ADN, ni la exportación nuclear luego de la actividad del receptor como factor de transcripción serían necesarias para su eficiente degradación.

Si bien el modelo sobre degradación proteasomal del AHR luego del tratamiento con ligandos está sustentado por abundante evidencia, existen numerosos reportes de resultados opuestos observados en diversos modelos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha hallado que el tratamiento de ratas con una mezcla de bifenilos policlorados eleva los niveles de la proteína AHR y de sus transcritos (Denomme *et al.*, 1986; Wakui *et al.*, 2005), mientras que la exposición *in utero* a bisfenol A induce la expresión de los mismos en diversos órganos de ratones, incluyendo las gónadas (Nishizawa *et al.*, 2005). A su vez, el tratamiento *in vivo* sostenido o agudo con dosis bajas de TCDD es capaz de producir un aumento en la expresión hepática de este receptor en un modelo de ratas, tanto a nivel de su proteína como de su ARNm (Franc *et al.*, 2001). De la misma manera, se ha hallado que el tratamiento *in vivo* con esta dioxina aplicado en un modelo experimental de endometriosis de ratas adultas ovariectomizadas estimula la expresión de la proteína AHR tanto en el epitelio luminal como en el estroma (Kitajima *et al.*, 2004). El tratamiento prolongado con la dioxina es también capaz de elevar los niveles citosólicos del receptor en células de hígado de roedores (Sloop y Lucier, 1987). Más aún, se ha observado que los niveles de AHR aumentan en cultivos primarios de hepatocitos de trucha luego del tratamiento con β -naftoflavona o α -naftoflavona (Aluru *et al.*, 2005).

Lo expuesto anteriormente muestra que existen importantes discrepancias sobre el efecto que puede tener el tratamiento con ligandos del AHR sobre la propia expresión del receptor. Tomando como ejemplo a la dioxina TCDD, está claro que el tratamiento con este agonista del AHR puede producir distintos y opuestos efectos sobre los niveles de proteína del receptor dependiendo de la dosis, la duración de la exposición y el tejido u organismo estudiado. Sin embargo, existe consenso en que los niveles de expresión de la proteína

ARNT no se ven alteradas en ninguno de los casos mencionados (revisado en Pollenz, 2002).

El aspecto quizás más interesante dentro de esta área de investigación es la posible regulación fisiológica de la expresión del AHR. Los cambios en los niveles de expresión de este receptor que puedan ejercer compuestos endógenos como hormonas, factores peptídicos o cualquier otro tipo de molécula que pueda llegar a la célula, juega un papel fundamental en la investigación, el análisis y el entendimiento de la función del AHR en cualquier sistema de estudio. Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre la regulación fisiológica del AHR y sus posibles reguladores endógenos, existiendo actualmente solo algunos estudios que evalúan la expresión de este receptor en ausencia de ligandos exógenos.

Existen evidencias indirectas de moduladores endógenos del AHR. Se ha observado que el estado de diferenciación celular es capaz de modular la expresión del AHR (Hayashi *et al.*, 1995; Wanner *et al.*, 1995; Shimba *et al.*, 1998; Shimba *et al.*, 2001; Shimba *et al.*, 2003) y se ha reportado que en ratas existe una oscilación diaria en el patrón de expresión del AHR y de ARNT en hígado, pulmones y timo (Richardson *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha mostrado que los niveles de transcriptos para *Ahr* aumentan durante el intervalo periovulatorio en células de la granulosa de macaco y que fluctúan a lo largo del ciclo estral de la rata en tejido hepático y ovárico (Chaffin *et al.*, 1999; Chaffin *et al.*, 2000). En este último trabajo se reporta que en la tarde del proestro ocurre una abrupta caída en los niveles de ARNm para el receptor, sugiriéndose que existiría un factor asociado al ciclo reproductivo de la rata que sería importante en regular la expresión del gen para *Ahr* en dichos órganos. Sin embargo, aún no se ha determinado dicho factor. Pero sin duda, la observación de que los niveles de expresión del AHR fluctúan durante procesos biológicos sugiere que existirían moduladores endógenos, fisiológicos, de la expresión de este receptor.

Por otro lado, se ha mostrado que en líneas tumorales humanas la expresión del AHR y de los genes inducibles por este factor de transcripción es inhibida TGF- β , estando involucrados en este fenómeno los mediadores intracelulares Smad 2, 3 y 4 (Döhr y Abel, 1997; Wolf *et al.*, 2001). Se sostiene que la relación entre el AHR y la señalización por TGF- β jugaría un importante rol en el desarrollo (revisado en Puga *et al.*, 2005). Además, existen resultados que indican que el suero y algunos factores de crecimiento son capaces de regular la expresión del AHR en fibroblastos murinos 3T3 (Vaziri *et al.*, 1996).

La región flanqueante 5' del gen *Ahr* no contiene *TATA box*, sino varios grupos de GC múltiples cercanos al sitio de iniciación de la transcripción. Se han realizado comparaciones entre los promotores del gen perteneciente a ratón y a humanos, lo cual ha

revelado regiones conservadas de secuencias de reconocimiento y unión para factores de transcripción como Sp1 (Schmidt *et al.*, 1991; Eguchi *et al.*, 1994; Mimura *et al.*, 1994; Garrison y Denison, 2000; Racky *et al.*, 2004). Se han mencionado a su vez en aquellos trabajos potenciales sitios AP-1, CRE (elementos de respuesta para AMPc), TRE (elementos de respuesta para TGF- β) y sitios que confieren expresión específica en placenta.

Basándose en el hecho de que el AHR se localiza en tejidos endócrinos y de que existen en nuestro sistema de estudio interacciones entre los agonistas de este receptor y las señales inducidas por estrógenos, puede hipotetizarse que las hormonas que regulan la función de las células de la granulosa tendrían la capacidad de modular la expresión del AHR en la rata. Esta idea se ve a su vez apoyada por la observación de que los niveles de transcritos para el *Ahr* fluctúan a lo largo del ciclo estral de la rata, en una forma que refleja los cambios que ocurren en los niveles de hormonas como la FSH o el estradiol.

A su vez, dada la diversidad de efectos que se han reportado para el tratamiento con ligandos del AHR sobre la expresión del propio receptor, y dado el importante rol que la regulación del mismo jugaría sobre las respuestas biológicas, cobra gran interés el estudio de la regulación de la expresión del AHR por unión a sus ligandos en el ovario de la rata. Sobre la base de todo lo expuesto, es razonable especular que el tratamiento con ligandos de este receptor modulen la expresión del mismo.

4.2. Objetivos

El primer objetivo de esta parte del trabajo es determinar si las hormonas FSH y estradiol, estímulos claves en la función de las células de la granulosa, son capaces de modular la expresión del receptor de aril hidrocarburos, estableciendo así sus posibles participaciones como moduladores endógenos de la expresión del receptor.

Es también objetivo de esta sección de la tesis estudiar la regulación de la expresión del receptor de aril hidrocarburos por parte de sus ligandos, determinando los mecanismos subyacentes.

4.3. Resultados

4.3.1. Regulación de los niveles de proteína AHR por las hormonas FSH y estradiol

Se decidió evaluar si las hormonas FSH y estradiol son capaces de regular la expresión del AHR en células de la granulosa. La gonadotropina y el estrógeno fueron elegidos para este análisis ya que éstos son estímulos claves para la función de las células ováricas. A su vez, los antecedentes sobre la fluctuación de los niveles de mensajeros para el AHR a lo largo del ciclo estral de la rata, junto con las evidencias explicadas más arriba que señalan una posible regulación endócrina para el AHR, convierten a estas hormonas en excelentes candidatas a reguladoras de la expresión de este receptor.

Se ensayó por *Western Blot* el contenido total de proteína AHR en lisados de células de la granulosa luego del tratamiento con FSH, estradiol o una combinación de ambas hormonas. Como puede verse en la Figura 4.1 A, 4 h de tratamiento con la gonadotropina no tuvo efecto alguno sobre los niveles de proteína AHR. Tampoco se evidenció a estos tiempos de estimulación ninguna regulación sobre este parámetro al agregar estradiol o una combinación de FSH y el estrógeno (Figura 4.1 A). Los mismos resultados se obtuvieron al extender la incubación a 6 h, mostrándose en las figuras los datos pertenecientes a las 4 h de estimulación como representativos.

Sin embargo, el tratamiento con FSH o estradiol durante 12 horas fue capaz de inducir una reducción de alrededor del 25% ó 30%, respectivamente, en los niveles de proteína AHR (Figura 4.1 B). El tratamiento con ambas hormonas redujo aproximadamente un 40% el contenido de proteína del receptor en células de la granulosa (Figura 4.1 B). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los efectos producidos por la gonadotropina, el estrógeno, o la combinación de ambos.

La reducción en los niveles de proteína AHR inducida por FSH y estradiol también fue verificada a las 24 h de tratamiento (Figura 4.1 C). Al extender el tratamiento con estas hormonas durante 36-48 h, se halló que la combinación de ambas disminuye la expresión de la proteína a niveles que representan 20% de los hallados en las células control. El agregado de la gonadotropina sola produjo en 60% de reducción en los niveles del receptor (Figura 4.1 D). La figura 4.2 muestra los cambios en los niveles de proteína AHR en función del tiempo luego de la estimulación con las hormonas en estudio.

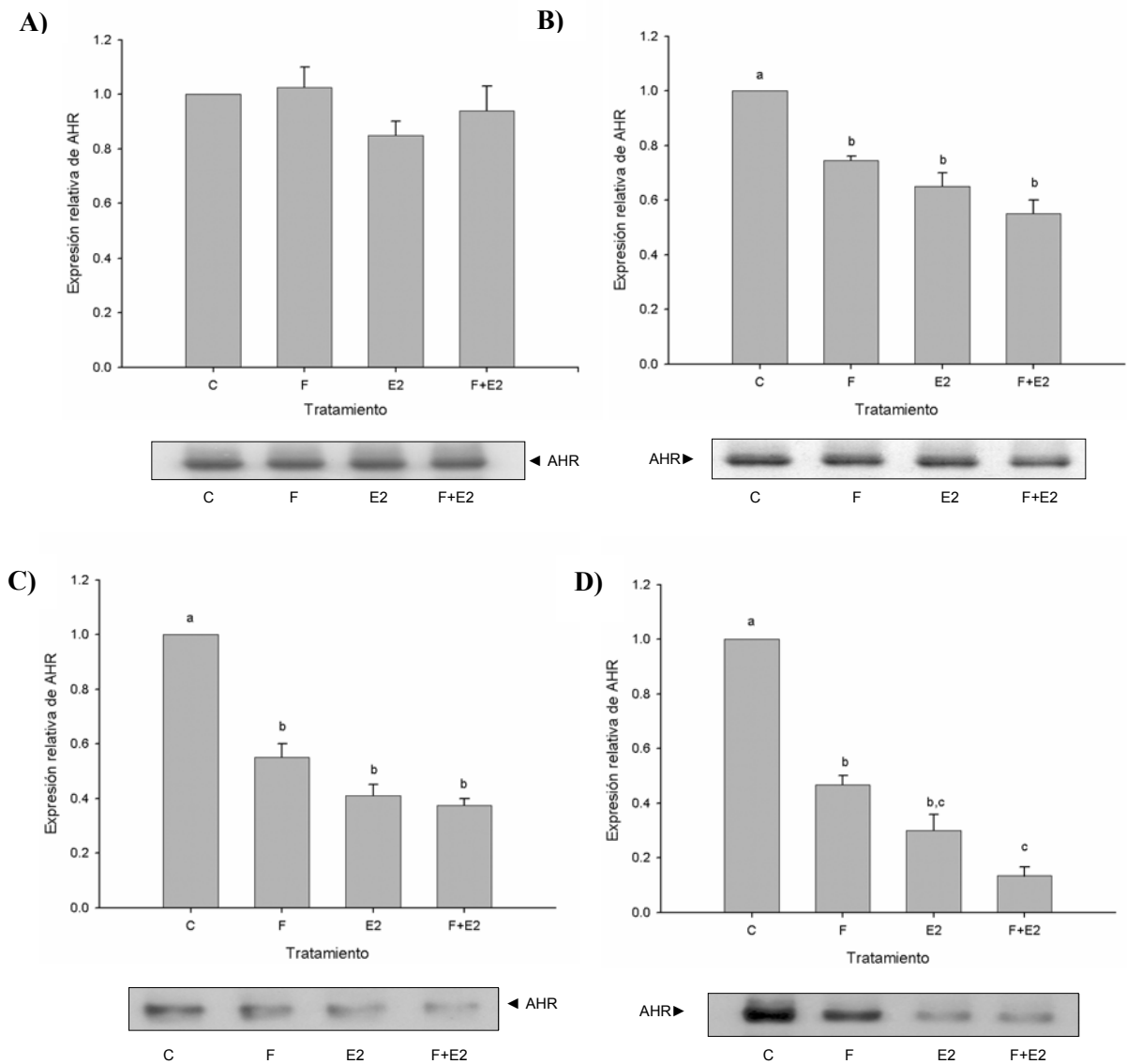


Figura 4.1. Regulación de los niveles de expresión de proteína AHR por FSH y estradiol en células de la granulosa. Se cultivaron células de la granulosa durante 4 h (parte **A**), 12 h (parte **B**), 24 h (parte **C**) o 36-48 h (parte **D**) en medio control (C), con FSH (2 ng/ml, F), con estradiol (100 ng/ml, E2) o con una combinación de FSH y estradiol (F+E2). Se aislaron las proteínas totales de extractos celulares y se realizó *Western Blot* contra AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Los valores que no comparten letras son significativamente distintos: **B)** $P < 0.05$; **C)** $P < 0.001$, excepto para C vs. F, donde $P < 0.01$; **D)** $P < 0.001$, excepto para C vs. F, donde $P < 0.01$ y F vs. F+E2, donde $P < 0.05$. Se muestran *Western Blots* representativos de AHR debajo de cada gráfico de barras.

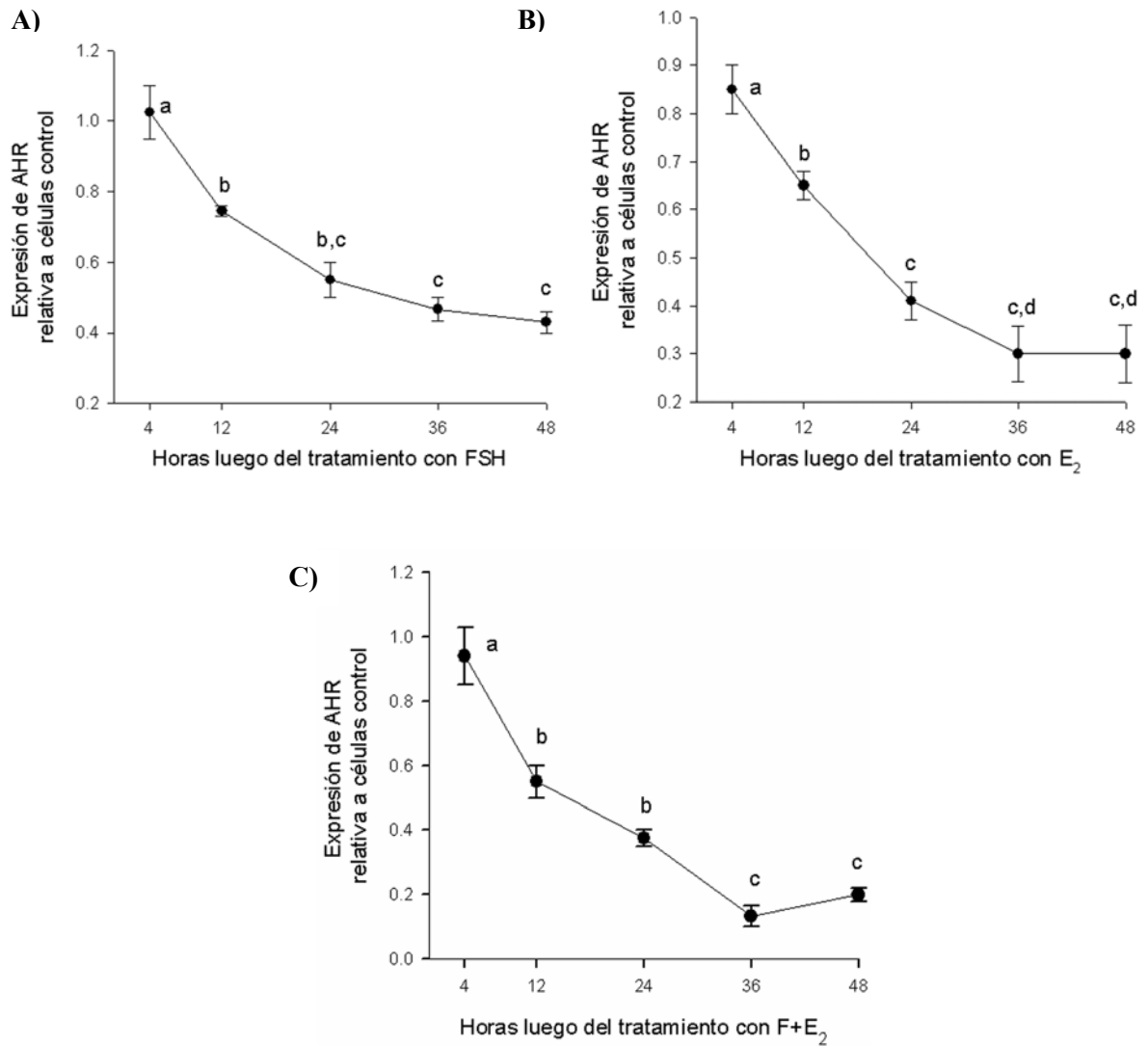


Figura 4.2. Niveles de expresión de proteína AHR en función del tiempo luego del tratamiento con FSH y estradiol en células de la granulosa. Se grafican los cambios en los niveles de expresión de AHR 4, 12, 24, 36 ó 48 h luego de la estimulación con FSH (parte A), estradiol (E₂, parte B) o una combinación de FSH y estradiol (F+E₂, parte C). Los valores se expresan como las medias \pm ES, relativos a los valores alcanzados por las células control, los cuales fueron fijados arbitrariamente en 1. Letras distintas denotan diferencias significativas: **A)** $P < 0.001$, excepto para 4 h vs. 12 h y 12 h vs. 36 h, donde $P < 0.05$ y 12 h vs. 48 h, donde $P < 0.01$; **B)** $P < 0.05$, excepto para a vs. c y a vs. d, donde $P < 0.01$; **C)** $P < 0.001$, excepto para 24 h vs. 36 h, donde $P < 0.05$ y 4 h vs. 12 h, 12 h vs. 36 h y 12 h vs. 48 h, donde $P < 0.01$).

4.3.2. Regulación de los niveles del ARNm de *Ahr* por las hormonas FSH y estradiol

Con el objetivo de determinar a qué nivel ocurre la inhibición que ejercen FSH y estradiol sobre la expresión de la proteína del receptor, se decidió investigar el efecto de dichas hormonas sobre los niveles de transcritos *Ahr*. La realización de este análisis permite establecer si la disminución en la expresión proteica del receptor puede atribuirse, al menos en parte, a una reducción en los niveles de mensajeros.

Se determinó por lo tanto los niveles estacionarios de mensajeros del *Ahr* mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa en cultivos de células de la granulosa tratadas con los distintos estímulos en estudio. Como se muestra en la Figura 4.3 A, el tratamiento con FSH durante 12 h produce una marcada reducción en los niveles de transcritos para el receptor. Este efecto se observó también cuando la gonadotropina fue agregada en combinación con estradiol, lo que resultó en una reducción de alrededor del 80% en los niveles de transcritos para el *Ahr* en comparación con las células control. Por el contrario, el tratamiento con el estrógeno individualmente no produjo cambios en los niveles de mensajeros *Ahr* luego de 12 h de estimulación.

La reducción en los niveles de mensajeros para el receptor causada por la gonadotropina o por la combinación de ésta y el estrógeno también se verificó cuando la incubación con los estímulos se realizó durante 24 ó 36-48 h, aunque la magnitud de la inhibición fue inferior a la observada a las 12 h (Figura 4.3 B y C).

A diferencia de lo observado en los cultivos luego de 12 h de incubación, el agregado de estradiol fue capaz de producir, por sí mismo, una marcada disminución en los niveles de transcritos para el receptor a las 24 h de estimulación (Figura 4.3 B). Cuando la incubación se extendió a 36-48 h, también se encontró que el tratamiento con estradiol disminuye los niveles de mensajeros para el receptor en comparación con las células tratadas solo con vehículo (Figura 4.3 C).

