

**ESTUDIO DEL ROL DE LA HORMONA DEL EMBARAZO, GONADOTROFINA
CORIÓNICA HUMANA, EN EL ESTABLECIMIENTO, CRECIMIENTO Y DISEMINACIÓN
DE MELANOMA**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 24 de noviembre.

**ESTUDIO DEL ROL DE LA HORMONA DEL EMBARAZO, GONADOTROFINA
CORIÓNICA HUMANA, EN EL ESTABLECIMIENTO, CRECIMIENTO Y DISEMINACIÓN
DE MELANOMA**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

IVANA AYELÉN TESEI

Tribunal Evaluador

Natalia Ronci
Evaluador/a

Sabina Palma
Evaluador/a

Mercedes B. Fuertes
Evaluador/a

Susana B. Rulli
Co-Directora

Federico Jensen
Director

Virginia Pasquinelli
Tutora

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 24 de noviembre.

Mi más sincero agradecimiento:

A la UNNOBA, por permitirme estudiar y formarme de manera gratuita.

Al Dr Federico Jensen, por su dirección, su apoyo, y por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio.

A la Dr Susana Rulli por su codirección, por su paciencia, buena predisposición y gran ayuda. Por haberme abierto las puertas de su laboratorio y guiarme en todo.

A la Dra Virginia Pasquinelli, por su ayuda, orientación y buena predisposición.

A mis grandes amigos de la facultad, por tantos años compartidos, por el apoyo de siempre, sin dudas esto no hubiese sido lo mismo sin ustedes.

A mis amigas de siempre, por estar a pesar de la distancia, a pesar de todo, siempre cerca mío.

A mi familia

A Valentino, gracias por la paciencia a mamá y todo tu amor.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Melanoma	5
1.2. Embarazo y melanoma	6
1.3. hCG.....	8
1.3.1. hCG y desarrollo tumoral.....	10
1.4. Modelos experimentales aplicables al estudio del desarrollo de melanoma	10
1.4.1. Modelo de melanoma en ratones C57BL/6	10
1.4.2. Modelo transgénico de sobreexpresión hCG β^+	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
2.1. Hipótesis	13
2.2. Objetivo general.....	13
2.3. Objetivos específicos	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Modelo de melanoma en ratones C57BL/6.....	14
3.1.1. Cría y cuidados de los animales.....	14
3.1.2. Cultivo de la línea celular B16-F10.....	14
3.1.3. Diseño experimental	15
3.1.4. Evaluación del crecimiento tumoral	16
3.2. Modelo transgénico de sobreexpresión hCG β	17
3.2.1. Cría y cuidado de animales	17
3.2.2. Cruces experimentales.....	17
3.2.3. Identificación de los animales transgénicos.....	18
3.2.3.1. Extracción de ADN genómico.....	18
3.2.3.2. Técnica de PCR	19
3.2.3.3. Electroforesis en gel de agarosa	20
3.2.4. Inoculación de animales transgénicos.....	20
3.2.5. Evaluación tumoral	20
3.3. Análisis estadístico.....	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Establecimiento del modelo melanoma en hembras C57BL/6.....	21

4.1.1. Evaluación del efecto de hCG en el desarrollo del melanoma en hembras C57BL/6.....	22
4.2. Modelo transgénico de sobreexpresión hCG β	25
4.2.1. Evolución del melanoma en modelo transgénico de sobreexpresión hCG β 26	
5. DISCUSIÓN	29
5.1. Efecto de la hCG en melanoma implantado en ratones C57BL6.....	31
5.2. Evolución del melanoma en modelo transgénico de sobreexpresión hCG β	32
6. CONCLUSIÓN	34
7. BIBLIOGRAFÍA	34

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

aa: aminoácidos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

CD: célula dendrítica

CICUAL: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación

cm: centímetro

CO₂: dióxido de carbono

DMEM: Medio de cultivo "Dulbecco's Modified Eagle Medium"

dNTPs: desoxorribonucleótidos

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Fig.: Figura

FSH: hormona folículo estimulante

g: gramos

hCG: hormona gonadotrofina coriónica humana

hCG β +: ratón transgénico que sobreexpresa la subunidad β de hCG

LH: hormona luteinizante

LHCGR: receptor de hormona luteinizante y gonadotrofina coriónica

M: molar

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

MMC: melanoma maligno cutáneo

n: tamaño de la muestra

NIH: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos

NGF: factor de crecimiento nervioso

NTG: animales no transgénicos "control"

p: probabilidad

pb: pares de bases

PBS: Búffer Fosfato Salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDGF β : factor de crecimiento derivado de plaquetas β
pH: potencial hidrógeno ($-\log[H^+]$)
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecilsulfato sódico
seg: segundo
TBE: buffer TRIS bórico EDTA
TG: animales transgénicos
TGF β : factor de crecimiento transformante β
Th: linfocitos T
Treg: Linfocitos T reguladores
TRIS: hidroximetilaminometano
TSH: hormona liberadora de tirotrifinas
UBI: promotor de ubiquitina
U: unidades
UI: unidades internacionales
UV: ultravioleta
WT: *wild type*, cepa salvaje
 μg : microgramo
 μl : microlitro
 μM : micromolar