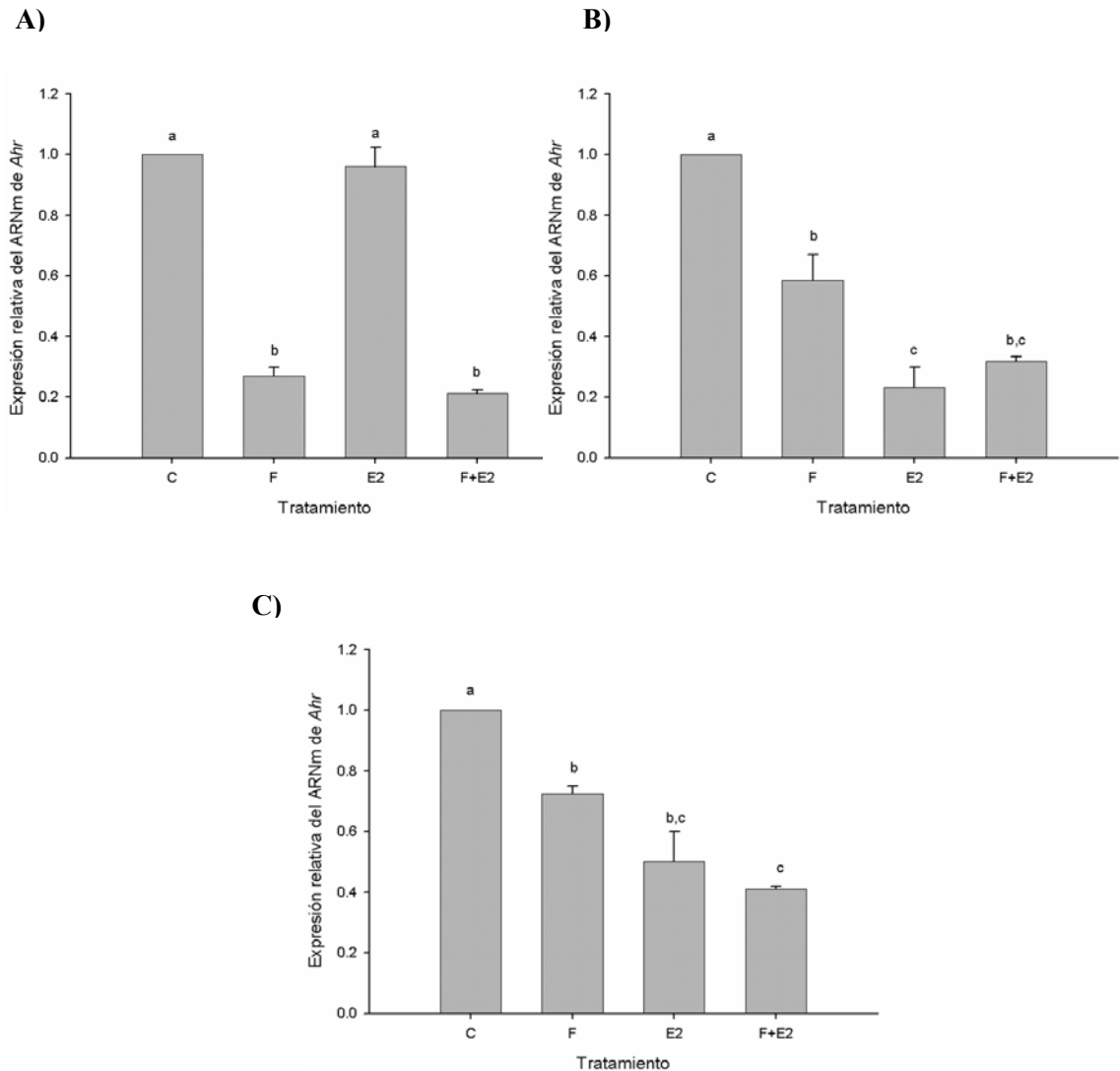


Figura 4.3. Regulación de los niveles del ARNm de *Ahr* por FSH y estradiol en células de la granulosa. Se cultivaron células de la granulosa durante 12 h (parte **A**), 24 h (parte **B**) ó 36-48 h (parte **C**) en medio control (C), con FSH (2 ng/ml, F), con estradiol (100 ng/ml, E2) o con una combinación de FSH y estradiol (F+E2). Se aisló el ARN total y se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para los transcritos de *Ahr* como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de cada ARNm fue normalizado por la señal del 18S ribosomal para cada muestra (y relativizado a las células control) y se grafican como la media \pm ES de tres experimentos independientes. Los valores con letras distintas son significativamente distintos **A)** $P < 0.001$; **B)** $P < 0.01$, excepto para C vs. F y F vs. E2, donde $P < 0.05$; **C)** $P < 0.01$, excepto para C vs. F+E2, donde $P < 0.001$ y C vs. E2, donde $P < 0.05$.

4.3.3. Participación de la degradación proteasomal en la regulación de la expresión del AHR por hormonas a las 12 h de estimulación

De los resultados presentados anteriormente se desprende que la acción inhibitoria que ejerce el estradiol sobre la expresión de la proteína AHR a las 12 h de estimulación no puede atribuirse a una reducción en los transcritos para el receptor. Por lo tanto, en la búsqueda de mecanismos que puedan explicar la disminución observada en los niveles proteicos, se decidió investigar si el estrógeno induce degradación proteasomal de la proteína AHR a esos tiempos de incubación.

La Figura 4.4 muestra los resultados de experimentos donde se utilizó lactacistina, un inhibidor específico del proteasoma 26S, como estímulo en cultivos de células de la granulosa incubadas durante 12 h en condiciones control o en presencia de estradiol, tanto solo como en combinación con FSH.

Como puede observarse en la Figura 4.4 B, la disminución en los niveles de proteína AHR inducida por estradiol fue casi totalmente bloqueada al inhibirse la actividad proteasomal. El análisis estadístico de los datos de estos experimentos no arrojó diferencias significativas entre los niveles de AHR en las células control y en aquellas que habían sido tratadas con estradiol y con lactacistina durante 12 h.

Por el contrario, lactacistina no fue capaz de revertir la reducción en los niveles de proteína AHR inducida por el tratamiento con FSH (Figura 4.4 A).

Del mismo modo, no se observó efecto alguno de la lactacistina sobre la inhibición de la expresión del receptor causada por la estimulación con una combinación de FSH y estradiol (Figura 4.4 C).

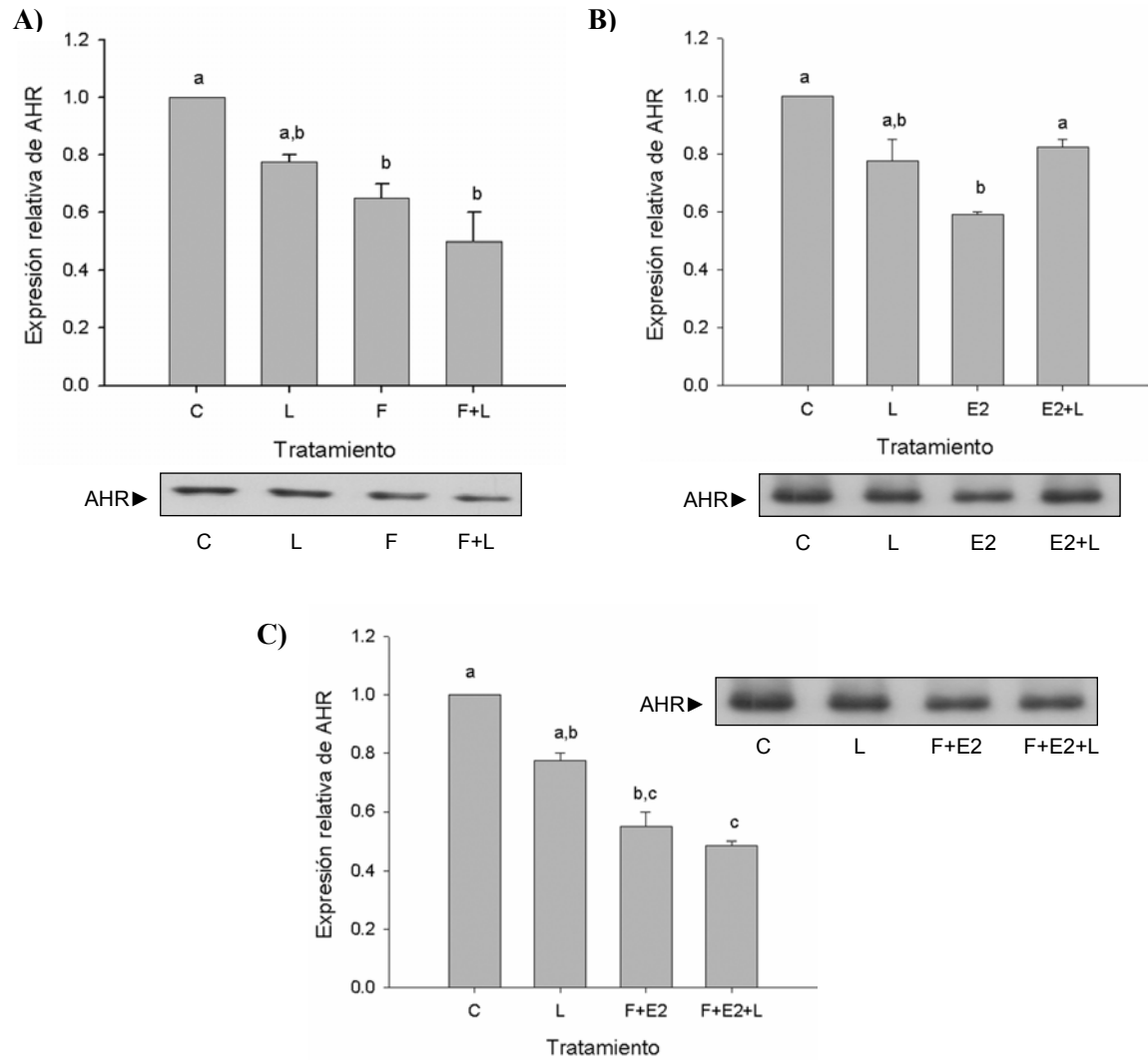


Figura 4.4. Participación de la degradación proteasomal en la regulación de la expresión del AHR por las hormonas a las 12 h de estimulación. Se cultivaron las células de la granulosa en medio control (C), con lactacistina (20 μ M, L), con FSH (2 ng/ml, F), con estradiol (100 ng/ml, E2) o con una combinación de ambas hormonas (F+E2). Éstas se agregaron solas o en presencia de 20 μ M lactacistina (F+L, E2+L, F+E2+L, respectivamente). Luego de 12 h de incubación, se aislaron las proteínas totales de los extractos celulares y se realizó *Western Blot* para AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$, excepto para las siguientes comparaciones: Parte **B)** C vs. E2, $P < 0.01$; Parte **C)** C vs. F+E2 y C vs. F+E2+L, $P < 0.01$). Junto a cada gráfico de barras se muestra un *Western Blot* representativo.

4.3.4. Regulación de los niveles de expresión de la proteína AHR por el agonista β -naftoflavona

Como se explicó en la introducción, resulta de gran importancia determinar el efecto de la activación del AHR sobre los niveles de su propia expresión para poder comprender la regulación de la señal que él desencadena, y por lo tanto, la modulación y el alcance de la acción provocada por agonistas.

Por lo tanto, con el objeto de determinar si la activación del AHR por el tratamiento con un agonista es capaz de regular los niveles celulares de proteína de este receptor, se decidió ensayar el efecto del ligando β -naftoflavona sobre este parámetro en células de la granulosa de rata en cultivo. Como se estableció previamente, esta flavona actúa como agonista del AHR en el sistema de estudio.

Al tratar los cultivos de células de la granulosa control con el agonista del AHR β -naftoflavona durante 4 h, pudo observarse una marcada disminución en los niveles de proteína del receptor, evidenciándose una reducción de más del 75% en el contenido celular de AHR inducido por este ligando (Figura 4.5). Al ensayar el efecto del co-tratamiento con β -naftoflavona y α -naftoflavona (1 μ M, dosis a las que funciona como antagonista del receptor), se encontró que este antagonista del AHR fue incapaz de revertir el efecto de la primera. Por el contrario, se observó un aparente sinergismo entre ambas flavonas en la disminución de los niveles de expresión de AHR; sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo (Figura 4.5).

Resultados similares se obtuvieron al ensayar el efecto 4 h después del agregado del agonista en presencia de FSH y estradiol, produciendo β -naftoflavona una reducción de alrededor del 90% en el contenido total de proteína AHR y siendo α -naftoflavona, como anteriormente, incapaz de antagonizar el efecto de la primera (Figura 4.5).

El mismo patrón de expresión se halló al aplicar los tratamientos mencionados y evaluar la expresión del receptor a las 6 h de estimulación, mostrándose en las figuras los resultados correspondientes a las 4 h de incubación como representativos.

Al ensayar los efectos de α -naftoflavona (dosis de 1 μ M ó 0,5 μ M) agregada como único estímulo sobre la expresión del AHR, se encontró que este antagonista es también capaz de reducir casi por completo los niveles de proteína. El mismo resultado se obtuvo al utilizar dosis de este ligando a las que funciona como agonista del receptor (10 μ M). Esto se verificó a las 4, 6 y 24 h de estimulación, mostrándose en la Figura 4.6 como representativos, los valores obtenidos luego de 4 h de incubación.

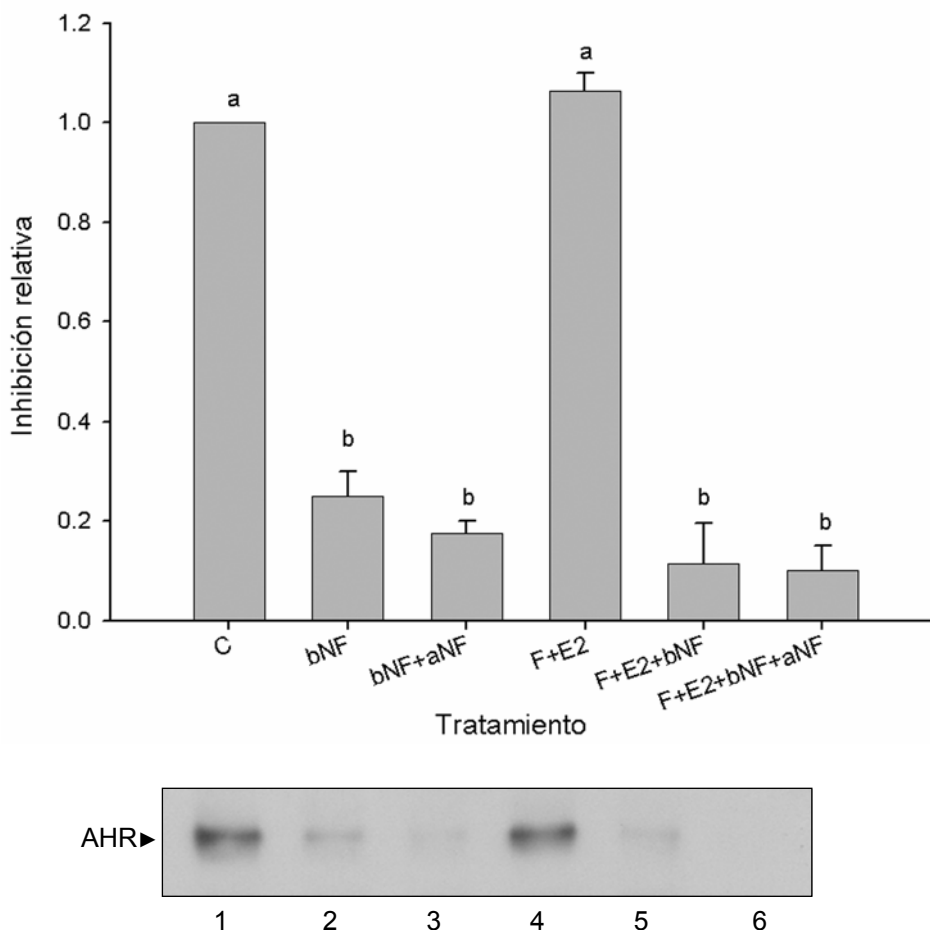


Figura 4.5. Regulación del contenido celular de proteína AHR por β -naftoflavona a las 4 h de estimulación. Se cultivaron las células de granulosa durante 4 h en medio control (C), con 10 μ M β -naftoflavona agregada sola (bNF) o en combinación con 1 μ M α -naftoflavona (bNF+aNF), o en medio conteniendo FSH y estradiol (2 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente) tanto en ausencia (F+E2) como en presencia de β -naftoflavona 10 μ M agregada sola (F+E2+bNF) o en combinación con 1 μ M α -naftoflavona (F+E2+bNF+aNF). Se aislaron las proteínas totales a partir de extractos celulares y se realizó *Western Blot* para AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de cuatro experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$). Panel inferior: *Western Blot* representativo. Calle 1: medio control; Calle 2: bNF; Calle 3: bNF+aNF; Calle 4: FSH+E₂; Calle 5: FSH+E₂+bNF; Calle 6: FSH+E₂+bNF+aNF.

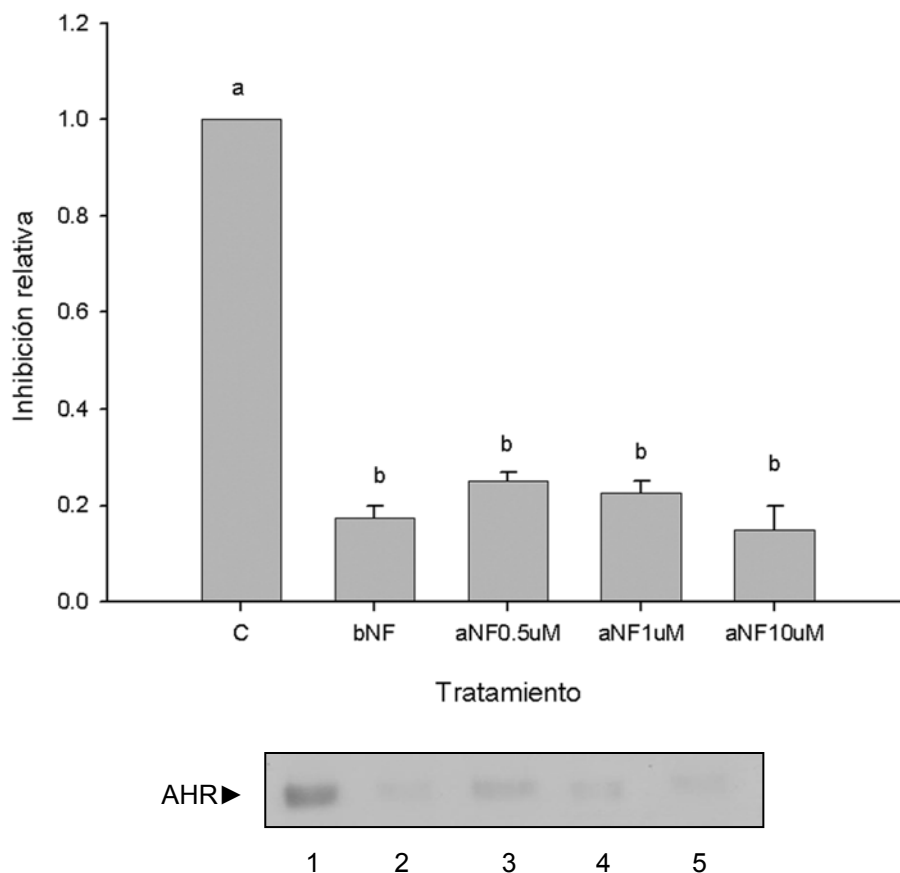


Figura 4.6. Regulación del contenido celular de proteína AHR por ligandos a las 4 h de estimulación. Las células de la granulosa en cultivo fueron cultivadas en medio control (C), con β -naftoflavona (10 μ M, bNF) o con α -naftoflavona a dosis de 0,5 μ M (aNF0.5uM), 1 μ M (aNF1uM) ó 10 μ M (aNF10uM). A las 4 h de tratamiento se levantaron las células y se realizó *Western Blot* para el AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de dos experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$). Panel inferior: *Western Blot* representativo. Calle 1: Medio control; calle 2: bNF 10 μ M; calle 3: aNF 0,5 μ M; calle 4: aNF 1 μ M; calle 5: aNF 10 μ M.

Se decidió evaluar los niveles de expresión del AHR a tiempos más largos de estimulación con sus ligandos. Esto brindaría información sobre cuán sostenido es el efecto de reducción de la proteína AHR inducido por el agregado de los ligandos, si se produce una rápida recuperación de los niveles del receptor o si la acción es prolongada.

Al realizar este análisis a las 12 h de incubación, se observó que los niveles de AHR continuaban igualmente disminuidos, igual que a las 24 h de estimulación. Se evaluó entonces la cantidad de proteína AHR a distintos tiempos entre las 36 y las 48 h luego de la estimulación con el agonista, obteniéndose resultados similares. Por lo tanto, se detallan a continuación los correspondientes a las 40 h de estimulación, tiempo elegido en representación de ese rango de tiempo.

Al tratar las células de la granulosa con β -naftoflavona durante 40 h., se observó que este agonista ejerce una marcada inhibición de la expresión del AHR, reduciendo los niveles de proteína casi completamente. De la misma forma que lo encontrado a tiempos cortos de estimulación, el co-tratamiento con el antagonista α -naftoflavona fue incapaz de revertir el efecto del agonista (Figura 4.7).

El mismo patrón de respuesta se obtuvo al evaluar el efecto del agonista en presencia de FSH y estradiol. Encontramos que los niveles de expresión de la proteína AHR luego de 40 h de estimulación con β -naftoflavona en presencia de las hormonas FSH y estradiol fueron casi indetectables. Los resultados se muestran en la Figura 4.7.

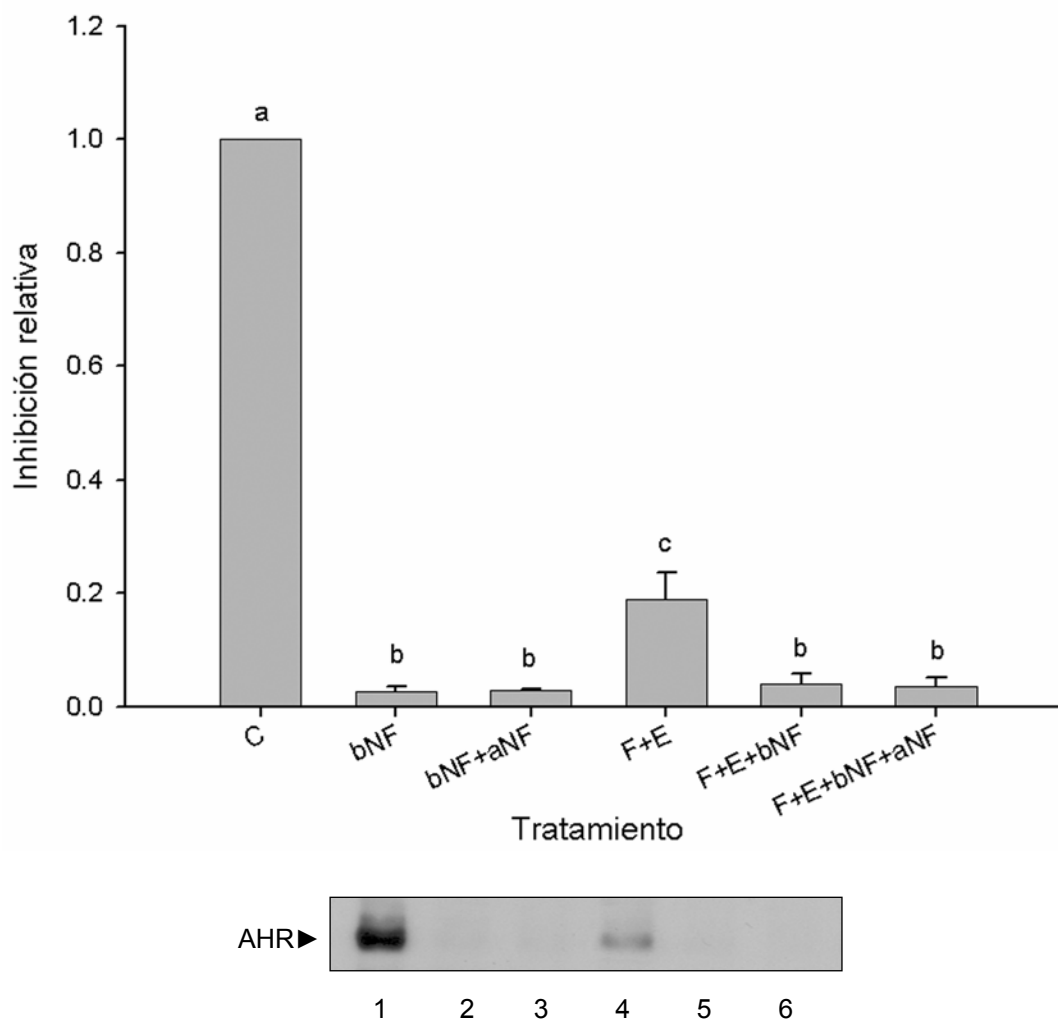


Figura 4.7. *Regulación del contenido celular de proteína AHR a las 40 h de estimulación con β -naftoflavona.* Las células de la granulosa fueron cultivadas en medio control (C) o con β -naftoflavona sola (10 μ M, bNF) o en combinación con α -naftoflavona (1 μ M, bNF+aNF), o en medio con FSH y estradiol (2 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente) en ausencia (F+E) o en presencia de β -naftoflavona 10 μ M agregada sola (F+E+bNF) o en combinación con 1 μ M α -naftoflavona (F+E+bNF+aNF). Luego de 40 h se levantaron las células y se realizó *Western Blot* para el AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de seis experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.001$). Debajo del gráfico de barras se muestra un *Western Blot* representativo. Calle 1: Medio control; Calle 2: bNF; Calle 3: bNF+aNF; Calle 4: FSH+E₂; calle 5: FSH+E₂+bNF; Calle 6: FSH+E₂+bNF+aNF.

4.3.5. Regulación de los niveles del ARNm de *Ahr* por β -naftoflavona

Como se describiera en la introducción de esta sección, en aquellos sistemas donde el agonista del AHR TCDD produce una depleción en los niveles de expresión del receptor no se observa concomitantemente una disminución en los transcritos del receptor que explique el efecto inhibitorio. Se propuso como objetivo por lo tanto determinar en nuestro sistema si la depleción en la expresión del AHR observada luego del tratamiento con el agonista β -naftoflavona es debida, al menos en parte, a una disminución en los niveles de ARNm para el receptor.

Con tal fin, se cuantificaron los niveles relativos de estos transcritos en células de la granulosa control o tratadas con β -naftoflavona, tanto en condiciones de ausencia o de presencia de las hormonas FSH y estradiol. Este estudio se realizó luego de tiempos cortos de incubación con el agonista y luego de tiempos prolongados.

Al tratar las células de la granulosa en cultivo con el agonista del AHR β -naftoflavona durante 4 h no se observó efecto alguno de este ligando sobre los niveles de ARNm para este receptor. Esta ausencia de acción se verificó tanto para las condiciones de cultivo control como para los cultivos donde se estimuló concomitantemente con FSH y estradiol (Figura 4.8). Los mismos resultados se obtuvieron luego de 6 ó 24 h de estimulación.

La evaluación del posible efecto del agonista β -naftoflavona sobre los niveles de ARNm para el *Ahr* en células de la granulosa fue realizada a su vez luego de 48 h de estimulación con los distintos compuestos. El tratamiento con β -naftoflavona mostró ser capaz de inducir un aumento en los niveles del ARNm para el *Ahr* en células cultivadas en medio control, produciendo una estimulación del 75% (Figura 4.9). Esta acción estimuladora de β -naftoflavona se verificó a su vez cuando las células fueron cultivadas en presencia de FSH y estradiol. En este caso, el agonista indujo un aumento superior al 60% en la expresión de los transcritos para el *Ahr* al compararse con los cultivos tratados solo con las hormonas (Figura 4.9).

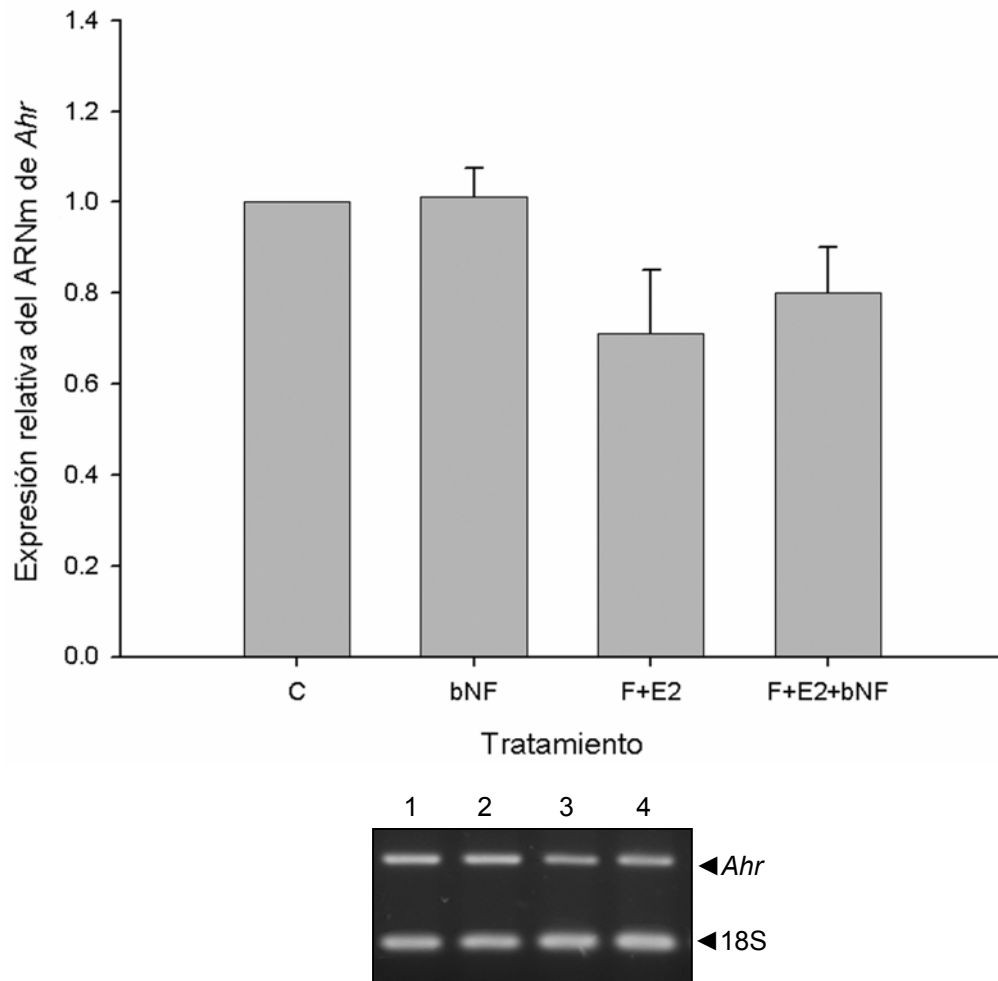


Figura 4.8. Efecto de β -naftoflavona sobre los niveles de transcriptos para *Ahr* a las 4 h de estimulación. Las células de la granulosa fueron cultivadas en medio control en ausencia (C) o en presencia de 10 μ M β -naftoflavona (bNF), o en medio conteniendo FSH y estradiol (2 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente) agregados solos (F+E2) o junto con β -naftoflavona 10 μ M (F+E2+bNF). A las 4 h de estimulación se levantaron las células, se extrajo ARN total y se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para el *Ahr* como se describe en Materiales y Métodos. Las señales para el *Ahr* fueron cuantificadas y los valores resultantes fueron relativizados a la señal del control interno (18S), expresándose como unidades relativas al control, fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos ($P > 0.05$). Debajo del gráfico de barras se muestra una separación electroforética representativa de los productos de RT-PCR semi-cuantitativa. Calle 1: C; calle 2: bNF; calle 3: FSH+E2; calle 4: FSH+E2+bNF.

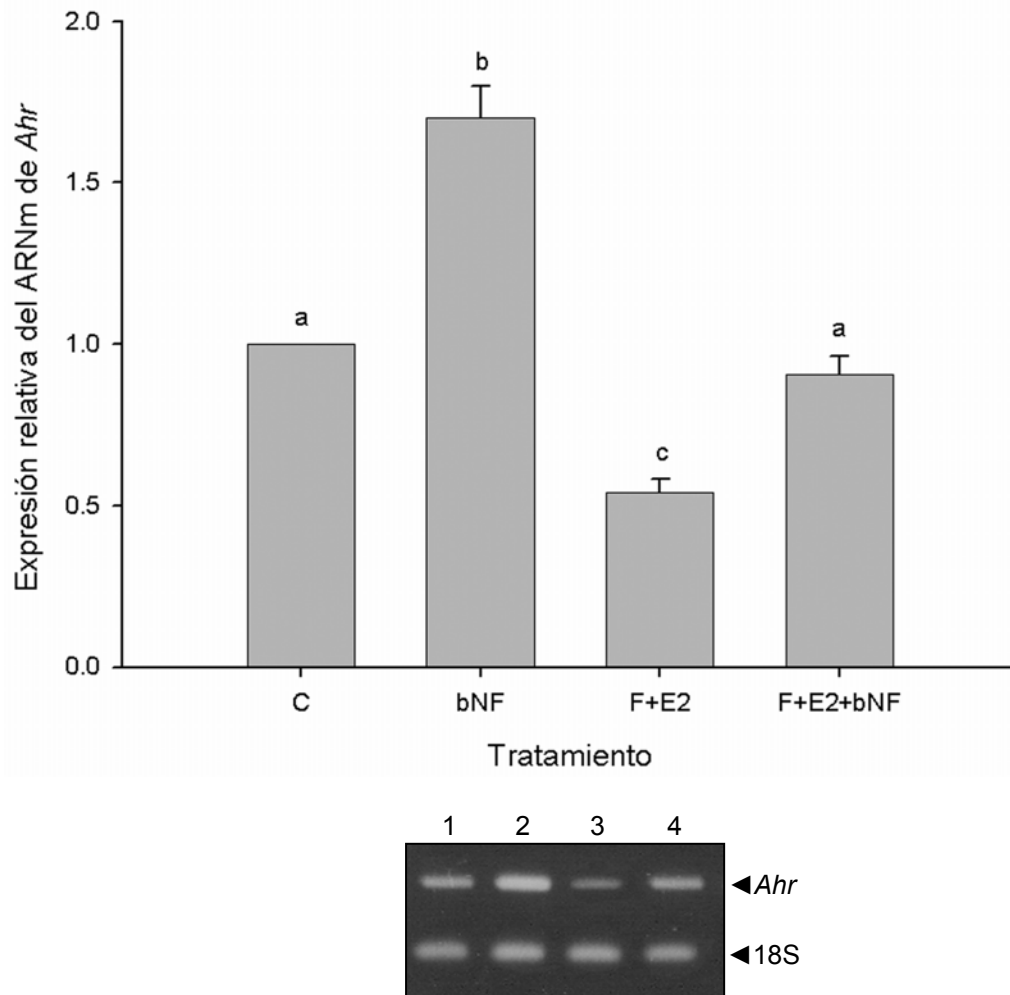


Figura 4.9. Efecto de β -naftoflavona sobre los niveles de transcriptos para *Ahr* a las 48 h de estimulación. Las células de la granulosa fueron cultivadas en medio control en ausencia (C) o en presencia de 10 μ M β -naftoflavona (bNF), o en medio conteniendo FSH y estradiol (2 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente) agregados solos (F+E2) o junto con β -naftoflavona 10 μ M (F+E2+bNF). A las 48 h de incubación se levantaron las células, se extrajo ARN total y se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para el *Ahr* como se describe en Materiales y Métodos. Las señales para el *Ahr* fueron cuantificadas y los valores resultantes fueron relativizados a la señal del control interno (18S), expresándose como unidades relativas al control, fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$, excepto a vs. c, $P < 0.05$; b vs. c, $P < 0.001$). Debajo del gráfico de barras se muestra una separación electroforética representativa de los productos de RT-PCR semi-cuantitativa. Calle 1: C; calle 2: bNF; calle 3: FSH+E2; calle 4: FSH+E2+bNF.

4.3.6. Recuperación de los niveles de expresión de proteína AHR

Con el objeto de verificar la recuperación de los niveles de proteína AHR luego de la exposición a sus ligandos, se decidió determinar los niveles de expresión del receptor en cultivos estimulados durante 4 h con β -naftoflavona, lavados luego del compuesto, e incubados seguidamente en medio libre de estímulo.

Como se muestra en la Figura 4.10, a las 50 h de incubación comienza a evidenciarse una tendencia a la recuperación en los niveles de expresión del AHR en células de la granulosa estimuladas durante las primeras 4 h con el agonista. Si bien el recobro es modesto, representa un incremento de alrededor del 300% al compararse con los cultivos incubados las 50 h con el agonista.

Se decidió determinar si la recuperación es capaz de alcanzar magnitudes mayores utilizando concentraciones menores del agonista en la estimulación inicial. Al tratar las células con β -naftoflavona 1 μ M durante 4 h (dosis a la que se sabe que funciona como agonista, en tanto es capaz de inducir los transcritos para *Cyp1a1*) y continuar luego la incubación en medio libre del compuesto durante las 46 h restantes, se observó una mayor recuperación, aunque aún parcial, en los niveles de proteína AHR total (Figura 4.11). En estos cultivos se verificó una reducción en los niveles de expresión de AHR del 60% en comparación con las células control, mientras que en las células incubadas en presencia de β -naftoflavona en el medio durante las 50 h la inhibición fue de alrededor del 95%. Es decir, pudo observarse una recuperación cercana al 35% en la depleción de AHR causada por β -naftoflavona.

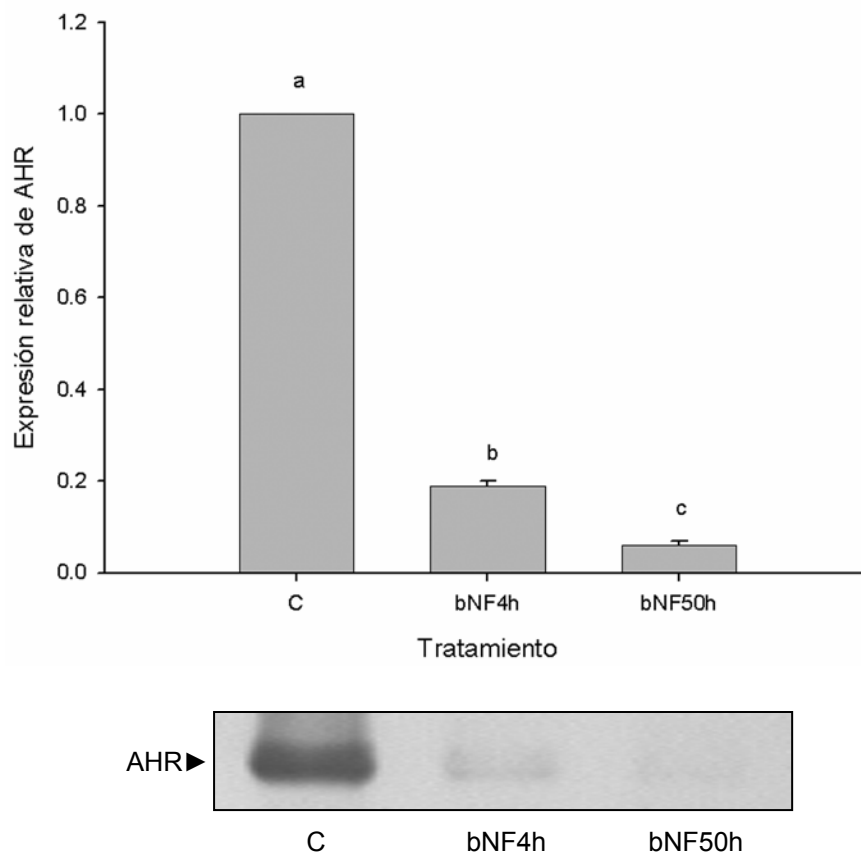


Figura 4.10. *Recuperación parcial de la proteína AHR a las 50 h de incubación luego de estimulación con β -naftoflavona 10 μ M.* Las células de la granulosa fueron cultivadas en medio control (C) o estimuladas con 10 μ M β -naftoflavona durante 4 h (bNF4h) o durante 50 h (bNF50h). Luego de 50 h de incubación se levantaron las células y se realizó *Western Blot* para el AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.001$; excepto para b vs. c, donde $P < 0.01$). Debajo del gráfico de barras se muestra un *Western Blot* representativo.