RESUMEN

El melanoma maligno cutáneo es el cáncer de piel menos frecuente pero más letal debido a su gran capacidad de generar metástasis y su quimiorresistencia, lo que lo hace altamente agresivo. Su incidencia continúa aumentando a nivel mundial, sobre todo en países con poblaciones de piel clara, con diferencias en todo el mundo.

Desde principios de la década de 1950 es de preocupación el impacto que tiene el embarazo durante el desarrollo de melanomas. En la actualidad es el cáncer más diagnosticado durante la gestación con una incidencia de 5-10 cada 100.000 embarazos.

La hormona del embarazo, gonadotrofina coriónica humana (hCG), es la primera señal que envía el embrión a la madre. Siendo producida por las células del trofoblasto primero y por la placenta después, su función principal es la de mantener la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo. Sin embargo, más recientemente se ha observado que también influye en la tolerancia inmunológica y en la angiogénesis en la interfaz materno-fetal.

En el presente trabajo el objetivo fue evaluar el efecto de la hCG sobre el establecimiento, crecimiento y diseminación de tumores inducidos por la línea murina de melanoma B16-F10 en ratones. Para ello establecimos dos modelos murinos: 1) un modelo de melanoma en ratones hembras C57BL/6 tratados con inyecciones intermitentes de hCG; 2) un modelo de melanoma en ratones transgénicos con sobreexpresión de hCG.

Pudimos observar una leve tendencia hacia un mayor crecimiento y peso tumoral, así como también una mayor agresividad en aquellos ratones tratados con hCG, pero tales diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas.

Creemos que las causas de estos resultados pudieron ser varias, partiendo de la cantidad de células tumorales inoculadas. En todos los experimentos llevados a cabo, fueron implantadas la misma concentración de células, las cuales causaron un crecimiento tumoral rápido y agresivo. Deducimos que el implantar una menor cantidad de células tumorales tal vez permitiría un avance más gradual de la enfermedad, lo cual posibilitaría evaluar de una manera más apropiada, un potencial efecto de la hCG sobre el desarrollo de melanomas en tiempos más tardíos post

inoculación. Aun así, se requieren estudios adicionales que permitan dilucidar el rol de la hormona hCG en el establecimiento, crecimiento y diseminación de melanomas.

INTRODUCCIÓN

1.1. Melanoma

El melanoma maligno cutáneo (MMC) es un tumor derivado de los melanocitos, un grupo de células con aspecto estrellado que se ubica principalmente en la capa basal de la epidermis (Ingraffea, 2013) (Fig. 1). Su función principal es proveer de melanina a sus células vecinas, los queratinocitos. La melanina es un pigmento que da color a la piel y tiene la capacidad de absorber y dispersar la radiación UV. De esta manera, los melanocitos epidérmicos son parte de un sistema de defensa contra daño del ADN inducido por la radiación UV. Estas células se dividen con muy baja frecuencia, menos de dos veces por año. Su proliferación y producción de pigmento es estimulada por el daño producido en el ADN de los queratinocitos (Shain & Bastian, 2016). Los melanocitos no están confinados sólo a la epidermis, dentro de la piel también se encuentran en los folículos capilares; y fuera de la piel, están presentes en cantidades considerables en ojos, meninges y tracto anogenital (Shain & Bastian, 2016).

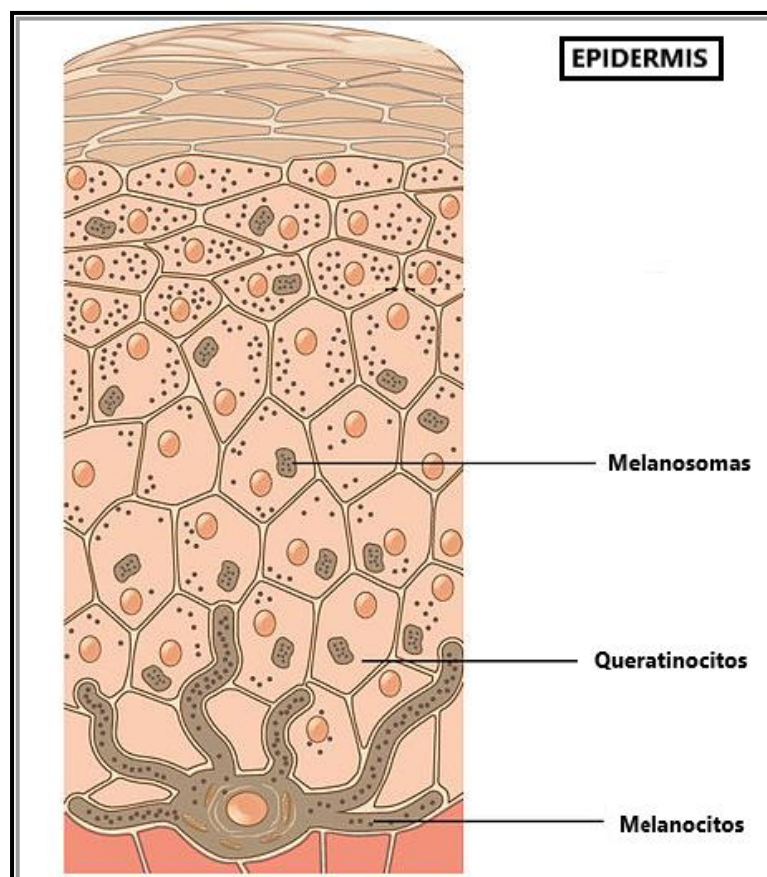


Figura 1. Esquema estructura epidermis. Los melanocitos se encuentran entre las células de la capa basal y, a través de sus dendritas, se comunican con aproximadamente 30-40 queratinocitos. Los melanocitos producen y secretan melanina que se transportan en melanosomas a los queratinocitos para protegerlos de la radiación UV. Tomado y modificado de

El MMC es el cáncer de piel más letal por su gran capacidad de generar metástasis y su quimiorresistencia, lo que lo hace altamente agresivo (Herrera González & Flores, 2010). Su incidencia continúa aumentando a nivel mundial, en la mayoría de los países con poblaciones de piel clara, con diferencias en todo el mundo. En Argentina, Chile, Brasil, Perú y Ecuador las tasas de incidencias son menores a 3 por 100.000 (Loria et al., 2020). Curiosamente, la mayoría de los datos epidemiológicos han notado una divergencia significativa de género, en donde la incidencia en hombres ha aumentado más rápidamente en comparación con mujeres en todas las categorías de edad, excepto para las mujeres jóvenes (<39 años) que parecen estar en mayor riesgo (Dika et al., 2019).

Está ampliamente demostrado que el MMC es de los tumores más inmunogénicos. Algunas características que dan evidencia de la intervención del sistema inmune son la regresión parcial o total de melanomas primarios, la gran infiltración linfocitaria presente en los tumores, la expansión clonal de células citotóxicas T CD8⁺ específicas para antígenos asociados al tumor, las áreas o el “halo” de despigmentación que se presentan en algunas lesiones o lunares, o que el desarrollo de vitíligo esté asociado a un buen pronóstico en pacientes con melanoma (Mukherji, 2013). Más aún, en los últimos años surgieron diferentes drogas como el ipilimumab, pembrolizumab y nivolumab que contrarrestan los mecanismos de tolerancia inducidos por el tumor. El éxito terapéutico de estos tratamientos demuestra claramente la importante interacción entre el sistema inmune del hospedador y el desarrollo de melanomas (Linck et al., 2017).

Durante su desarrollo, las células tumorales interactúan con los componentes del sistema inmune, cuya actividad funcional está dirigida a prevenir la progresión del melanoma (Tucci et al., 2019). Tanto las células inmunes como las del melanoma se someten a un proceso de inmuno-edición que incluye fases interconectadas como eliminación, equilibrio, y escape o evasión inmunológica (Tucci et al., 2019). La transición entre estas fases se ajusta por el estado del sistema inmune y la actividad de las células cancerígenas (Antohe et al., 2019).

1.2. Embarazo y melanoma

El embarazo representa una situación única desde el punto de vista inmunológico, durante la cual el sistema inmune materno debe ser capaz de simultáneamente tolerar la presencia de antígenos semi-alogénicos presentes en el feto y defender a la madre contra agentes patógenos. Esto requiere el desarrollo de distintos mecanismos de tolerancia inmunológica altamente regulados (Muzzio et al., 2014).

Se han descrito tres tipos de estados o perfiles inmunológicos que se corresponden con las etapas de desarrollo fetal: primero, una etapa pro-inflamatoria, caracterizada por un perfil inmunológico Th1, la cual es necesaria para la implantación exitosa del blastocisto y posterior placentación. Posteriormente, sigue una etapa de rápido crecimiento y desarrollo fetal, donde se produce un cambio hacia un perfil Th2 anti-inflamatorio. Esta etapa es la más extensa del embarazo, donde tienen un rol central las células T reguladoras (Treg). Debido a su actividad inmunosupresora, favorecen la tolerancia hacia el feto, manteniendo de esta manera, la homeostasis del sistema. Por último, hacia el término del embarazo, se desencadena una segunda etapa pro-inflamatoria con un perfil Th1, la cual es indispensable para el inicio del parto (Mor et al., 2017). Cabe destacar que, las hormonas del embarazo como la progesterona, el estradiol y la gonadotropina coriónica humana (hCG) son también fundamentales en el establecimiento, mantenimiento y desenlace exitosos. Dichas hormonas ejercen propiedades moduladoras muy importantes sobre el sistema inmunológico materno y son esenciales para la formación de un entorno tolerogénico favorable necesario para el mantenimiento del embarazo (Muzzio et al., 2014).