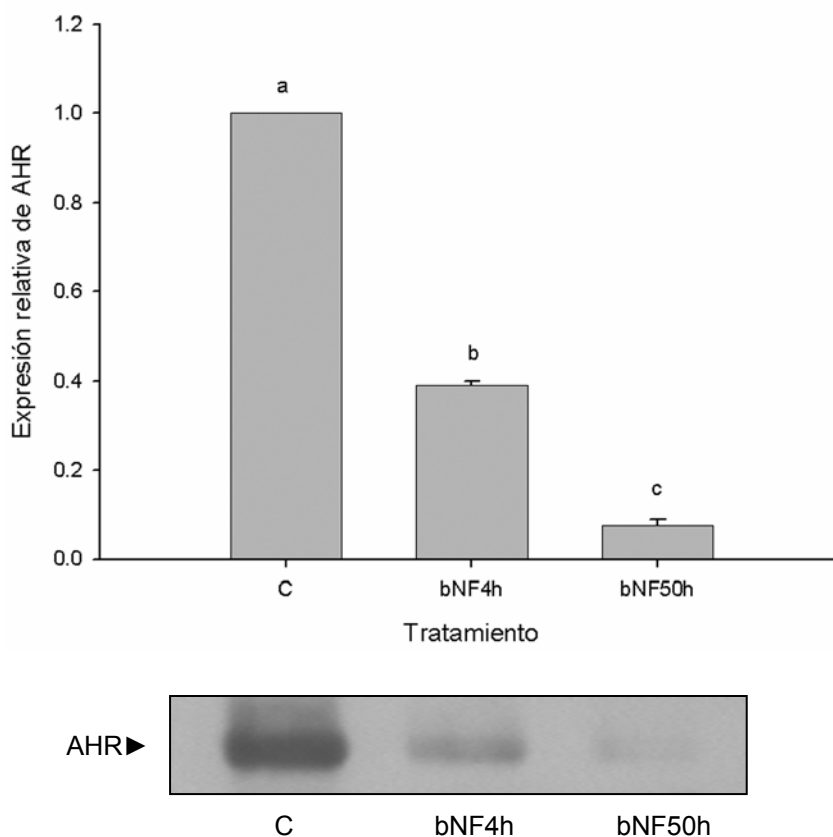


Figura 4.11. *Recuperación parcial de la proteína AHR a las 50 h de incubación luego de estimulación con β -naftoflavona 1 μ M.* Las células de la granulosa fueron cultivadas en medio control (C) o estimuladas con 1 μ M β -naftoflavona durante 4 h (bNF4h) o durante 50 h (bNF50h). Luego de 50 h de incubación se levantaron las células y se realizó *Western Blot* para el AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.001$). Debajo del gráfico de barras se muestra un *Western Blot* representativo.

4.3.7. Participación de la degradación proteasomal en la regulación de la proteína AHR por β -naftoflavona

Como se mencionó anteriormente, varias evidencias indican que la regulación negativa del AHR que se ha observado en diversos sistemas luego de la exposición con ligandos es debida a degradación mediada por el proteasoma 26S. Por otro lado, los resultados presentados anteriormente indican que la disminución de la proteína del receptor inducida por β -naftoflavona en nuestro sistema no puede ser explicada por una reducción en los niveles de los respectivos mensajeros. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió establecer seguidamente si la degradación proteasomal es también el mecanismo responsable de la reducción en la proteína AHR observada luego del tratamiento con β -naftoflavona en nuestro sistema de estudio.

Con ese objetivo, se determinaron los niveles totales de proteína AHR en cultivos de células de la granulosa estimulados con el agonista en presencia del inhibidor del proteasoma 26S lactacistina. Como puede observarse en la Figura 4.12, el co-tratamiento con lactacistina abolió totalmente la reducción en los niveles de proteína inducida por β -naftoflavona luego de 4 h de estimulación. Es decir, el agonista no es capaz de disminuir los niveles de proteína AHR cuando se bloquea la actividad proteasomal.

Cuando los cultivos se incubaron con los distintos compuestos durante 24 h, el inhibidor de proteasoma revirtió parcialmente el efecto del agonista del AHR sobre la expresión de su propio receptor, induciendo β -naftoflavona en este caso sólo un 50% de la reducción que provoca en ausencia de lactacistina (Figura 4.13). Cuando se analizó el efecto de lactacistina a las 24 h de incubación en condiciones control, se observó que el solo agregado del inhibidor produjo un aumento en los niveles de proteína AHR total comparados con los niveles alcanzados por las células control (Figura 4.13).

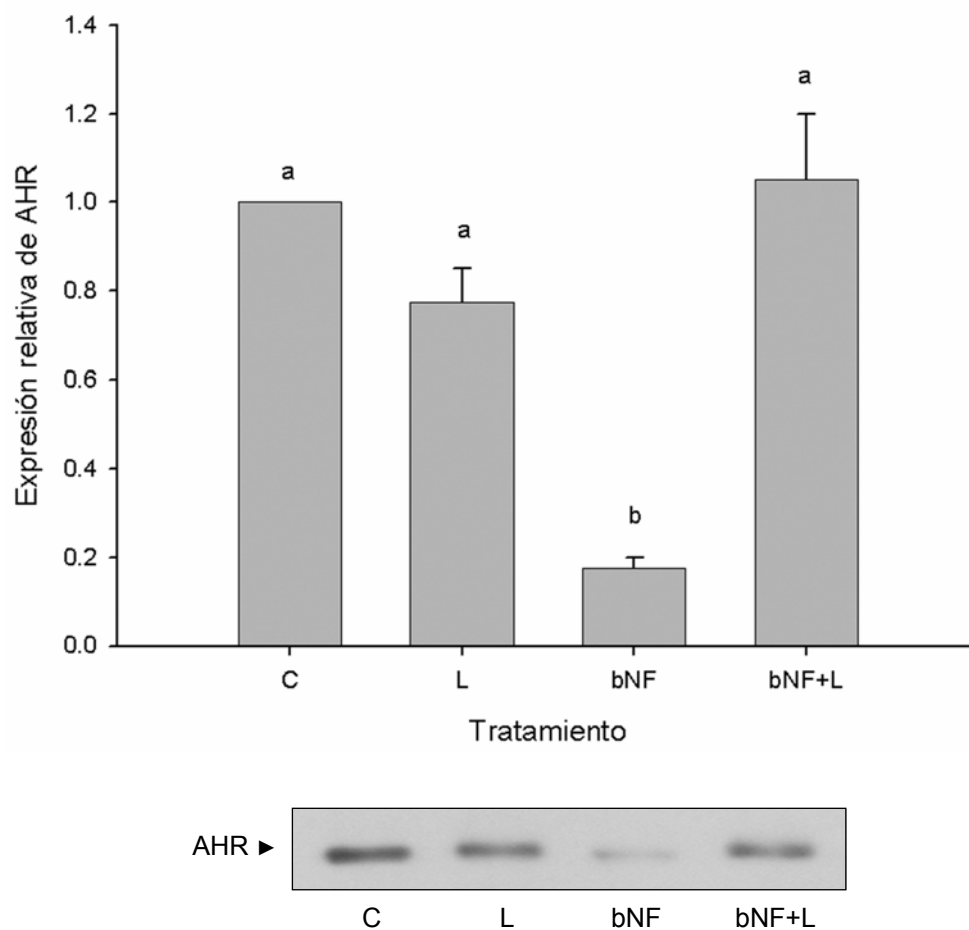


Figura 4.12. Efecto de la inhibición proteasomal sobre la regulación negativa ejercida por β -naftoflavona sobre la expresión de su receptor a las 4 h de incubación. Se cultivaron las células de la granulosa en medio control (C) con lactacistina (20 μ M, L) o con 10 μ M β -naftoflavona agregada sola (bNF), o en presencia de 20 μ M lactacistina (bNF+L). Luego de 4 h de incubación, las células fueron lisadas, se aislaron las proteínas totales y se realizó *Western Blot* para AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$, excepto para L vs. bNF, donde $P < 0.05$). Debajo del gráfico de barras se muestra un *Western Blot* de AHR representativo.

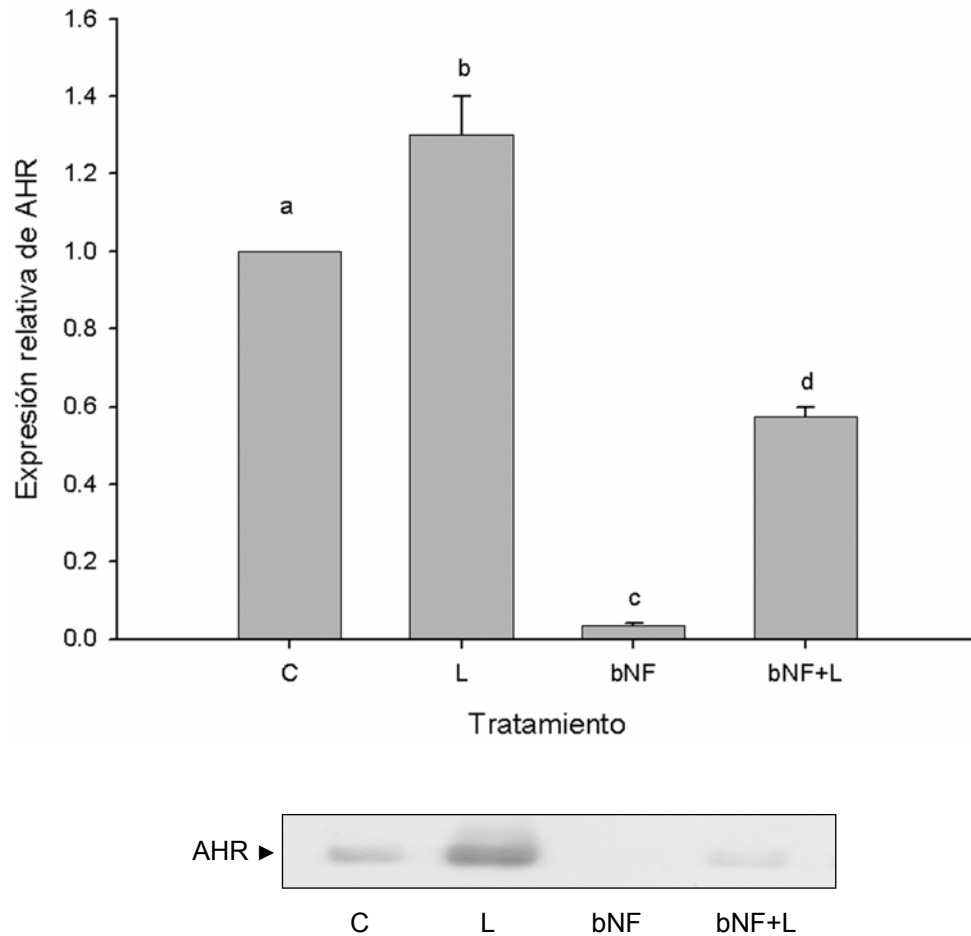


Figura 4.13. Efecto de la inhibición proteasomal sobre la regulación negativa ejercida por β -naftoflavona sobre la expresión de su receptor a las 24 h de incubación. Se cultivaron las células de la granulosa en medio control (C) con lactacistina (20 μ M, L) o con 10 μ M β -naftoflavona agregada sola (bNF), o en presencia de 20 μ M lactacistina (bNF+L). Luego de 24 h de incubación, las células fueron lisadas, se aislaron las proteínas totales y se realizó *Western Blot* para AHR como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de expresión de proteína AHR (normalizados por el control interno) se expresan relativos a los de las células control, valor que fue fijado arbitrariamente en 1. Las barras representan las medias \pm ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.01$, excepto para a vs. b y a vs. b, donde $P < 0.05$ y b vs. c, donde $P < 0.001$). Debajo del gráfico de barras se muestra un *Western Blot* de AHR representativo.

4.3.8. Efecto de la degradación proteasomal del AHR sobre la respuesta mediada por el receptor

El hecho de que el agonista del AHR β -naftoflavona induzca tanto la activación del receptor como su propia degradación en células de la granulosa podría indicar que la regulación negativa de la expresión del AHR jugaría un rol en la atenuación de la respuesta de regulación génica inducida por el agonista. Así, este mecanismo controlaría la actividad del AHR activado por su ligando en el núcleo de las células.

Con el objetivo de verificar la validez de este modelo en nuestro sistema de estudio, se analizó el efecto del inhibidor del proteasoma 26S en la inducción de la expresión del gen endógeno *Cyp1a1*, una respuesta transcripcional mediada por el AHR muy bien caracterizada y usada extensivamente para determinar la activación de la vía de señalización mediada por el AHR (Hahn, 1998; Whitlock, 1999; Gu, 2000; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005).

Como puede observarse en la Figura 4.14, mientras que β -naftoflavona induce los niveles de ARNm de *Cyp1a1* alrededor de 4,5 veces, el co-tratamiento con el agonista del AHR y lactacistina produjo una inducción casi 4 veces más alta, según se determinó por RT-PCR semi-cuantitativa. Es decir, las células expuestas al agonista y a lactacistina mostraron niveles de ARNm para *Cyp1a1* 4 veces superiores a los que presentaron las células tratadas con el agonista en las cuales la degradación proteasomal del AHR no había sido bloqueada. Por otro lado, el agregado de lactacistina como único estímulo provocó un aumento en los niveles de *Cyp1a1* de alrededor de 2,5 veces con respecto a las células control tratadas sólo con vehículo (Figura 4.14).

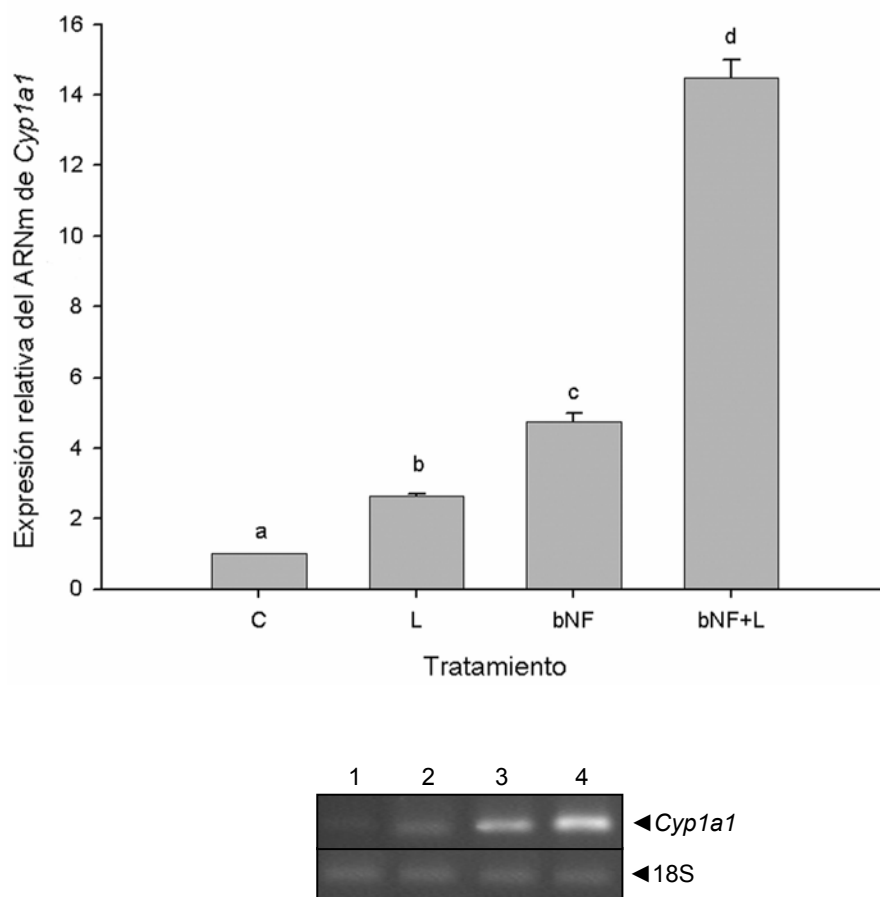


Figura 4.14. Efecto de la inhibición de la degradación proteasomal sobre la respuesta mediada por el AHR. Se cultivaron las células de la granulosa durante 24 h en medio control (C), con el inhibidor de proteasoma lactacistina (20 μ M, L), o con 10 μ M β -naftoflavona agregada sola (bNF) o junto con 20 μ M lactacistina (bNF+L). Se aisló el ARN total y se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para *Cyp1a1* como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de cada ARNm se normalizó a la señal del 18S ribosomal para cada muestra, y los valores (relativos a las células control, cuyos valores fueron fijados en 1) se graficaron como la media \pm ES de tres experimentos independientes. Letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0.001$, excepto a vs. b y b vs. c, donde $P < 0.05$ y a vs. c, donde $P < 0.01$). Debajo del gráfico de barras se muestra una separación electroforética representativa de los productos de RT-PCR semi-cuantitativa. Calle 1: C; calle 2: L; calle 3: bNF; calle 4: bNF+L.

4.3.9. Efecto de la remoción de β -naftoflavona en las respuestas mediadas por el AHR

Los resultados obtenidos sobre la regulación que el agonista del AHR ejerce sobre la expresión del propio receptor muestran que éste provoca una rápida y dramática reducción en los niveles de proteína. Sin embargo, los efectos de la activación del receptor pueden observarse a tiempos largos. Por ejemplo, la inducción de los mensajeros para *Cyp1a1* se observa a las 24 h de estimulación con β -naftoflavona, y el sinergismo de este agonista con FSH y estradiol en la respuesta proliferativa de células de la granulosa se verifica a las 48 h de estimulación, siendo éstas dos respuestas que involucran procesos claramente diferentes.

Lo anteriormente expuesto significaría que durante las primeras cuatro horas, o quizás aún antes, se producen las interacciones del receptor necesarias como para desencadenar una respuesta que se observará posteriormente. Para hallar evidencias que puedan refutar o apoyar esta hipótesis, se decidió determinar la capacidad de β -naftoflavona de inducir los transcritos para *Cyp1a1* y de sinergizar con FSH y estradiol en la proliferación de células de la granulosa siendo removida del medio de cultivo luego de 4 h de estimulación y continuando luego con la incubación en ausencia de ella. Este abordaje podrá indicar si esos tiempos comparativamente cortos son suficientes para desencadenar la activación del AHR y las respuestas por él mediadas.

Los resultados presentados en la Figura 4.15 muestran que la inducción de los mensajeros para *Cyp1a1* observados a las 24 h de incubación puede alcanzarse con solo 4 h iniciales de estimulación con β -naftoflavona en el medio de cultivo.

De forma similar, la acción co-mitogénica ejercida por β -naftoflavona en combinación con FSH y estradiol que se manifiesta en células de la granulosa a las 48 h de cultivo se verifica también cuando dicho agonista del AHR se encuentra presente en el medio de cultivo sólo durante las primeras 4 h de incubación. Estos resultados se muestran en la Figura 4.16.