Desde principios de la década de 1950, fue de preocupación el impacto del embarazo en el melanoma maligno (Jhaveri et al., 2011). Esto comenzó con el reporte de casos que sugerían que el embarazo podría inducir la transformación de lunares preexistentes en melanoma maligno, aumentar el riesgo de metástasis en un MMC ya establecido, o favorecer la recurrencia del mismo (Byrd & McGanity, 1954) (Pack & Scharnagel, 1951). En la actualidad el MMC es el cáncer más diagnosticado durante el embarazo, con una incidencia de 5-10 cada 100.000 embarazos (Richtig et al., 2017). Aún más, se ha demostrado en modelos animales que durante la gestación, los melanomas son más agresivos, presentan un crecimiento más rápido, así como una mayor mortalidad (Khosrotehrani et al., 2011).

Durante el embarazo se pueden observar ciertas particularidades que dan evidencia de un aumento de la actividad melanocítica y consecuente hiperpigmentación: el melasma, la línea negra, el oscurecimiento genital y areolar son eventos bien conocidos. Estas condiciones parecen estar relacionadas con niveles elevados de estrógeno, progesterona, y la hormona estimulante de melanocitos (Zelin et al., 2020).

El estado fisiológico y los procesos inmunológicos que ocurren durante el embarazo muestran similitudes con los procesos inmunes que suceden en la progresión de un tumor (Mor et al., 2017), donde el estado de inmunosupresión favorece el crecimiento y tolerancia de las células cancerígenas (Driscoll et al., 2016). Estos cambios se han propuesto como posibles mecanismos por los cuales el embarazo podría contribuir a peores pronósticos en el melanoma (Ko et al., 2019).

1.3. hCG

La hormona hCG pertenece a la familia de las hormonas glicoproteicas, junto con las hormonas leutinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y la estimulante de la tiroides (TSH) hipofisarias. Se trata de un heterodímero formado por dos subunidades asociadas de forma no covalente (Fig. 2). La subunidad α , compuesta por 92 aminoácidos, está codificada en el cromosoma 6, y es común entre todos los miembros de la familia. La subunidad β , que es diferente para cada hormona, y la que les confiere la especificidad, está codificada en diferentes genes del cromosoma 19 (LH, hCG y TSH) y en el cromosoma 11 (FSH). La subunidad β de la hCG, con 145 aa es la de mayor tamaño y mayor dominio glicosilado, lo que le da a la hormona una mayor estabilidad (Policastro et al., 1986). Sólo los dímeros α/β de hCG son biológicamente activos (Gharib et al., 1990).

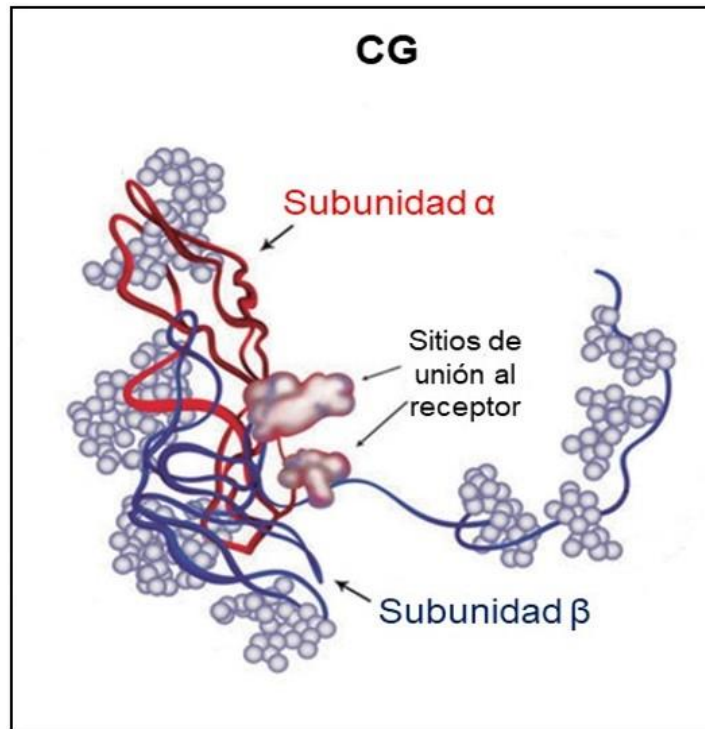


Figura 2. Estructura de la hormona hCG. Modelo tridimensional de la molécula de hCG con las subunidades α (rojo) y β (azul). Tomado y modificado de Leão & Esteves (2014)

Desde hace mucho tiempo, las hormonas LH y hCG se consideraron equivalentes porque se unen al mismo receptor, el receptor de hormona luteinizante y gonadotropina coriónica (LHCGR), que se expresa principalmente en las gónadas (Casarini et al., 2018). Sin embargo, ambas hormonas evolucionaron de manera divergente en los primates y se caracterizan por diferencias a nivel genético, molecular y fisiológico (Casarini et al., 2018).

A diferencia de otras hormonas glicoproteicas que son sintetizadas por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria, la hCG es producida principalmente por trofoblastos, y se trata de una de las primeras señales proporcionadas por el embrión a la madre (Schumacher, 2017). Durante mucho tiempo su función principal conocida fue la promoción de la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo al comienzo del embarazo. Sin embargo, más recientemente, se han descrito muchas otras funciones (Heidegger & Jeschke, 2018). Principalmente, se ha observado que influye profundamente en la tolerancia inmunológica y la angiogénesis en la interfaz materno-fetal (Tsampalas et al., 2010). Interviene en mecanismos como la regulación de apoptosis, balance de células inflamatorias y antiinflamatorias (Th1/Th2), y asimismo, influye en el bienestar fetal regulando la funcionalidad y el fenotipo de las CD, células Treg y células B (Schumacher, 2017).

Curiosamente, el receptor de hCG se descubrió por primera vez en neoplasias trofoblásticas, lo que sugirió que tiene un papel importante en la regulación del crecimiento y la invasión no solo en el embarazo, sino también en el cáncer (Enninga et al., 2014).

1.3.1. hCG y desarrollo tumoral

La expresión de hCG y, en particular, su subunidad β (hCG β) se ha documentado en el 30-60% de los tumores de diferente origen como el de mama, pulmón, hígado, cerebro, próstata, cabeza y cuello, ovario, riñón, y del sistema neuroendocrino (Bose et al., 2013; Singh et al., 2018). Su presencia se asocia frecuentemente con un mal pronóstico, ya que se correlaciona con una mala respuesta al tratamiento (Bose et al., 2013). Se postula que, de manera similar a la forma en que la hCG promueve la angiogénesis durante la formación de la placenta y modula el sistema inmunológico de la madre hacia la inmunotolerancia del feto, esta hormona podría desempeñar funciones análogas en la oncogénesis. Se dice que esta acción de la hCG contribuye a la neovascularización, así como a la desensibilización del sistema inmunológico hacia las células cancerosas.

A pesar de numerosos estudios sobre el papel de la hCG y sus subunidades libres en la carcinogénesis, las funciones biológicas y los mecanismos detrás de su acción siguen siendo desconocidos (Bose et al., 2013).

1.4. Modelos experimentales aplicables al estudio del desarrollo de melanoma

Los ratones como modelo animal poseen varias ventajas las cuales son: su tamaño pequeño, bajo costo de mantenimiento, la rapidez de su reproducción y cantidad de individuos por camada, y la posibilidad de poder ser manipulados genéticamente.

1.4.1. Modelo de melanoma en ratones C57BL/6

Este modelo de melanoma es obtenido a partir de una transferencia singénica (Becker et al., 2010). La cepa de ratones C57BL/6 es susceptible a la línea celular cancerígena B16-F10 de melanocitos. Las células B16-F10 son una línea celular de melanoma murino generadas a partir de 10 ciclos de inoculación y recuperación en el pulmón de células B16-F0 en ratones C57BL/6 (Fidler, 1973) (Fig. 3). Tras la inyección subcutánea, al cabo de 5 a 10 días inducen un tumor palpable superficial y notablemente visible en el lugar de inoculación, el cual crece hasta convertirse en un tumor de 1 × 1 × 1 cm en 14 a 21 días. Cuando se les permite crecer más, los tumores a menudo se vuelven necróticos en el centro y comienzan a ulcerarse o sangrar; es recomendable sacrificar los ratones antes de este punto. Esta línea celular estimula la angiogénesis activa que conlleva principalmente a una metástasis pulmonar (Overwijk & Restifo, 2001).