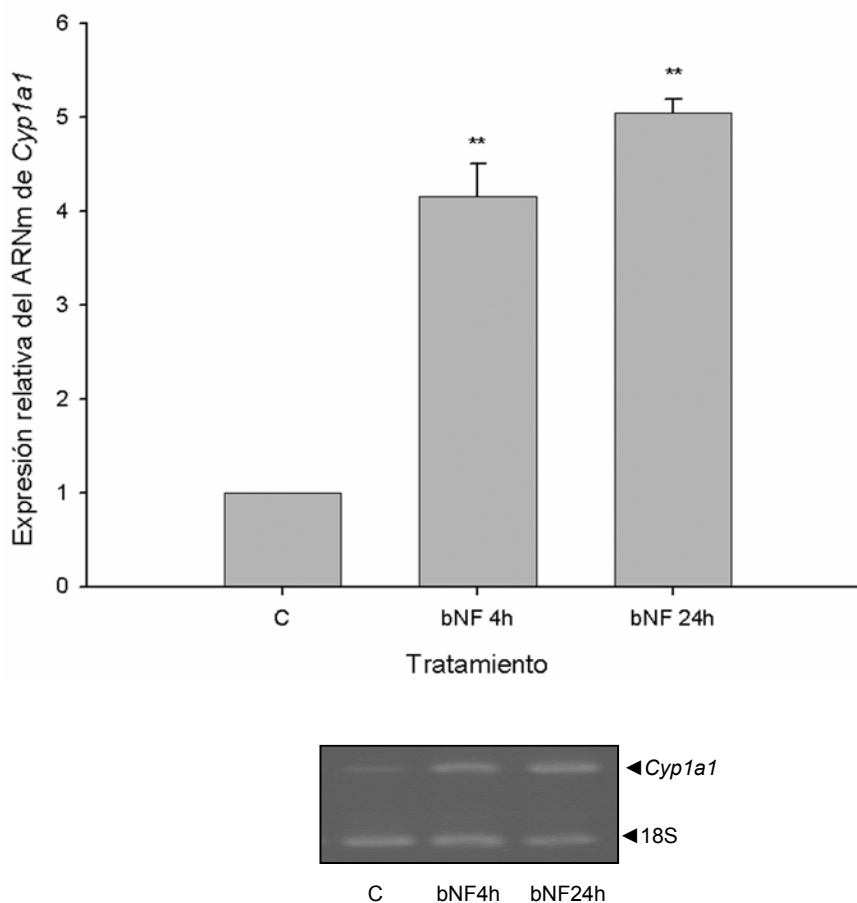


Figura 4.15. Efecto de 4h de estimulación con β -naftoflavona sobre los transcritos para *Cyp1a1*. Se cultivaron las células de la granulosa en medio control (C) o se estimularon con 10 μ M β -naftoflavona durante 4h (bNF4h) o 24 h (bNF24h). A las 24 h de incubación se levantaron las células, se aisló el ARN total y se realizó RT-PCR semi-cuantitativa para *Cyp1a1* como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de cada ARNm se normalizó a la señal del 18S ribosomal para cada muestra, y los valores (relativos a las células control, cuyos valores fueron fijados en 1) se graficaron como la media \pm ES de tres experimentos independientes. Asteriscos denotan diferencias significativas en comparación con el control ($P < 0.01$). Debajo del gráfico de barras se muestra una separación electroforética representativa de los productos de RT-PCR semi-cuantitativa.

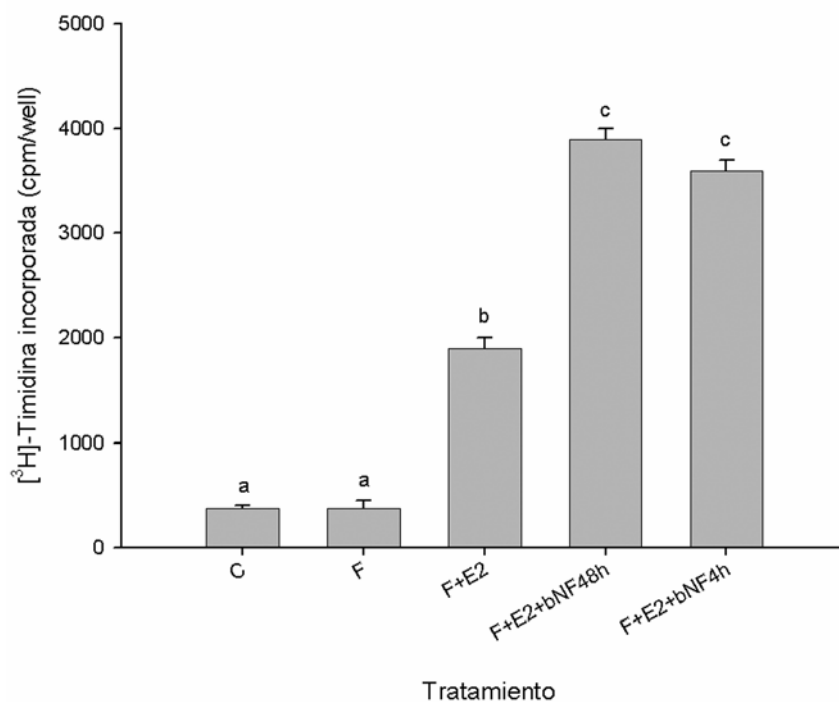


Figura 4.16. Efecto de 4 h de estimulación con β -naftoflavona sobre la proliferación inducida por FSH y estradiol. Se cultivaron las células de la granulosa en medio control (C), con FSH (2 ng/ml, F), o con FSH y estradiol (100 ng/ml) en ausencia (F+E2) o presencia de 10 μ M β -naftoflavona agregada durante 48 h (F+E2+bNF48h) o solo durante las primeras 4 h de incubación (F+E2+bNF4h). La incorporación de [³H]-Timidina se realizó durante 24 h, comenzando 24 h luego de la estimulación. Los resultados muestran las medias \pm ES de tres experimentos independientes, cada uno realizado por cuadruplicado. Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$).

4.4. *Discusión*

Si bien la información relacionada con la regulación de la expresión del AHR posee una importancia crucial para la comprensión de su función, actualmente se cuenta con datos limitados en esta área de investigación.

Los reportes existentes señalan la presencia de moduladores endógenos del AHR y apoyan la idea de una regulación endócrina del receptor. Este escenario, junto con el interés en las posibles interacciones entre las señales mediadas por el AHR y por las demás vías que regulan la función de las células de la granulosa, ha impulsado el presente estudio del efecto de las clásicas hormonas FSH y estradiol sobre la expresión del AHR en células de la granulosa aisladas de ratas hembras inmaduras. El hecho de que estos animales no se encuentren aún ciclando permite manipular experimentalmente los estrógenos y gonadotrofinas, lo cual convierte a este modelo en un sistema ideal para nuestro estudio

En esta sección del trabajo se ha hallado que FSH y estradiol, estímulos claves para la función de las células de la granulosa y para el desarrollo folicular, inducen una disminución en la expresión de la proteína AHR. Este efecto inhibitorio no se verifica a las 6 h de estimulación, pero está presente luego de 12 h, tiempo en el que es modesto pero estadísticamente significativo. Esta acción aumenta luego en magnitud en una forma dependiente del tiempo.

A las 24 ó 36-48 h de estimulación con las distintas hormonas o con una combinación de ambas, la disminución en la expresión de proteína AHR puede atribuirse, al menos en parte, a una reducción en los niveles de transcritos para *Ahr* (debido a inhibición en la transcripción del gen *Ahr* o a una estabilidad reducida del ARNm). En cambio, el estradiol agregado solo no tuvo efecto sobre los niveles estacionarios de ARNm para *Ahr* a las 12 h de estimulación. Esto concuerda con lo hallado en el hígado de rata, donde la administración del estrógeno *in vivo* no altera los niveles hepáticos de ARNm para el receptor a esos tiempos, a pesar de observarse una marcada caída en estos transcritos durante la tarde del proestro (Chaffin *et al.*, 2000). Los resultados de los experimentos donde se utilizó lactacistina indican que la reducción en los niveles de proteína AHR inducida por el tratamiento con estradiol durante 12 h podría ser atribuible a degradación proteasomal gatillada por el estrógeno. Este hallazgo parece contrastar con reportes realizados en células MCF-7, donde el estradiol no afecta la expresión del AHR, mientras que TCDD induce degradación proteasomal del receptor de estrógeno- α (Wormke *et al.*, 2000). Una posible explicación para estos resultados aparentemente opuestos es que en el estudio mencionado la estimulación con estradiol fue realizada durante 3 h, tiempo al cual

tampoco hubo evidencia de degradación en nuestro sistema. Por lo tanto, la degradación proteasomal inducida por estradiol sería un fenómeno que no ocurre en forma rápida. Por otro lado, no puede descartarse que existan diferencias entre las acciones del estradiol al ser mediadas por el receptor de estrógeno β (mayoritario en células de la granulosa) o por el receptor de estrógeno- α .

Los resultados presentados aquí sugieren que la disminución en los transcritos del *Ahr* observada en tejido ovárico durante la tarde del proestro (Chaffin *et al.*, 2000) podría atribuirse a acciones desencadenadas por FSH. Este efecto inhibitorio inducido por FSH en nuestro sistema concuerda con efectos descritos en túbulos seminíferos de testículos de ratas, donde la gonadotropina revierte la regulación positiva de la expresión del receptor provocada por el cultivo en ausencia de suero (Schultz *et al.*, 2003).

Por lo tanto, el presente estudio sobre la regulación hormonal de la expresión del AHR indica que FSH y estradiol son capaces de modular la expresión del receptor en una forma que refleja los cambios observados en el ovario a lo largo del ciclo estral de la rata. Sería por consiguiente razonable especular que estas hormonas podrían ser los moduladores endógenos fisiológicos del AHR responsables de los cambios observados *in vivo*. Sin embargo, no se puede descartar acciones reguladoras de factores de crecimiento ováricos producidos localmente, progestinas, glucocorticoides o cualquier otro factor cuyos niveles cambien a lo largo del ciclo reproductivo. De cualquier modo, nuestro estudio indica que FSH y estradiol, ya sea a través de acciones directas o indirectas, podrían ser importantes reguladores de la expresión, y por lo tanto de la función, del AHR en el ovario. Podría hipotetizarse que la atenuación de la expresión del AHR ejercida por las hormonas podría tener la función de contrarrestar los bien establecidos efectos antiestrogénicos y endócrino-disruptivos que posee la activación del AHR en el ovario. Sin embargo, diversos estudios muestran que el AHR juega un importante rol en la fisiología ovárica (Pocar *et al.*, 2005; Baba *et al.*, 2005) y se han descrito además, como en este trabajo, diversas interacciones positivas entre el AHR y el receptor de estrógenos que modulan las respuestas celulares en el tracto reproductivo femenino (Pocar *et al.*, 2005). Por lo tanto, el AHR parecería deberse expresar en los tiempos y tipos celulares apropiados durante el desarrollo folicular de manera de permitir una interrelación coordinada entre las distintas vías de señalización que regulan la función ovárica.

La compleja relación existente entre los niveles de expresión del AHR y las respuestas biológicas mediadas por éste permanece sin dilucidarse completamente en la mayoría de los sistemas. La modelación teórica de las relaciones entre el receptor y la respuesta apoyan la hipótesis de que las alteraciones en los niveles de AHR influyen la respuesta final que ejercen ligandos de este receptor por medio de la modificación de las relaciones entre la respuesta y la dosis (Ruffolo, 1982; Kenakin, 1997).

Actualmente se acepta que en diversos sistemas, tanto *in vivo* como *in vitro*, los niveles de la proteína AHR son rápidamente depletados luego de la activación por agonistas debido a degradación proteolítica. Se ha observado regulación negativa del AHR en varias líneas celulares derivadas de tejidos humanos y de roedores y en modelos de roedores expuestos *in vivo* a la dioxina TCDD (revisado en Pollenz, 2002). Sin embargo, y como se mencionó en la introducción, existen diversos trabajos que reportan que el tratamiento con agonistas del AHR regula positivamente los niveles de expresión de este receptor, tanto a nivel de su proteína como de sus transcritos. Es por todo lo hasta aquí expuesto que se decidió establecer el posible tipo de modulación que puedan ejercer los agonistas del AHR sobre su propio receptor en el presente sistema de estudio.

Con el objetivo de determinar la consecuencia del tratamiento con agonistas del AHR sobre la expresión del receptor en células de la granulosa de rata, se ensayó el efecto de β -naftoflavona en el modelo utilizado en este estudio. Se comprobó que la proteína AHR es rápidamente reducida en estas células luego del tratamiento con el agonista, tanto cuando éste es agregado en condiciones control, como cuando se agrega en combinación con FSH y estradiol. Fue de especial interés evaluar el efecto del agonista en presencia de las hormonas, ya que éstas están presentes en el entorno de las células de la granulosa *in vivo* y podrían haber modulado la regulación de la expresión del AHR ejercida por los ligandos.

Con el fin de establecer la duración de la depleción del contenido celular de AHR inducida por el tratamiento con β -naftoflavona, se repitieron los ensayos realizados anteriormente extendiendo los tiempos de tratamiento hasta las 40 h. Se pudo observar que la reducción en la expresión de la proteína AHR causada por el ligando es sostenida, manteniéndose incluso luego de 40 h de incubación con la flavona. Interesantemente, la inhibición a este tiempo de estimulación es mayor que la obtenida luego de sólo 6 h desde el agregado del ligando, no encontrándose casi proteína inmunodetectable en las células tratadas con β -naftoflavona. Estos resultados se verificaron tanto para células control, como para los cultivos mantenidos en presencia de FSH y estradiol.

Este efecto sostenido concuerda con el hallado para otros ligandos del AHR en distintos sistemas. Por ejemplo, la regulación negativa en la expresión de la proteína para este receptor que ejerce TCDD en células endoteliales vasculares cerebrales y astrocitos murinos aislados, o en líneas celulares de hepatoma, se evidencia ya a las 4 h de estimulación y se mantiene aún a las 48 ó 72 h luego de agregado el agonista (Filbrandt *et al.*, 2004; Giannone *et al.*, 1998). También se ha reportado que en baso, pulmón y timo de ratas la concentración de proteína AHR se mantiene reducida durante 168 h posteriores a la administración *in vivo* de TCDD, retornando a los niveles control sólo a las 336 h (Pollenz *et al.*, 1998). Estos estudios podrían indicar que el mecanismo de recuperación de la proteína AHR es lento. Alternativamente, estos resultados pueden estar reflejando simplemente una alta estabilidad del ligando a lo largo del tiempo. Es decir, por la naturaleza o las dosis utilizadas, el ligando permanece a esos puntos de tiempo en el medio de cultivo, en la célula o en el tejido u órgano, no siendo degradado o metabolizado, por lo cual continúa ejerciendo su efecto regulador e impidiendo que el mecanismo de recuperación tenga lugar. De hecho, se ha reportado que el tratamiento con 3-metilcolantreno, ligando que presenta un grado de metabolismo mayor que la dioxina, produce una depleción de los niveles de AHR que es máxima a las 24 h, comenzándose a recuperar la proteína a partir de ese punto y alcanzando valores similares a los hallados en los controles a las 48 h de estimulación. Coherentemente, en el estudio aquí presentado la remoción del agonista del medio de cultivo provoca una recuperación parcial en los niveles de proteína AHR en comparación con las células tratadas solo con vehículo. Si bien el recobro es modesto al compararse con las células nunca expuestas al agonistas, representa un aumento de alrededor de 3 veces en comparación con las células tratadas durante toda la incubación con el compuesto. Al utilizar dosis del agonista inferiores, la recuperación toma valores mayores, incrementos superiores al 500%, aunque sigue siendo parcial. La no totalidad de la recuperación puede deberse a distintos factores, como la acumulación del ligando dentro de la célula (cuya presencia no puede descartarse con el protocolo de remoción utilizado) o la necesidad de tiempos mayores a 50 h para que la recuperación se complete.

Con el fin de investigar si el efecto inhibitorio del agonista del AHR sobre la expresión del receptor está mediado, al menos en parte, por la activación y transformación del AHR, se decidió ensayar el efecto del agregado conjunto de β -naftoflavona y el antagonista del receptor α -naftoflavona (dosis de 1 μ M). Resultó interesante la observación de que el tratamiento conjunto con el antagonista fue incapaz de revertir el efecto inducido por el agonista β -naftoflavona, en todas las condiciones ensayadas. Se ha demostrado que el antagonismo que ejercen las flavonas se debe a que son capaces de unirse

competitivamente al AHR (desplazando al agonista) pero inhiben la translocación nuclear, transformación y subsiguiente función del receptor como factor de transcripción (Henry *et al.*, 1999). Por lo tanto, los resultados presentados sugieren que el efecto de depleción de la proteína AHR que ejerce β -naftoflavona no se debería, al menos exclusivamente, a un efecto mediado por la activación del receptor ejercida por agonistas y su translocación al núcleo, si no que puede verificarse también luego de la mera unión de un ligando. Se decidió entonces evaluar el efecto del agregado de α -naftoflavona sola (a dosis a las que actúa como antagonista) sobre el contenido celular de AHR. Se halló que este antagonista es también capaz de inducir una marcada reducción en la expresión de la proteína AHR, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el efecto del antagonista y el efecto del agonista β -naftoflavona o α -naftoflavona a dosis de 10 μ M (dosis a las que actúa como agonista del AHR a nivel transcripcional). El análisis de estos resultados sugiere que no es indispensable que el AHR se transloque al núcleo y se una al ADN para que su expresión sea regulada negativamente luego del tratamiento con ligandos.

Con el objetivo de evaluar si la inhibición de la expresión del AHR ejercida por el ligando se verifica a nivel de sus transcritos, se ensayó el efecto del tratamiento con β -naftoflavona sobre los niveles de mensajeros para el receptor. Como se esperaba dado todo lo anteriormente expuesto, β -naftoflavona no redujo los niveles de estos transcritos, no ejerciendo además ningún tipo de modulación a las 4 h de estimulación, ni en condiciones control ni en cultivos tratados simultáneamente con FSH y estradiol. Sin embargo, al evaluar este parámetro 48 h luego de la estimulación con el agonista, se halló que éste es capaz de inducir un aumento en los niveles de transcritos para el *Ahr*, tanto en condiciones control como en presencia de FSH y estradiol. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la reducción del AHR observada a nivel de su proteína al tratar las células de la granulosa con β -naftoflavona no puede atribuirse a una disminución en los niveles del ARNm que codifica para el receptor. Más aún, los datos obtenidos muestran que el agonista del AHR además de regular negativamente la proteína del receptor en forma rápida, induce a la vez un aumento en los niveles de sus transcritos a tiempos más prolongados.

En cuanto al mecanismo por el cual el agonista del AHR reduce casi por completo los niveles de expresión de su receptor, los resultados aquí presentados indican que es a través de degradación proteolítica. Se puede inferir que esta degradación es mediada por la vía del proteasoma 26S, ya que la acción de los ligandos fue totalmente abolida por el tratamiento concomitante con un inhibidor específico del proteasoma durante 4h y parcialmente revertida cuando se extendió la exposición hasta 24 h. Esta última observación puede deberse a degradación de la lactacistina en el medio de cultivo luego de largos

períodos de tiempo, o a una degradación proteasomal del receptor excesiva que no puede ser contrarrestada por las dosis de inhibidor utilizadas en los ensayos. Por otro lado, los datos arrojados por los experimentos realizados con el antagonista del AHR α -naftoflavona brindan evidencia que apoya la idea de que la maquinaria proteolítica presente en el compartimiento citoplasmático sería suficiente para degradar al receptor (Song y Pollenz, 2003). Se ha demostrado que el simple tratamiento de distintas líneas celulares con geldanamincina, un compuesto que une proteínas como hsp90 impidiendo que éstas continúen formando parte del complejo con el receptor, reduce en forma similar los niveles celulares de proteína AHR (Chen *et al.*, 1997). Es decir, de alguna forma que aún queda por dilucidarse, el antagonista del AHR podría ser capaz de disociar al receptor de las proteínas acompañantes que lo protegen de la degradación proteasomal antes de su transporte al núcleo e inducir así su degradación sin ser necesario que el receptor se encuentre en su forma activa en el núcleo celular para que se produzca la degradación. No puede descartarse la existencia de dos mecanismos de degradación proteasomal del AHR en células de la granulosa, uno desencadenado por la unión de agonistas que requiere de la transformación, activación y actividad del receptor como factor de transcripción en el núcleo, y otro independiente de la activación del AHR que sería inducido por la unión de cualquier ligando y estaría relacionado simplemente con la disociación a proteínas chaperonas.

Cabe destacar la observación de que el agregado de lactacistina como único estímulo durante 24 h produce un aumento en los niveles de proteína AHR. Esto podría ser una evidencia de la presencia del ligando endógeno para este receptor en células de la granulosa, quien podría estar ejerciendo luego de ese período de tiempo una regulación negativa de la expresión del receptor similar a la descrita para β -naftoflavona. La naturaleza del ligando o las concentraciones en las que está presente explicarían las diferencias en magnitud y en tiempo entre el efecto desencadenado por éste y por la flavona.

Los presentes hallazgos sobre la degradación del AHR inducido por sus ligandos concuerda con observaciones realizadas en diversos sistemas luego de la exposición a distintos agonistas del receptor, donde la proteína es también rápidamente degradada por actividad proteasomal (Pollenz 2002; Wentworth *et al.*, 2004; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005). Sin embargo, y como se explicó anteriormente, se ha demostrado regulación positiva de la expresión de la proteína del receptor, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas diferencias pueden estar dadas por la naturaleza de los ligandos investigados, las dosis y tiempo de exposición utilizados en los distintos protocolos experimentales o por diferencias intrínsecas en los tipos celulares o especies estudiadas.