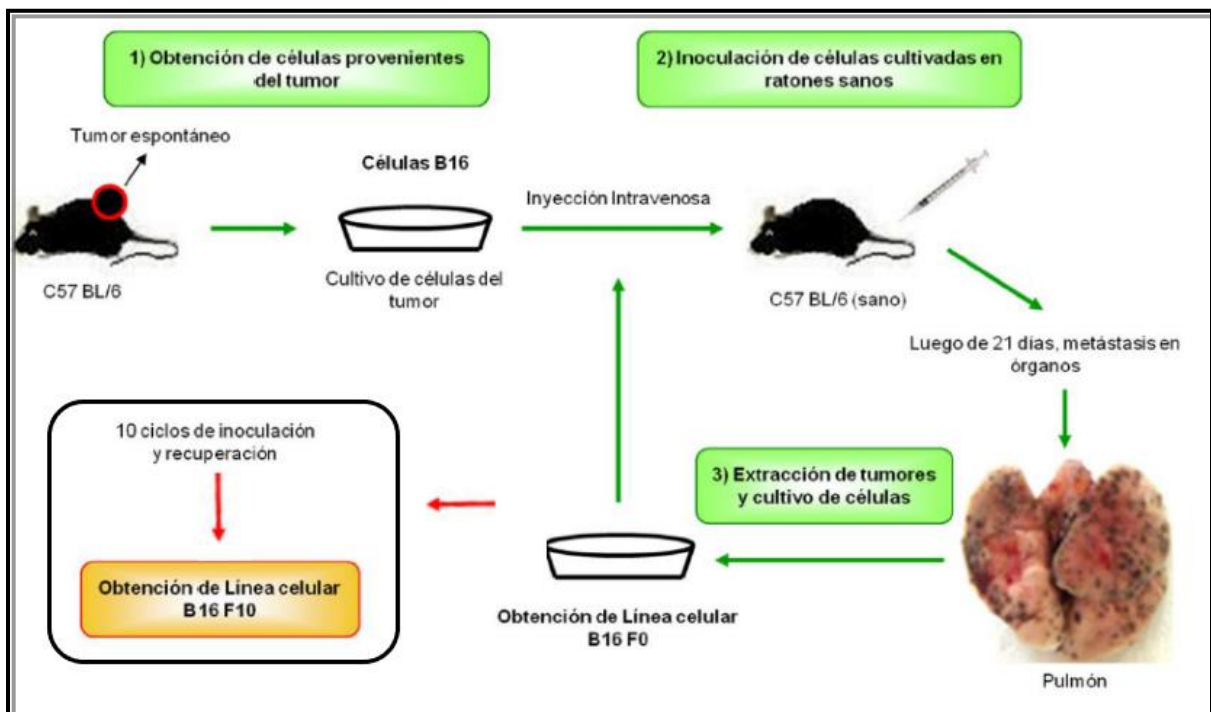


Figura 3. Generación de células B16-F10. La población de células tumorales parentales de células B16-F0 se aisló de un melanoma espontáneo en ratones C57BL6. A continuación, estas células se seleccionaron por su capacidad para colonizar el pulmón tras la inyección intravenosa. Dichas células se expandieron en cultivo y luego se inyectaron nuevamente en la vena de la cola de un nuevo ratón. Este proceso se repitió diez veces y la población resultante se denomina células B16-F10 (Fidler, 1973).

1.4.2. Modelo transgénico de sobreexpresión hCG β ⁺

El término transgénico fue introducido en 1981 por Gordon y Ruddle, y refiere a aquellos organismos a los cuales se les ha incorporado un gen exógeno con el fin de cambiar caracteres existentes o introducir nuevos. Dicho gen se halla en todas las células del organismo y en la línea germinal, transmitiéndose de forma mendeliana a la descendencia (Costa Valles, 1995). La utilización de animales manipulados genéticamente ha dado una nueva dimensión al estudio de la función de los genes *in vivo*, permitiendo la creación de modelos animales para el estudio de patologías humanas (Marcial, 2015).

El modelo transgénico hCG β ⁺ sobre-expresa el ADNc de la subunidad hCG β . Fue desarrollado a partir de la cepa FVB/n mediante la microinyección pronuclear del transgén en ovocitos fertilizados (Fig. 4). Los embriones microinyectados se implantaron en oviductos de hembras pseudopreñadas (Rulli et al., 2002).

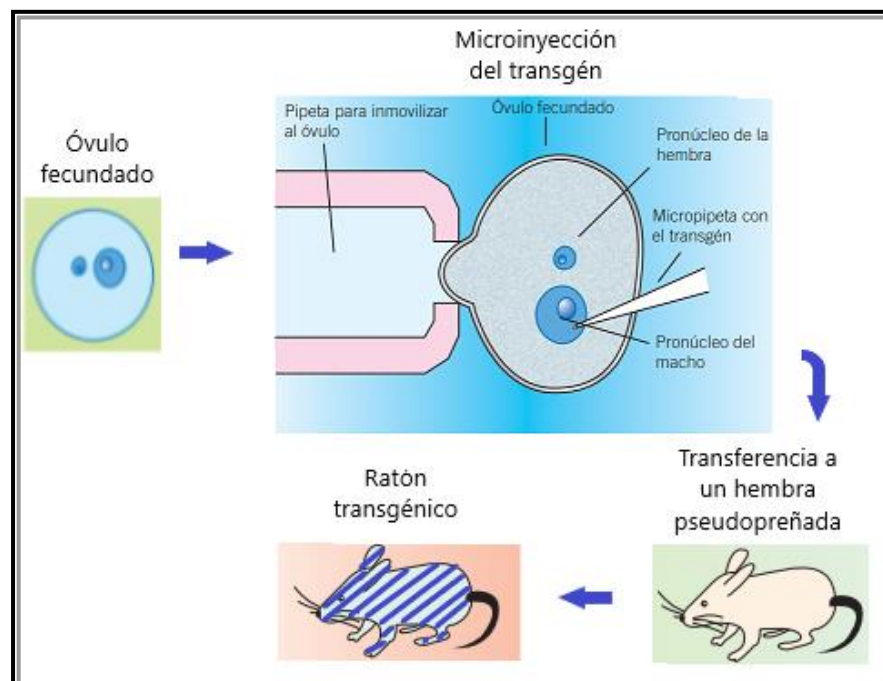


Figura 4. Generación de animales transgénicos por la técnica de inyección pronuclear. El transgén es inyectado utilizando una micropipeta, en el pronúcleo del macho de un óvulo fecundado, para su integración en el genoma, poco antes de la fusión de ambos pronúcleos. Tomado y modificado de Salazar Monte et al. (2019)

El promotor universal utilizado para el transgén, la ubiquitina C, no responde a la retroalimentación negativa de las hormonas gonadales y permite la expresión

del mismo en múltiples tejidos, incluida la glándula pituitaria, en la que el acoplamiento con la subunidad α común endógena produce la síntesis de altos niveles de hCG bioactiva (Rulli et al., 2002).

Los animales transgénicos utilizados en este trabajo fueron generados en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Turku (Finlandia); actualmente se mantienen en reproducción en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

“La gonadotropina coriónica humana facilita el establecimiento, crecimiento y diseminación de melanomas.”

2.2. Objetivo general

El objetivo general fue evaluar el efecto de la hCG sobre el desarrollo de tumores inducidos por la línea murina de melanoma B16-F10 en ratones.

2.3. Objetivos específicos

1. Establecer un modelo de melanoma en ratones hembras C57BL/6 inducido por inoculación subcutánea de células B16-F10.
2. Investigar el efecto de la hCG sobre el establecimiento y crecimiento de melanoma en hembras C57BL/6.
3. Evaluar el establecimiento, crecimiento y diseminación de melanoma en un modelo murino transgénico con sobreexpresión de hCG.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo consta de dos partes, en las cuales se utilizaron distintos modelos murinos. La primera fue realizada en el Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; y la segunda parte fue realizada en colaboración con el Laboratorio de Endocrinología Molecular de la Reproducción de la Dra. Susana Rulli en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).

3.1. Modelo de melanoma en ratones C57BL/6

3.1.1. Cría y cuidados de los animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6 de entre 7-8 semanas de edad provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA. La misma se mantuvo durante todo el período de experimentación en el Bioterio del CEFyBO, Facultad de Medicina-UBA, en condiciones controladas de luz y temperatura (12 horas luz, 12 horas oscuridad, a 20-23 °C). Fueron alimentadas *ad libitum* hasta el momento de su sacrificio, respetándose en todo momento las reglas de la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH). Todos los experimentos fueron evaluados y aprobados por La Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

3.1.2. Cultivo de la línea celular B16-F10

La línea celular B16-F10 se mantuvo en cultivo a 37 °C y 5% CO₂, en medio DMEM completo (DMEM, suero bovino fetal 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml). Al momento de preparar el inóculo, se descartó el medio, se lavó dos veces la placa de cultivo con PBS estéril, se agregó tripsina y se incubó 5 min a 37°C. Luego se retiraron las células y se colocaron en medio completo, se

centrifugaron 5 min a 1500 rpm y se resuspendió el pellet en medio DMEM solo. Las células se contaron en una cámara de Neubauer con una dilución 1:100 en azul de Tripán y se resuspendieron en PBS pH 7.2. La concentración de células inoculadas fue de 200.000 células en un volumen de 200 μ l por ratón (Fig. 5).