La degradación proteolítica de factores de transcripción es un mecanismo bien establecido en la regulación de distintas vías de transducción (revisado en Pahl y Baeuerle, 1996), habiéndose mostrado que éste está involucrado en sistemas de señalización tan divergentes como NF- κ B (Palombella *et al.*, 1994), señalización mediada por glucocorticoides (Hoeck *et al.*, 1989), p53 (Haupt *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998) y la proteína bHLH/PAS HIF-1 α (Pugh *et al.*, 1997; Salceda y Caro, 1997; Huang *et al.*, 1998). Se acepta que este mecanismo representa una forma efectiva de apagar o atenuar la respuesta biológica. El presente análisis de la inducción de los transcritos endógenos de *Cyp1a1* muestra que la inhibición del proteasoma intensifica la inducción de estos mensajeros por parte de β -naftoflavona. Esto estaría indicando que la degradación de la proteína AHR inducida por ligandos en células de la granulosa jugaría un rol en la regulación de la actividad del receptor en el núcleo, en tanto controlaría la cantidad de AHR activado por el agonista de manera que la transcripción de los genes blanco pueda mantenerse a un cierto nivel. En otros sistemas se ha demostrado que este fenómeno está también implicado en apagar la señal desencadenada por el agonista (Pollenz, 2002). Por lo tanto, el rol fisiológico de la degradación proteasomal en este contexto sería el de modular la regulación génica mediada por el AHR. Este mecanismo y la regulación de esta vía que se observa en las distintas especies son especialmente críticas con respecto a los compuestos aromáticos halogenados que no pueden ser metabolizados o eliminados del organismo.

Es interesante la observación de que la inhibición de la actividad del proteasoma en ausencia de ligandos exógenos del AHR induce los niveles de transcritos para *Cyp1a1*. Esto podría considerarse como evidencia de la presencia del ligando endógeno para el AHR en células de la granulosa, quien estaría manteniendo la actividad transcripcional del AHR a un nivel determinado a través de degradación inducida por el ligando.

En forma conjunta, los resultados aquí presentados indican que FSH y estradiol son moduladores claves de la expresión del AHR en células de la granulosa, sugiriendo que estas hormonas podrían ser importantes factores endógenos asociados al ciclo estral que regulan los niveles del receptor *in vivo*. Además, se demuestra que mientras el AHR es rápidamente degradado a través de la vía del proteasoma luego del tratamiento con un agonista, atenuando así la señal por él desencadenada, éste induce a la vez un aumento en los niveles de transcritos para el receptor a tiempos más prolongados, lo cual podría jugar un rol en la reposición de los niveles de receptor en la célula.

5. *Discusión general*

Durante muchos años, el AHR ha sido intensamente estudiado desde el punto de vista toxicológico y molecular, analizándose las conexiones entre los genes y los cambios en el control de la expresión génica que resulta de la exposición ambiental a sus ligandos. La mayor parte de la atención puesta en el AHR se había centrado en la naturaleza de sus ligandos y en el rol que juega su blanco mejor estudiado, la enzima CYP1A1, en las respuestas tóxicas y en activación de carcinógenos. Este comprensible sesgo resultó en que una cantidad desproporcionada de investigaciones se dirigieran hacia el estudio de las respuestas toxicológicas o adaptativas mediadas por el AHR y la elucidación de los mecanismos subyacentes. Sin embargo, en el último tiempo se han realizado numerosos estudios que exploran las funciones fisiológicas del receptor, generándose extensa información en este campo. Se ha hecho evidente que el AHR está también involucrado en cascadas moleculares que llevan a la regulación de procesos como la proliferación, la diferenciación o la apoptosis, con una importante implicancia en el desarrollo. Esto ha llevado a que actualmente se acepte que el AHR juega un importante rol en diversos procesos fisiológicos, postulándose que este receptor sería un componente clave en procesos como el desarrollo o funciones tales como la reproducción. Por lo tanto, ambas áreas en las que impacta el AHR son consideradas de gran interés en la actualidad.

En el presente trabajo, las acciones descritas para los ligandos del AHR pueden estar reflejando la función normal del AHR intensificada, pueden ser acciones específicas que los contaminantes ambientales y demás compuestos exógenos pueden ejercer a través del complejo xenobiótico-AHR (acciones no relacionadas con la función endógena del AHR), o puede representar una combinación de funciones endógenas y exógenas, lo cual es quizás el escenario más probable y lo más cercano a la realidad.

El análisis realizado en este estudio indica que ligandos del AHR son capaces de modular funciones de la célula de la granulosa como la proliferación, describiéndose además una novedosa interacción positiva entre el AHR y el receptor de estrógenos, ambos activados por sus ligandos, que impacta sobre la proliferación celular en un efecto sinérgico. Sin embargo, se verifica a su vez que las hormonas mitogénicas son capaces de regular negativamente la expresión del AHR. Esto podría indicar que la expresión del AHR es regulada de manera de permitir determinadas funciones solo en los tiempos apropiados y se logre así una interrelación coordinada entre las distintas vías de señalización que regulan la función ovárica.

Dada la rápida degradación de la proteína AHR inducida por sus ligandos, resulta llamativo que la activación del AHR por el agregado de β -naftoflavona sea capaz de inducir la expresión de los genes blanco de este factor de transcripción (*Cyp1a1* y *Cyp1b1*) a las 6

h ó 24 h luego de la estimulación, o que la regulación de la proliferación ejercida por el agonista pueda observarse a las 36 h ó 48 h luego del tratamiento en nuestro sistema de células de la granulosa en cultivo. Sin embargo, comportamientos similares se han descrito en varios sistemas (como ejemplos ver Giannone *et al.*, 1998). Se ha sugerido que esto puede deberse a que solo una pequeña fracción del pool total del AHR celular sería suficiente para llevar a cabo la transcripción a tasas cercanas a la máximas (en el caso de los efectos genómicos del AHR) o permitir la interacción del AHR activado con otras vías de transducción (en el caso de acciones del AHR a nivel no directamente genómico). Sin embargo, esta especulación carece de evidencias que la sustenten. Consideramos más razonable postular que las respuestas mediadas por el AHR aquí descritas son desencadenadas dentro de las primeras 4 h de estimulación, siendo ese tiempo (e incluso muy probablemente menos) suficiente para gatillar las interacciones necesarias para observar respuestas celulares a tiempos más prolongados. La degradación tendría entonces la función fisiológica de atenuar o apagar la actividad del receptor activado, modulando las respuestas celulares por él desencadenadas. Esta explicación conciliaría las observaciones aparentemente contradictorias antes mencionadas. Si bien en los experimentos de remoción del agonista luego de las primeras horas de incubación no puede descartarse la permanencia de trazas de β -naftoflavona dentro de la célula, los resultados de estos ensayos donde se verifican las respuestas celulares posteriores, junto con la observación de la marcada y rápida degradación del receptor, brindan evidencia a favor de la idea de que las primeras horas de estimulación son suficientes para gatillar las interacciones necesarias para observar luego las distintas respuestas celulares a tiempos más largos.

Si bien se ha descrito que el AHR es capaz de unir compuestos naturales, las altas dosis a las que esto ocurre, o las bajas afinidades de las uniones, o bien las débiles respuestas inducidas argumentan en contra de que estos sean los ligandos fisiológicos del receptor. Por lo tanto, la verdadera identidad del ligando endógeno para el AHR no ha sido aún fehacientemente determinada, siendo considerado aún un receptor huérfano. Como se mencionó con anterioridad, distintos resultados han sugerido la presencia de ligandos endógenos en diversos estudios. En el sistema de células de la granulosa de rata utilizado en este estudio se han podido también observar evidencias indirectas de la presencia de un ligando endógeno, como la inducción de los niveles de transcritos para *Cyp1a1* por inhibición proteasomal en ausencia de ligandos exógenos, el aumento en los niveles de proteína AHR que causa la inhibición del proteasoma a las 24 h de estimulación y los altos niveles constitutivos de transcritos *Cyp1b1* en las células control, que puedan quizás deberse a una activación constitutiva del AHR inducida por compuestos endógenos.

En conjunto, los resultados presentados indican que el AHR activado por agonistas como la β -naftoflavona interaccionaría directa o indirectamente con el receptor de estrógenos activado por estradiol. Esa interacción impactaría a través de mecanismos aún no dilucidados en un incremento en los niveles de ciclina D2 que llevan a un aumento en la proliferación de las células de la granulosa. Si bien no puede descartarse una interacción positiva de ambos receptores en secuencias de regiones promotoras de un gen clave para la proliferación, parece razonable hipotetizar que en dicha interacción estarían implicados efectos no genómicos. Por los antecedentes expuestos anteriormente, podría especularse que ambos receptores activados por sus agonistas podrían fosforilar a quinasas pertenecientes por ejemplo a la vía de las MAPKs (el AHR podría hacerlo a través de la proteína cSrc liberada luego de la unión del agonista al receptor), dando lugar a una serie de fosforilaciones encadenadas que resultarían en un sinergismo en la actividad mitótica. Además, FSH (necesaria para observar el efecto mitogénico de estradiol en este sistema) podría también estar sinergizando a este nivel, ya que se ha reportado que es capaz de activar a ERK a través de fosforilaciones mediadas por PKA (Kayampilly y Menon, 2004). Por otro lado, el AHR translocado al núcleo luego de la activación por el agonista produce un aumento en los niveles de transcritos para las hidroxilasas *Cyp1a1* y *Cyp1b1*, lo cual llevaría a un aumento en los niveles de catecolestrógenos, quines ejercerían acciones diferenciales con respecto a las del estradiol en la proliferación. El AHR es posteriormente degradado por la vía del proteasoma, atenuando y/o apagando la señal, mientras que la expresión de sus transcritos son inducidos a tiempos largos por el agonista, permitiendo quizás mediante este mecanismo la reposición de los niveles celulares del mismo. A su vez, los niveles de AHR son disminuidos (mediante acciones directas o indirectas) por estradiol y FSH, lo cual ejercería una disminución en la respuesta del receptor a tiempos específicos o impediría que se extienda luego de determinados momentos. Futuras investigaciones destinadas a dilucidar los mecanismos subyacentes a los procesos aquí descritos permitirán establecer las bases de las múltiples interrelaciones en las que está implicado el AHR y que regulan la función de las células ováricas.

6. Conclusiones

- *Distintos ligandos del AHR son capaces de regular diferencialmente la síntesis de ADN inducida por hormonas mitogénicas en células de la granulosa, careciendo todos ellos de efecto al ser agregados en condiciones control.*
- *El ligando del AHR β -naftoflavona funciona como agonista de este receptor en células de la granulosa de rata.*
- *El agonista β -naftoflavona es capaz de amplificar la señal mitogénica inducida por FSH y estradiol en células de la granulosa, sinergismo que está mediado por el AHR y por el receptor de estrógenos.*
- *El sinergismo entre el agonista del AHR y el agonista del receptor de estrógenos evidenciado en la respuesta proliferativa no se verifica a nivel transcripcional para los genes que responden a estrógenos.*
- *El sinergismo entre el agonista del AHR y el agonista del receptor de estrógenos evidenciado en la respuesta proliferativa no se verifica a nivel transcripcional para los genes inducibles por activación del AHR.*
- *Existiría un novedoso mecanismo de interacción positiva entre el AHR y el receptor de estrógenos que se verifica solo en condiciones en que ambos receptores se encuentran ocupados por sus ligandos y que impacta en la proliferación de células de la granulosa.*
- *Distintos ligandos del AHR ejercen efectos diferenciales sobre la producción de estradiol en células de la granulosa.*
- *Los catecolestrógenos son, a diferencia del estradiol, incapaces de amplificar la señal de FSH o de TGF- β e inducir la síntesis de ADN en células de la granulosa.*
- *Los catecolestrógenos 2-hidroxiestradiol y 2-metoxiestradiol inhiben la síntesis de ADN estimulada hormonalmente en células de la granulosa.*

-
- *Los niveles de expresión del AHR son reducidos por las hormonas FSH y estradiol a través de mecanismos que involucran tanto reducción de sus transcritos como degradación proteasomal.*
 - *Estradiol y FSH son reguladores claves de la expresión del AHR en células de la granulosa de rata, contándose con evidencias de que estas hormonas podrían ser importantes factores endógenos asociados al ciclo reproductivo que modulan in vivo los niveles del receptor en el ovario.*
 - *Los niveles de expresión de la proteína AHR son reducidos por sus ligandos rápida y marcadamente a través de degradación proteasomal en células de la granulosa de rata, lo cual sería un mecanismo de atenuación de la señal mediada por el receptor.*
 - *Los niveles de transcritos del Ahr son aumentados por el agonista β -naftoflavona a tiempos prolongados de tratamiento, lo cual podría constituir un mecanismo de reposición del receptor en la célula.*
 - *Existen evidencias de un ligando endógeno para el AHR en las células de la granulosa.*
 - *La activación del AHR jugaría un importante rol en la función de las células de la granulosa de rata, principalmente a través de la modulación de la proliferación inducida por las hormonas clásicas.*

7. Referencias

- Abbott BD (1995). Review of the interaction between TCDD and glucocorticoids in embryonic palate. *Toxicology* 105, 365-373.
- Abbott BD, Birnbaum LS (1990). Effects of TCDD on embryonic ureteric epithelial EGF receptor expression and cell proliferation. *Teratology* 41, 71-84.
- Abbott BD, Birnbaum LS (1990). TCDD-induced altered expression of growth factors may have a role in producing cleft palate and enhancing the incidence of clefts after coadministration of retinoic acid and TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* 106, 418-432.
- Abbott BD, Perdew GH, Buckalew AR, Birnbaum LS (1994). Interactive regulation of Ah and glucocorticoid receptors in the synergistic induction of cleft palate by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone. *Toxicol Appl Pharmacol* 128, 138-150.
- Abbott GH, Perdew LS, Birnbaum (1994). Ah receptor in embryonic mouse palate and effects of TCDD on receptor expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 126, 16-25.
- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141, 1795-1803.
- Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA 3rd, Kato T, Saeki K, Matsuda T (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276, 31475-31478.
- Adashi EY, Rohan RM (1992). Intraovarian regulation: Peptidergic signaling systems. *Trends Endocrinol Metab* 3, 243-248.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121, 647-653.
- Aluru N, Vuori K, Vijayan MM (2005). Modulation of Ah receptor and CYP1A1 expression by alpha-naphthoflavone in rainbow trout hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 141, 40-49.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR (1975). Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol* 67, 894-901.

- Armstrong DT, Papkoff H (1976). Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rat in vivo by follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 99, 1144-1148.
- Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafriri A (2005). Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146, 77–84.
- Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y (2005). Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol* 25, 10040-10051.
- Baker TG (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond [Biol]* 158, 417-428.
- Baker TG, Franchi LL (1967). The fine structure of oogonia and the oocytes in human ovaries. *J Cell Sci* 2, 213-221.
- Baraño JL, Bley MA, Batista FD, Glikin GC (1991). A DNA topoisomerase I inhibitor blocks the differentiation of rat granulosa cells induced by follicle-stimulating hormone. *Biochem J* 277, 557-560.
- Beers WH (1975). Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 6, 379-386.
- Beischlag T V, Wang S, Rose DW, Torchia J, Reisz-Porszasz S, Muhammad K, Nelson WE, Probst MR, Rosenfeld MG, Hankinson O (2002). Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol* 22, 4319-4333.
- Beischlag TV, Perdew GH (2005). ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280, 21607-21611.
- Bermanian V, Male R, Goksoyr A (2004). The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR- and ERalpha-signalling pathways. *Comp Hepatol* 3(1):2.

- Benedict JC, Lin TM, Loeffler IK, Peterson RE, Flaws JA (2000). Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicological Sciences* 56, 382–388.
- Benedict JC, Miller KP, Lin TM, Greenfeld C, Babus JK, Peterson RE, Flaws JA (2003). Aryl hydrocarbon receptor regulates growth, but not atresia, of mouse preantral and antral follicles. *Biology of Reproduction* 68, 1511–1517.
- Biegel L, Safe S (1990). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin TCDD on cell growth and the secretion of the estrogen-induced 34-, 52- and 160-kDa proteins in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 725–732.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW, Hsueh AJ (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133, 2204-2212.
- Bley MA, Saragüeta PE, Barañao JL (1997). Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62, 11-19.
- Bley MA, Simón JC, Estévez AG, Jiménez de Asúa L, Barañao JL (1992). Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 131, 1223-1229.
- Bley MA, Simón JC, Saragüeta PE, Barañao JL (1991). Hormonal regulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis: Effects of estrogens. *Biol Reprod* 44, 880-888.
- Bock KW, Köhle C (2005). Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 69, 1403-1408.
- Borlak J, Dangers M, Thum T (2002). Aroclor 1254 modulates gene expression of nuclear transcription factors: implications for albumin gene transcription and protein synthesis in rat hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 181, 79-88.
- Boutros PC, Moffat ID, Franc MA, Tijet N, Tuomisto J, Pohjanvirta R, Okey A (2004). Dioxin-responsive AHRE-II gene battery: identification by phylogenetic footprinting. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 707-715.

Boverhof DR, Tam E, Harney AS, Crawford RB, Kaminski NE, Zacharewski TR (2004). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces suppressor of cytokine signaling-2 in murine B-cells. *Mol Pharmacol* 66, 1662-1670.

Bradbury JT (1960). Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. *Endocrinology* 68, 115-120.

Brauze D, Crow JS, Malejka-Giganti D (1997). Modulation by beta-naphthoflavone of ovarian hormone dependent responses in rat uterus and liver in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 75, 1022-1029.

Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala ME, Dominguez R (2005). Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. *Endocrine* 26, 301-316.

Burghardt RC, Matheson RL (1982). Gap junction amplification in the rat ovarian granulosa cells. *Dev Biol* 94, 206-209.

Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974). Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone, and estradiol-17B throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94, 1704-1708.

Butler RA, Kelley ML, Powell WH, Hahn ME, Van Beneden RJ (2001). An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 278, 223-234.

Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK (1997). Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol* 11, 172-182.

Byskov AG, Hoyer PE (1994). Embryology of Mammalian Gonads and Ducts. In Knobil E, Neill J, *et al.*(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press; pp 487-541.

Campbell DR, Kurzer MS (1993). Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46, 381-388.

Carlson DB, Perdew GH (2002). A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J Biochem Mol Toxicol* 16, 317-325.

- Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG (1981). Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod* 24, 105-113.
- Chaffin CL, Stouffer RL, Duffy DM (1999). Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in macaque granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology* 140, 4753–4760.
- Chaffin CL, Trewin AL, Hutz RJ (2000). Estrous cycle-dependent changes in the expression of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-nuclear translocator (ARNT) mRNAs in the rat ovary and liver. *Chem Biol Interact* 124, 205-216.
- Chaloupka K, Krishnan V, Safe S (1992). Polynuclear aromatic hydrocarbon carcinogens as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: role of the Ah receptor. *Carcinogenesis* 13, 2233-2239.
- Chan WK., Yao G, Gu YZ, Bradfield CA (1999). Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem* 274, 12115-12123.
- Chang CY, Puga A (1998). Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* 18, 525-535.
- Chen HS, Singh SS, Perdew GH (1997). The Ah receptor is a sensitive target of geldanamycin-induced protein turnover. *Arch Biochem Biophys* 348, 190-198.
- Chiquoine HD (1960). The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. *Am J Anat* 106, 149-153.
- Chun S-Y, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafirri A, Hsueh AJW (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135, 1845-1853.
- Conney AH (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and arcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 42, 4875-4917.

Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J (1998). Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Human Reproduction* 13, 1292–1302.

Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, Firestone GL (1998). Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 273, 3838-3847.

Dain LB, Bley MA, Barañao JL, Tesone M (1993). Evidence for the production of a growth-inhibitory factor by human granulosa-luteal cells. *Mol Reprod Dev* 36, 159-163.

D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E (1994). 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3964-3968.

Das SK, Taylor JA, Korach KS, Paria BC, Dey SK, Lubahn DB (1997). Estrogenic responses in estrogen receptor-alpha deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12786-12791.

Dasmahapatra AK, Trewin AL, Hutz RJ (2002). Estrous cycle-regulated expression of CYP1B1 mRNA in the rat ovary. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 133, 127-134.

Dasmahapatra AK, Wimpee BA, Trewin AL, Hutz RJ (2001). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases steady-state estrogen receptor-beta mRNA levels after CYP1A1 and CYP1B1 induction in rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 182, 39-48.

Dasmahapatra AK, Wimpee BA, Trewin AL, Wimpee CF, Ghorai JK, Hutz RJ (2000). Demonstration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin attenuation of P450 steroidogenic enzyme mRNAs in rat granulosa cell in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Mol Cell Endocrinol* 164, 5-18.

Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A (2005). Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction* 130,147-156.

- Denison MS, Elferink CF, Phelan D (1998). The Ah receptor signal transduction pathway, en: Denison MS, Helferich WG (Editores). Toxicant-Receptor Interactions in the Modulation of Signal Transduction and Gene Expression. Taylor y Francis, Philadelphia, pp. 3-33.
- Denison MS, Nagy SR (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-334.
- Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* 141, 3-24.
- Denomme MA, Leece B, Li A, Towner R, Safe S (1986). Elevation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) receptor by polychlorinated biphenyls. Structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 35, 277-282.
- DeVito MJ, Birnbaum LS (1995). Dioxins: model chemicals for assessing receptor-mediated toxicity. *Toxicology* 102, 115-123.
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13612-13617.
- Dodson WC, Schomberg DW (1987). The effect of transforming growth factor- β n follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 120, 512-516.
- Dohr O, Abel J (1997). Transforming growth factor-beta1 coregulates mRNA expression of aryl hydrocarbon receptor and cell-cycle-regulating genes in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 86-91.
- Dohr O, Vogel C, Abel J (1994). Modulation of growth factor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Exp Clin Immunogenet* 11, 142-148.
- Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA (1993). Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 44, 911-917.

Duan R, Porter W, Samudio I, Vyhldal C, Kladde M, Safe S (1989). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol* 13, 1511-1521.

Edwards RG, Fowler RE, Gore-Langton RE, Gosden RG, Jones EC, Readhead C, Steptoe PC (1977). Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J Reprod Fertil* 51, 237-263.

Eguchi H, Hayashi S, Watanabe J, Gotoh O, Kawajiri K (1994). Molecular cloning of the human AH receptor gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 615-622.

Elbekai RH, Korashy HM, Wills K, Gharavi N, El-Kadi AO (2004). Benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene and beta-naphthoflavone induce oxidative stress in hepatoma hepa 1c1c7 Cells by an AHR-dependent pathway. *Free Radic Res* 38, 1191-1200.

Elferink CJ (2003). Aryl hydrocarbon receptor-mediated cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 5, 261-267.

Elferink CJ, Ge NL, Levine A (2001). Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Pharmacol* 59, 664-673.

Elizondo G, Fernandez-Salguero P, Sheikh MS, Kim GY, Fornace AJ, Lee KS, Gonzalez FJ (2000). Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol Pharmacol* 57, 1056-1063.

Emons G, Merriam GR, Pfeiffer D, Loriaux DL, Ball P, Knuppen R (1987). Metabolism of exogenous 4- and 2-hydroxyestradiol in the human male. *J Steroid Biochem* 28, 499-504.

Eppig JJ (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol* 89, 268-272.

Eppig JJ (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation. In Adashi EY, Leung PCK (eds): "The Ovary". New York. Raven Press; pp 185-208.

Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F (1994). Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 164, 1-9.

- Erickson GF, Hsueh AJW (1978). Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 102, 1275-1282.
- Erickson GF, Shimasaki S (2001). The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and Sterility* 76, 943-949.
- Erickson GF, Wang C, Hsueh AJW (1979). FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Nature* 279, 336-338.
- Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Everett J (1964). Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. *Phys Rev* 44, 373-431.
- Everett J (1994). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. In Knobil E, Neill J(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press; pp 1509-1526.
- Fallone F, Villard PH, Séréé E, Rimet O, Nguyen QB, Bourgarel-Rey V, Fouchier F, Barra Y, Durand A, Lacarelle B (2004). Retinoids repress Ah receptor CYP1A1 induction pathway through the SMRT corepressor. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 551-556.
- Feng P, Catt KJ, Knecht M (1986). Transforming growth factor- β regulates the inhibitory action of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation. *J Biol Chem* 261, 14167-14170.
- Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722-726.
- Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ (1997) Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Veterinary Pathology* 34, 605-614.
- Fetissov SO, Huang P, Zhang Q, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Rannug A, Hökfelt T, Ceccatelli S (2004). Expression of hypothalamic neuropeptides after acute TCDD treatment and distribution of Ah receptor repressor. *Regul Pept* 119, 113-124.

Filbrandt CR, Wu Z, Zlokovic B, Opanashuk L, Gasiewicz TA (2004). Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes. *Neurotoxicology* 25, 605-616.

Fisher WS, Oliver LM, Winstead JT, Long ER (2000). A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat Toxicol* 51, 115-138.

Fitzpatrick SL, Richards JS (1994). Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C Leydig cells. *Mol Endocrinol* 8, 1309-1319.

Fortune JE, Armstrong DT (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles. *Endocrinology* 100, 1341-1347.

Franc MA, Pohjanvirta R, Tuomisto J, Okey AB (2001). Persistent, low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure: effect on aryl hydrocarbon receptor expression in a dioxin-resistance model. *Toxicol Appl Pharmacol* 175, 43-53

Franczak A, Nynca A, Valdez KE, Mizinga KM, Petroff BK (2006). Effects of acute and chronic exposure to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the transition to reproductive senescence in female Sprague-Dawley rats. *Biol Reprod* 74, 125-130.

Fritz MA, Speroff L (1982). The endocrinology of the menstrual cycle, the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril* 38, 509-511.

Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock JP Jr (2001). Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol Lett* 122, 189-203.

Fuhrman-Lane C, Ortiz E, Shiverick KT (1983). Effects of beta-naphthoflavone administration to pregnant rats on steroid hormone biosynthesis and metabolism in ovarian microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 227, 248-253.

Fujii-Kuriyama Y, Mimura J (2005). Molecular mechanism of AhR functions in the regulaci3n of *cytochrome P450* genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 311-317.

Fukuzawa NH, Ohsako S, Wu Q, Sakaue M, Fujii-Kuriyama Y, Baba T, Tohyama C (2004). Testicular cytochrome P450scc and LHR as possible targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the mouse. *Mol Cell Endocrinol* 221, 87-96.

Gambone CJ, Hutcheson JM, Gabriel JL, Beard RL, Chandraratna RA, Soprano KJ, Soprano DR (2002). Unique property of some synthetic retinoids: activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Pharmacol* 61, 334-342.

Garrison PM, Denison MS (2000). Analysis of the murine AhR gene promoter. *J Biochem Mol Toxicol* 14, 1-10.

Gasiewicz TA, Rucci G (1991). Alpha-naphthoflavone acts as an antagonist of 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by forming an inactive complex with the Ah receptor. *Mol Pharmacol* 40, 607-612.

Gay VL, Midgley Jr. AR, Niswender GD (1970). Patterns of gonadotropin secretion associated with ovulation. *Federation Proc* 29, 1880-1887.

Ge NL, Elferink CJ (1998). A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J Biol Chem* 273, 22708-22713.

Giannone JV, Li W, Probst M, Okey A (1998). Prolonged depletion of AH receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with for 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin. *Biochem Pharmacol* 55, 489-497.

Giannone JV, Okey AB, Harper PA (1995). Characterization of polyclonal antibodies to the aromatic hydrocarbon receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 7-17.

Gierthy JF, Lincoln DW (1988). Inhibition of postconfluent focus production in cultures of MCF-7 human breast cancer cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Breast Cancer Res Treat* 12, 227-233.

Gillesby BE, Stanostefano M, Porter W, Safe S, Wu ZF, Zacharewski TR (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* 36, 6080-6089.

Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT (1972). Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90, 1492-1498.

Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P (1998). The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos* 26, 1194-1198.

Gore-Langton RE, Armstrong DT (1988). Follicular Steroidogenesis and its Control. In Knobil E, Neill J(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press, Ltd; pp 331-385.

Granberg L, Ostergren A, Brandt I, Brittebo EB (2003). CYP1A1 and CYP1B1 in blood-brain interfaces: CYP1A1-dependent bioactivation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in endothelial cells. *Drug Metab Dispos* 31, 259-265.

Greenwald GS, Roy SK (1994). Follicular development and its control. In Knobil E, Neill JD, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press; pp 629-724.

Gregoraszcuk EL (2002). Dioxin exposure and porcine reproductive hormonal activity. *Cad Saude Publica* 18, 453-462.

Gressani KM, Leone-Kabler S, O'Sullivan MG, Case LD, Malkinson AM, Miller MS (1999). Strain-dependent lung tumor formation in mice transplacentally exposed to 3-methylcholanthrene and post-natally exposed to butylated hydroxytoluene. *Carcinogenesis* 20, 2159-2165.

Grochowalski A, Chrzaszcz R, Pieklo R, Gregoraszcuk EL (2001). Estrogenic and antiestrogenic effect of in vitro treatment of follicular cells with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chemosphere* 43, 823-827.

Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 519-561.

Gujaeva EL, Ostashkina NM, Kondalenko VF, Koblyakov VA (1999). Different pathways for mitogenic and enzyme induction signal transduction by cytochrome P450 inducers. *Biochemistry (Mosc)* 64, 929-632.

Hagglund AC, Ny A, Liu K, Ny T (1996). Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasmin formation during ovulation. *Endocrinology* 137, 5671-5677.

Hahn ME (1998). The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121, 23-53.

Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA, Perera SA (1997). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13743-13748.

Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 36869-36872.

Ham AW (1965). *Histology*. Philadelphia, Montreal. Lippincott.

Hammond JM, English HF (1987). Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in cultured porcine granulosa cells by growth factors and hormones. *Endocrinology* 120, 1039-1046.

Hankinson O (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharm Toxicol* 35, 307-340.

Hankinson, O. (2005). Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys* 433, 379-386.

Harris M, Zacharewski T, Safe S (1990). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin and related compounds on the occupied nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 50, 3579-3584.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature* 387, 296-299.

Hayashi S, Okabe-Kado J, Honma Y, Kawajiri K (1995). Expression of Ah receptor (TCDD receptor) during human monocytic differentiation. *Carcinogenesis* 16, 1403-1409.

Heath-Pagliuso S, Rogers WJ, Tullis K, Seidel SD, Cenijn PH, Brouwer A, Denison MS (1998). Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37, 11508-11515.

Helferich WG, Denison MS (1991). Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. *Mol Pharmacol* 40, 674-678.

Henry EC, Gasiewicz TA (2003). Agonist but not antagonist ligands induce conformational change in the mouse aryl hydrocarbon receptor as detected by partial proteolysis. *Mol Pharmacol* 63, 392-400.

Henry EC, Kende AS, Rucci G, Tolleben MJ, Willey JJ, Dertinger SD, Pollenz RS, Jones JP, Gasiewicz TA (1999). Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. *Mol Pharmacol* 55, 716-725.

Hestermann EV, Brown M (2003). Agonist and chemopreventative ligands induce differential transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* 23, 7920-7925.

Hirshfield AN (1989). Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 41, 309-316.

Hirshfield AN (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124, 43-101.

Hirshfield AN, Midgley AR, Jr. (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 19, 597-605.

Hoeck W, Rusconi S, Groner B (1989). Down regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cell. *J Biol Chem* 264, 14396-14402.

Hoivik D, Willett K, Wilson C, Safe S (1997). Estrogen does not inhibit 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated effects in MCF-7 and Hepa 1c1c7 cells. *J Biol Chem* 272, 30270-30274.

Hollingshead BD, Petrusis JR, Perdew GH (2004). The Ah receptor transcriptional regulator XAP2 antagonizes p23 binding to Ah receptor/Hsp90 complexes and is dispensable for receptor function. *J Biol Chem* 279, 45652-45661.

- Hood A, Allen ML, Liu Y, Liu J, Klaassen CD (2003). Induction of T(4) UDP-GT activity, serum thyroid stimulating hormone, and thyroid follicular cell proliferation in mice treated with microsomal enzyme inducers. *Toxicol Appl Pharmacol* 188, 6-13.
- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh THJ (1984). Hormonal regulation of differentiation of cultured granulosa cells. *Endocrine Reviews* 5, 76-127.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafiri A (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15, 707-724.
- Huang G, Elferink CJ (2005). Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest. *Mol Pharmacol* 67, 88-96.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998). Regulation of hypoxia inducible factor 1 α is mediated by an oxygen-dependent domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7987-7992.
- Huang P, Ceccatelli S, Hakansson H, Grandison L, Rannug A (2002). Constitutive and TCDD-induced expression of Ah receptor-responsive genes in the pituitary. *Neurotoxicology* 23, 783-793.
- Huang ZJ, Edery I, Rosbash M (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364, 259-262.
- Ikuta T, Kobayashi Y, Kawajiri K (2004). Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 545-550.
- Ingraham DL (1959). The effect of gonadotropins and oestrogen on ovarian atresia in the immature rat. *J Endocrinol* 19, 117-120.
- Ireland JJ, Richards JS (1978). Acute effects of estradiol and FSH on specific binding of human [125I]iodo FSH to rat ovarian granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 102, 876-883.
- Iseki M, Ikuta T, Kobayashi T, Kawajiri K (2005). Growth suppression of Leydig TM3 cells mediated by aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 902-908.

Jain S, Dolwick KM, Schmidt JV, Bradfield CA (1994). Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J Biol Chem* 269, 31518-31524.

Karchner SI, Franks DG, Powell WH, Hahn ME (2002). Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J Biol Chem* 277, 6949-6959.

Kawanishi M, Sakamoto M, Ito A, Kishi K, Yagi T (2003). Construction of reporter yeasts for mouse aryl hydrocarbon receptor ligand activity. *Mutat Res* 540, 99-105.

Kayampilly PP, Menon KM (2004). Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase-2 phosphorylation by dihydrotestosterone reduces follicle-stimulating hormone-mediated cyclin D2 messenger ribonucleic acid expression in rat granulosa cells. *Endocrinology* 145, 1786-1793.

Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 274, 13519-13524.

Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I (2000). The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* 275, 41317-41324.

Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I (2002). Two distinct regions of the immunophilin-like protein XAP2 regulate dioxin receptor function and interaction with hsp90. *J Biol Chem* 277, 11795-11801.

Kel A, Reymann S, Matys V, Nettesheim P, Wingender E, Borlak J (2004). A novel computational approach for the prediction of networked transcription factors of Ah-receptor regulated genes. *Mol Pharmacol* 66, 1557-1572.

Kellis JT Jr, Vickery LE (1984). Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science* 225, 1032-1034.

Kenakin T (1997). Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci* 18, 416-417.

Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators *Int J Biochem Cell Biol* 36, 189-204.

- Kharat I, Saatcioglu F (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J Biol Chem* 271, 10533-10537.
- Kitajima M, Khan KN, Fujishita A, Masuzaki H, Ishimaru T (2004). Histomorphometric alteration and cell-type specific modulation of arylhydrocarbon receptor and estrogen receptor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17beta-estradiol in mouse experimental model of endometriosis. *Reprod Toxicol* 18, 793-801.
- Klinge CM, Bowers JL, Kulakosky PC, Kamboj KK, Swanson HI (1999). The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol* 157, 105-119.
- Klinge CM, Bowers JL, Kulakosky PC, Kamboj KK, Swanson HI (2000). The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptors COUP-TFI and ERRalpha1. *Arch Biochem Biophys* 373, 163-174.
- Kohle C, Hassepass I, Bock-Hennig BS, Walter Bock K, Poellinger L, McGuire J (2002). Conditional expression of a constitutively active aryl hydrocarbon receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 402, 172-179.
- Kondraganti SR, Muthiah K, Jiang W, Barrios R, Moorthy B (2005). Effects of 3-methylcholanthrene on gene expression profiling in the rat using cDNA microarray analyses. *Chem Res Toxicol* 18, 1634-1641.
- Kronenberg S, Esser C, Carlberg C (2000). An aryl hydrocarbon receptor conformation acts as the functional core of nuclear dioxin signaling. *Nucleic Acids Res* 28, 2286-2291.
- Kumar MB, Perdew GH (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr* 8, 273-286.
- Kumar MB, Tarpey RW, Perdew GH (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem* 274, 22155-22164.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics* 15, 201-204.

- Kuramoto N, Baba K, Gion K, Sugiyama C, Taniura H, Yoneda Y (2003). Xenobiotic response element binding enriched in both nuclear and microsomal fractions of rat cerebellum. *J Neurochem* 85, 264-273.
- Lahvis GP, Bradfield CA (1998). AhR null alleles: distinctive or different? *Biochem Pharmacol* 56, 781-787.
- Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, Bentz M, Southard J, Bradfield CA (2000). Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10442-10447.
- Lees MJ, Peet DJ, Whitelaw ML (2003). Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* 278. 35878– 35888.
- Lees MJ, Whitelaw ML (1999). Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol* 19, 5811-5822.
- Leighton JK, Canning S, Guthrie HD, Hammond JM (1995). Expression of cytochrome P450 1A1, an estrogen hydroxylase, in ovarian granulosa cells is developmentally regulated. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52, 351-356.
- Levin ER (2003). Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 17, 309–317.
- Levin ER (2005). Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Mol Endocrinol* 19, 1951–1959.
- Liehr JG, Ricci MJ (1996). 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3294-3296.
- Lind PM, Eriksen EF, Sahlin L, Edlund M, Orberg J (1999). Effects of the antiestrogenic environmental pollutant 3,3',4,4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB #126) in rat bone and uterus: diverging effects in ovariectomized and intact animals. *Toxicol Appl Pharmacol* 154, 236-244.
- Losel R, Wehling M (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-56.

Louvet JP, Vaitukaitis JL (1976). Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming. *Endocrinology* 99, 758-762.

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11162-11166.

Ma Q (2001). Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr Drug Metab* 2, 149-164.

Ma Q, Whitlock JP Jr (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Biol Chem* 272, 8878-8884.

Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR (2004). Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *PNAS* 101, 17294-17299.

Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. *Science* 234, 1366-1371.

Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, Sakai T, Korsmeyer SJ, Casper RF, Sherr DH, Tilly JL (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 28, 355-360.

Matikainen TM, Moriyama T, Morita Y, Perez GI, Korsmeyer SJ, Sherr DH, Tilly JL (2002). Ligand activation of the aromatic hydrocarbon receptor transcription factor drives Bax-dependent apoptosis in developing fetal ovarian germ cells. *Endocrinology* 143, 615-620.

Matsumura F (2003). On the significance of the role of cellular stress response reactions in the toxic actions of dioxin. *Biochem Pharmacol* 66, 527-540.

McGuire J, Whitelaw ML, Pongratz I, Gustafsson JA, Poellinger L (1994). A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Mol Cell Biol* 14, 2438-2446.

- Merchant M, Krishnan V, Safe S (1993). Mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 120, 179-185.
- Merchant M, Safe S (1995). In vitro inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activity by alpha-naphthoflavone and 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran using an aryl hydrocarbon (Ah)-responsive construct. *Biochem Pharmacol* 50, 663-668.
- Merk FB, Botticelli CR, Albrigh JT (1972). An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary; an electron microscope study. *Endocrinology* 90, 992-998.
- Meyer BK, Perdew GH (1999). Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* 38, 8907-8917.
- Miller CA 3rd (1997). Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J Biol Chem* 272, 32824-32829.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13, 20-25.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Ikawa S, Fujii-Kuriyama Y (1994). A complete structure of the mouse Ah receptor gene. *Pharmacogenetics* 4, 349-354.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619, 263-268.
- Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2, 645-654.
- Minsavage GD, Park SK, Gasiewicz TA (2004). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) tyrosine 9, a residue that is essential for AhR DNA binding activity, is not a phosphoresidue but augments AhR phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 20582-20593.
- Monk SA, Denison MS, Rice RH (2001). Transient expression of CYP1A1 in rat epithelial cells cultured in suspension. *Arch Biochem Biophys* 393, 154-162.

Moran FM, VandeVoort CA, Overstreet JW, Lasley BL, Conley AJ (2003). Molecular target of endocrine disruption in human luteinizing granulosa cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: inhibition of estradiol secretion due to decreased 17 α -hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 expression. *Endocrinology* 144, 467-473.

Mufti NA, Bleckwenn NA, Babish JG, Shuler ML (1995). Possible involvement of the Ah receptor in the induction of cytochrome P-450IA1 under conditions of hydrodynamic shear in microcarrier-attached hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 144-152.

Mukhopadhyay T, Roth JA (1998). Superinduction of wild-type p53 protein after 2-methoxyestradiol treatment of Ad5p53-transduced cells induces tumor cell apoptosis. *Oncogene* 17, 241-246.

Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA Jr, Crews ST (1991). The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67, 1157-1167.

Naruse M, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Koyama A, Hagiwara H (2002). 3-Methylcholanthrene, which binds to the arylhydrocarbon receptor, inhibits proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro and ossification in vivo. *Endocrinology* 143, 3575-3581.

Navas JM, Segner H (2000). Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat Toxicol* 51, 79-92.

Navas JM, Segner H (2001). Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chem Biol Interact* 138, 285-298.

Navas JM, Zanuy S, Segner H, Carrillo M (2004). Beta-naphthoflavone alters normal plasma levels of vitellogenin, 17 beta-estradiol and luteinizing hormone in sea bass broodstock. *Aquat Toxicol* 67, 337-345.

Nebert DW, Petersen DD, Fornace AJ Jr (1990). Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm. *Environ Health Perspect* 88, 13-25.

- Nebert DW, Puga A, Vasiliou V (1993). Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 685, 624-640.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59, 65-85.
- Nguyen TA, Hoivik D, Lee JE, Safe S (1999). Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 367, 250-257.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81, 1535–1565.
- Nishizawa H, Imanishi S, Manabe N (2005). Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *J Reprod Dev* 51, 593-605.
- Nutter LM, Ngo EO, Abul-Hajj YJ (1991). Characterization of DNA damage induced by 3,4-estrone-o-quinone in human cells. *J Biol Chem* 266, 16380–16386.
- Nutter LM, Wu YY, Ngo EO, Sierra EE, Gutierrez PL, Abul-Hajj YJ (1994). An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem Res Toxicol* 7, 23–28.
- Oesch-Bartlomowicz B, Huelster A, Wiss O, Antoniou-Lipfert P, Dietrich C, Arand M, Weiss C, Bockamp E, Oesch F (2005). Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 9218-9223.
- Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- Oonk RB, Parker KL, Gibson JL, Richards JS (1990). Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{scc}) gene. Structure and regulation by cAMP *in vitro*. *J Biol Chem* 265, 22392-22401.

- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 277, 1508–1510.
- Pahl HL, Baeuerle PA (1996). Control of gene expression by proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 8, 340–347.
- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T (1994). The ubiquitin–proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF κ B, *Cell* 78, 773–785.
- Paria BC, Song H, Dey SK (2001). Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int J Dev Biol* 45, 597-605.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303, 682–684.
- Park Y, Maizels ET, Feiger ZJ, Alam H, Peters CA, Woodruff TK, Unterman TG, Lee EJ, Jameson JL, Hunzicker-Dunn M (2005). Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad. *J Biol Chem* 280, 9135-9148.
- Payne RW, Hellbaum AA (1955). The effect of estrogens on the ovary of the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 57: 193-199.
- Pederson T (1970). Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol* 64, 304-323.
- Pederson T, Peters H (1971). Follicle growth and cell dynamics in the mouse ovary during pregnancy. *Fertil Steril* 22, 42-52.
- Pelissero C, Lenczowski MJ, Chinzi D, Davail-Cuisset B, Sumpter JP, Fostier A (1996). Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57, 215-223.
- Pencharz RI (1940). Effects of estrogens and androgens alone in combination with corionic gonadotropin on the ovary of the hypophysectomized rat. *Science* 91, 554-555.

Perdew GH, Babbs CF (1991). Production of Ah receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol. *Nutr Cancer* 16, 209-218.

Peter Guengerich F, Martin MV, McCormick WA, Nguyen LP, Glover E, Bradfield CA (2004). Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. *Arch Biochem Biophys* 423, 309-16.

Peters H (1970). Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 259, 91-101.

Peters H (1978). Folliculogenesis in mammals. In Jones RE(ed): "The Vertebrate Ovary". New York. Plenum; pp 121-140.

Peters JM, Wiley LM (1995). Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 134, 214-221.

Petrulis J, y Perdew G (2002). The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact* 141, 25-40.

Petrulis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH (2003). The hsp90 Cochaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem* 278, 2677-2685.

Phelan D, Winter G M, Rogers, WJ, Lam JC, Denison MS (1998). Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys* 357, 155-163.

Piquette GN, LaPolt PS, Oikawa M, Hsueh AJW (1991). Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 128, 2449-2456.

Pocar P, Augustin R, Fischer B (2004) Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in vitro: mechanisms and biological implications. *Endocrinology* 145, 1594-1601.

Pocar P, Fischer B, Klonisch T, Hombach-Klonisch S (2005). Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction* 129, 379-389.

- Poland A, Knutson JC (1982). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 517- 542.
- Pollenz RS (1996). The Ah-receptor but not the Arnt protein is rapidly depleted in hepatic and non-hepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Mol Pharmacol* 49, 391–398.
- Pollenz RS (2002). The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact* 141, 41-61.
- Pollenz RS, Santostefano MJ, Klett E, Richardson VM, Necela B, Birnbaum LS (1998). A single oral dose of TCDD results in sustained depletion of AHR protein in female Sprague–Dawley rats. *Toxicol Sci* 42, 117–128.
- Pongratz I, Mason GG, Poellinger L (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J Biol Chem* 267, 13728-13734.
- Probst MR, Reisz-Porszasz S, Agbunag RV, Ong MS, Hankinson O (1993). Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol Pharmacol* 44, 511-518.
- Puga A, Maier A, Medvedovic M (2000). The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 60, 1129-1142.
- Puga A, Tomlinson CR, Xia Y (2005). Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol* 69, 199-207.
- Puga A, Xia Y, Elferink C (2002). Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem Biol Interact* 141, 117-130.
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997). Activation of hypoxia inducible factor 1: definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272, 11205–11214.

Racky J, Schmitz HJ, Kauffmann HM, Schrenk D (2004). Single nucleotide polymorphism analysis and functional characterization of the human Ah receptor (AhR) gene promoter. *Arch Biochem Biophys* 421, 91-98.

Rani CSS, Salhanick AR, Armstrong DT (1981). Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: an examination of the need for steroids in the induction process. *Endocrinology* 108, 1379-1386.

Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafstrom AK (1987). Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem* 262, 15422-15427.

Rao MC, Midgley AR, Richards JS (1978). Hormonal regulation of ovarian cell proliferation. *Cell* 14, 71-78.

Reich R, Miskin R, Tsafirri A (1985). Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation. *Endocrinology* 116, 516-521.

Reilly CM, Cannady WE, Mahesh VB, Stopper VS, De Sevilla LM, Mills TM (1996). Duration of estrogen exposure prior to follicle-stimulating hormone stimulation is critical to granulosa cell growth and differentiation in rats. *Biol Reprod* 54, 1336-1342.

Richards JS (1979). Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog Horm Res* 35, 343-373.

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

Richards JS (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews* 15, 725-751.

Richards JS (2001). Perspective: the ovarian follicle--a perspective in 2001. *Endocrinology* 142, 2184-93.

Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J (1995). Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog Horm Res* 50, 223-254.

Richards JS, Ireland JJ, Rao MC, Bernath GA, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. (1976). Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology* 99, 1562-1570.

Richards JS, Midgley Jr. AR (1976). Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod* 14, 82-94.

Roberts BJ, Whitelaw ML (1999). Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem* 274, 36351-36356.

Robker RL, Richards JS (1998). Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59, 476-482.

Robles R, Morita Y, Mann KK, Perez GI, Yang S, Matikainen T, Sherr DH, Tilly JL (2000). The aryl hydrocarbon receptor, a basic helix-loop-helix transcription factor of the PAS gene family, is required for normal ovarian germ cell dynamics in the mouse. *Endocrinology* 141, 450-453.

Roth J, Dobbelstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ (1998). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J* 17, 554-564.

Rowlands JC, Gustafsson JA (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 27, 109-134.

Rowlands JC, McEwan IJ, Gustafsson JA (1996). Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors. *Mol Pharmacol* 50, 538-548.

Ruffolo RR J (1982). Review important concepts of receptor theory. *J Auton Pharmacol* 2, 277-295.

Rushing, S. R., and Denison, M. S. (2002). The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors can interact with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor but fails to repress Ah receptor-dependent gene expression. *Arch Biochem Biophys* 403, 189-201.

Rushmore TH, Kong AN (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 5, 481-490.

Sadek CM, Allen-Hoffman BL (1994). Suspension-mediated induction of hepa1c1c7 CYP1A-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *J Biol Chem* 269, 31505- 31509.

Sadek CM, Allen-Hoffmann BL (1994). Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics. *J Biol Chem* 269, 16067–16074.

Safe S, Krishnan V (1995). Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. *Arch Toxicol Suppl* 17, 99-115.

Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A (1998). Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett* 102-103, 343-347.

Safe S, Wormke M, Samudio I (2000). Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 295-306.

Safe SH (1986). Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 26, 371-399.

Safe SH (1995). Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmac Ther* 67, 247-281.

Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1a protein is rapidly degraded via the ubiquitin– proteasome system under normoxic conditions. *J Biol Chem* 272, 22642–22650.

Santostefano M, Merchant M, Arellano L, Morrison V, Denison MS, Safe S (1993). alpha-Naphthoflavone-induced CYP1A1 gene expression and cytosolic aryl hydrocarbon receptor transformation. *Mol Pharmacol* 43, 200-206.

Sarkar FH, Li Y (2004). Indole-3-carbinol and prostate cancer. *J Nutr* 134, 3493S-3498S.

Savouret J., Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF (2001). 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 276, 3054-3059.

- Schaldach CM, Riby J, Bjeldanes LF (1999). Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38, 7594-7600.
- Schmidt JV, Bradfield CA (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 55-89.
- Schmidt JV, Carver LA, Bradfield CA (1993). Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 268, 22203-22209.
- Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *PNAS* 93, 6731-6736.
- Schultz R, Suominen J, Varre T, Hakovirta H, Parvinen M, Toppari J, Pelto-Huikko M (2003). Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology* 144,767-776.
- Schumacher G, Kataoka M, Roth JA, Mukhopadhyay T (1999). Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 5, 493-499.
- Schwartz NB (1974). The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. *Biol Reprod* 10, 236-272.
- Seidel SD, Winters GM, Rogers WJ, Ziccardi MH, Li V, Keser B, Denison MS (2001). Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol* 15, 187-196.
- Shimba S, Hayashi M, Ohno T, Tezuka M (2003). Transcriptional regulation of the AhR gene during adipose differentiation. *Biol Pharm Bull* 26, 1266-1271.
- Shimba S, Komiyama K, Moro I, Tezuka M (2002). Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) accelerates the cell proliferation of A549 cells. *J Biochem (Tokyo)* 132, 795-802.
- Shimba S, Todoroki K, Aoyagi T, Tezuka M (1998). Depletion of arylhydrocarbon receptor during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 131-137.

Shimba S, Wada T, Tezuka M (2001). Arylhydrocarbon receptor (AhR) is involved in negative regulation of adipose differentiation in 3T3-L1 cells: AhR inhibits adipose differentiation independently of dioxin. *J Cell Sci* 114, 2809-2817.

Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384, 470-474.

Sinal CJ, Bend JR (1997). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol* 52, 590-599.

Sindhu RK, Reisz-Porszasz S, Hankinson O, Kikkawa Y (1996). Induction of cytochrome P4501A1 by photooxidized tryptophan in Hepa lcl7 cells. *Biochem Pharmacol* 52, 1883-1893.

Sindhu RK, Wagner FE, Kikkawa Y. Induction of cytochrome p450 1A1 and 1B1 by photooxidized tryptophan in transformed human keratinocytes (2003). *Adv Exp Med Biol* 527, 297-306.

Singh SS, Hord NG, Predew GH (1996). Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch Biochem Biophys* 329, 47-55.

Sloop TC, Lucier GW (1987). Dose-dependent elevation of Ah receptor binding by TCDD in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 88, 329-37.

Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Takahashi T, Matsushita N, Miura C, Nikawa J, Gotoh O, Kikuchi Y, Fujii-Kuriyama Y (2004). A novel induction mechanism of the rat CYP1A2 gene mediated by Ah receptor-Arnt heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 746-755.

Sokal RR, Rohlf FJ (1995). Freeman WH (ed): "Biometry". New York, Freeman WH and Co.

Son DS, Ushinohama K, Gao X, Taylor CC, Roby KF, Rozman KK, Terranova PF (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) blocks ovulation by a direct action on the ovary without alteration of ovarian steroidogenesis: lack of a direct effect on ovarian granulosa and thecal-interstitial cell steroidogenesis in vitro. *Reprod Toxicol* 13, 521-530.

Sone H, Yonemoto J (2002). Interaction between dioxin signaling and sex steroid hormones. *Journal of Health Science* 48, 385–392.

Song J, Clagett-Dame M, Peterson RE., Hahn ME, Westler WM, Sicinski RR, DeLuca HF (2002). A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99, 14694-14699.

Song Z, Pollenz RS (2003). Functional analysis of murine aryl hydrocarbon (AH) receptors defective in nuclear import: impact on AHR receptor degradation and gene regulation. *Mol Pharmacol* 63, 597-606.

Soprano DR, Gambone CJ, Sheikh SN, Gabriel JL, Chandraratna RA, Soprano KJ, Kochhar DM (2001). The synthetic retinoid AGN 193109 but not retinoic acid elevates CYP1A1 levels in mouse embryos and Hepa-1c1c7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 174, 153-159.

Spicer LJ (2004). Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol Reprod* 70, 1223-1230.

Spicer LJ, Hammond JM (1989). Regulation of ovarian function by catecholestrogens: current concepts. *J Steroid Biochem* 33, 489-501.

Spink BC, Fasco MJ, Gierthy JF, Spink DC (1998). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate upregulates the Ah receptor and differentially alters CYP1B1 and CYP1A1 expression in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Biochem* 70, 289-296.

Stapleton HM, Baker JE (2003). Comparing polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl bioaccumulation in a food web in Grand Traverse Bay, Lake Michigan. *Arch Environ Contam Toxicol* 45, 227-234.

Stein LS, Stoica G, Tilley R, Burghardt RC (1991). Rat ovarian granulosa cell culture: A model system for the study of cell-cell communication during multistep transformation. *Cancer Res* 51, 696-706.

Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsu, S, Matsuda T (2004). Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 571-578.

- Sun YV, Boverhof DR, Burgoon LD, Fielden MR, Zacharewski TR (2004). Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res* 32, 4512-4523.
- Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF (1994). Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* 269, 13092-13099.
- Swanson HI, Bradfield CA (1993). The Ah-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* 3, 213-230.
- Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 270, 26292-26302.
- Tamura M, Nakagawa Y, Shimizu H, Yamada N, Miyano T, Miyazaki H (2004). Cellular functions of mitogen-activated protein kinases and protein tyrosine phosphatases in ovarian granulosa cells. *J Reprod Dev* 50, 47-55.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990). cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59, 971-1005.
- Teepker M, Anthes N, Krieg JC, Vedder H (2003). 2-OH-estradiol, an endogenous hormone with neuroprotective functions. *J Psychiatr Res* 37, 517-523.
- Thomsen JS, Kietz S, Strom A, Gustafsson JA (2004). HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 65, 165-171.
- Thomsen JS, Wang X, Hines RN, Safe S (1994). Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor. *Carcinogenesis* 15, 933-937.
- Tian Y, Rabson A, Gallo M (2002). Ah receptor and NF-kappaB interactions: mechanisms and physiological implications. *Chem Biol Interact* 141, 97-115.
- Tilly JL (1996). Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1, 162-172.

- Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJW (1992). Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 131, 1670-1676.
- Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL (1995). Expression of members of the Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: Equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-X_{long} messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136, 232-241.
- Timsit YE, Chia FS, Bhathena A, Riddick DS (2002). Aromatic hydrocarbon receptor expression and function in liver of hypophysectomized male rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 185, 136-145.
- Tsang BK, Moon YS, Simpson CW, Armstrong DT (1979). Androgen biosynthesis in human ovarian follicles: cellular source, gonadotropin control and adenosine 3',5'-monophosphate mediation. *J Clin Endocrinol Metab* 48, 153-158.
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Letters* 227, 115-124.
- Uilenbroek JTJ, Richards JS (1979). Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *Biol Reprod* 20, 1159-1165.
- Van Birgelen AP, Smit EA, Kampen IM, Groeneveld CN, Fase KM, Van der Kolk J, Poiger H, Van den Berg M, Koeman JH, Brouwer A (1995). Subchronic effects of 2,3,7,8-TCDD or PCBs on thyroid hormone metabolism: use in risk assessment. *Eur J Pharmacol* 293, 77-85.
- van den Hurk R, Zhao J (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717-1751.
- Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, Muto T, Suzuki Y, Kanai Y, Hano H, Furusato M, Endou H (2005). CYP1 and AhR expression in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinoma of rats prenatally exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Toxicology* 211, 231-241.
- Wang F, Hoivik D, Pollenz R, Safe S (1998a). Functional and physical interactions between the estrogen receptor Sp1 and nuclear aryl hydrocarbon receptor complexes. *Nucleic Acids Res* 26, 3044-3052.

- Wang F, Samudio I, Safe S (2001). Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 172, 91-103.
- Wang H, Eriksson H, Sahlin L (2000). Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* 63, 1331-1340.
- Wang S, Ge K, Roeder RG, Hankinson O (2004). Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 279, 13593-13600.
- Wang W, Smith R 3rd, Safe S (1998b). Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenicity in MCF-7 cells: modulation of hormone-induced cell cycle enzymes. *Arch Biochem Biophys* 356, 239-248.
- Wanner R, Brommer S, Czarnetzki BM, Rosenbach T (1995). The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 706-711.
- Wattenberg LW, Loub WD (1978). Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res* 38, 1410-1413.
- Weber LP, Janz DM (2001). Effect of beta-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquat Toxicol* 54, 39-50.
- Wei YD, Bergander L, Rannug U, Rannug A. (2000). Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Arch Biochem Biophys* 383, 99-107.
- Wei YD, Rannug U, Rannug A (1999). UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem Biol Interact* 118, 127-140.
- Welschen R (1973). Amounts of gonadotropins required for normal follicular growth in hypophysectomized adult rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 72, 137-155.

Wentworth JN, Buzzeo R, Pollenz RS (2004). Functional characterization of aryl hydrocarbon receptor (zfAHR2) localization and degradation in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Pharmacol* 67, 1363-1372.

White TE, Gasiewicz TA (1993). The human estrogen receptor structural gene contains a DNA sequence that binds activated mouse and human Ah receptors: a possible mechanism of estrogen receptor regulation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 956-962.

Whitelaw ML, Gustafsson JA, Poellinger L (1994). Identification of transactivation and repression functions of the dioxin receptor and its basic helix-loop-helix/PAS partner factor Arnt: inducible versus constitutive modes of regulation. *Mol Cell Biol* 14, 8343-8355.

Whitelaw ML, McGuire J, Picard D, Gustafsson J Å, Poellinger L (1995). Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4437-4441.

Whitlock JP Jr (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39,103-125.

Whitlock JP Jr, Okino ST, Dong L, Ko HP, Clarke-Katzenberg R, Ma Q, Li H (1996). Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J* 10, 809-818.

Wilhelmsson A, Whitelaw ML, Gustafsson JA, Poellinger L (1994). Agonistic and antagonistic effects of alpha-naphthoflavone on dioxin receptor function. Role of the basic region helix-loop-helix dioxin receptor partner factor Arnt. *J Biol Chem* 269, 19028-19033.

Williams PC (1945). Ovarian stimulation by oestrogens: 2.Stimulation in the absence of hypophysis,uterus, and adrenal glands. *J Endocrinol* 4, 125-136.

Wolff S, Harper PA, Wong JM, Mostert V, Wang Y, Abel J (2001). Cell-specific regulation of human aryl hydrocarbon receptor expression by transforming growth factor-beta(1). *Mol Pharmacol* 59, 716-724.

Wormke M, Stoner M, Saville B, Safe S (2000). Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Lett* 478, 109-112.

Xiong W, Ferrell JE Jr. A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision (2003). *Nature* 426, 460-465.

Yamamoto J, Ihara K, Nakayama H, Hikino S, Satoh K, Kubo N, Iida T, Fujii Y, Hara T (2004). Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci* 74, 1039-1049.

Zacharewski T, Harris M, Safe S (1991). Evidence for the mechanism of action of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated decrease of nuclear estrogen receptor levels in wild-type and mutant mouse Hepa 1c1c7 cells. *Biochem Pharmacol* 41, 1931-1939.

Zaher H, Fernandez-Salguero PM, Letterio J, Sheikh MS, Fornace AJ, Roberts AB, Gonzalez FJ (1998). The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol Pharmacol* 54, 312-321.

Zelzer E, Wappner P, Shilo BZ (1997). The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes Dev* 11, 2079-2089.

Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology* 15, 172-183.

Zhu BT, Conney AH (1998). Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res* 58, 2269-2277.