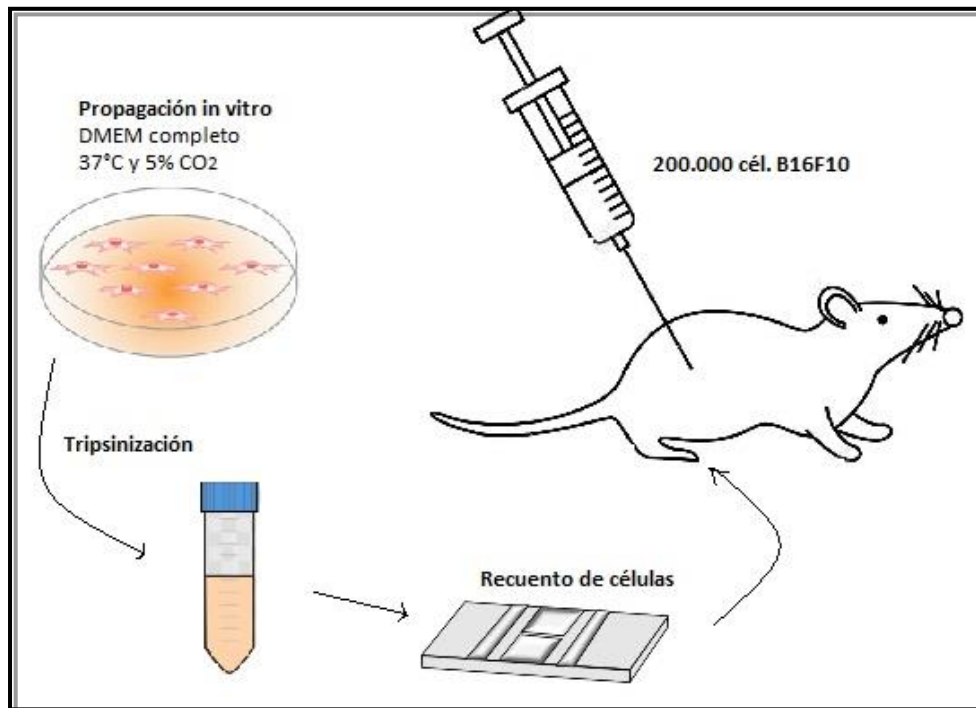


Figura 5. Esquema preparación inóculo células B16-F10.

3.1.3. Diseño experimental

Hembras C57BL/6 de 7-8 semanas de edad fueron inoculadas mediante una inyección subcutánea de 200.000 células tumorales B16-F10 en el flanco derecho de la región abdominal del animal. Las hembras inoculadas fueron divididas en 2 grupos experimentales. El primer grupo fue tomado como “control” y se le administró 200 μ l PBS, mientras que al segundo grupo, “hCG”, se le administró 10 UI de hCG (Pregnyl) en un volumen de 200 μ l de PBS, vía intraperitoneal 3 veces por semana. La primera aplicación de hCG se realizó al día siguiente post inoculación, y se continuó hasta el día del sacrificio (Fig. 6).

Se realizaron 2 repeticiones. En la repetición 1, el tiempo de evaluación del crecimiento del tumor fue de 22 días, con un n=8, compuesto por 4 animales

“control” y 4 animales “hCG”. En la repetición 2, el tiempo de evaluación del tumor fue de 18 días, con un n=12, compuesto por 6 animales “control” y 6 animales “hCG”.

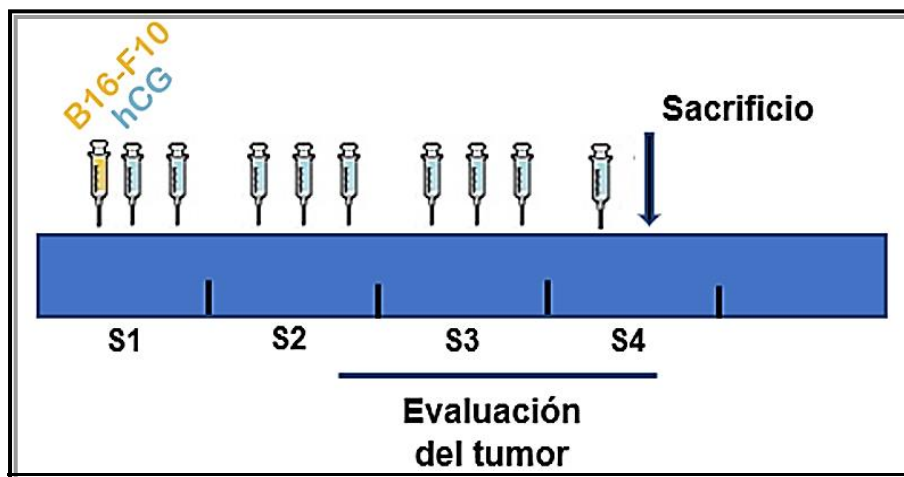


Figura 6. Esquema del diseño experimental del modelo tumoral murino C57BL/6. Se inocularon hembras C57BL/6 con la línea tumoral murina B16-F10 y fueron tratadas 3 veces por semana con PBS o hCG durante 18 o 22 días hasta el sacrificio.

3.1.4. Evaluación del crecimiento tumoral

Los ratones comenzaron a ser evaluados el día 11 post-inoculación mediante palpación en el flanco derecho para detectar la presencia de tumores. Se realizaron mediciones del tamaño del tumor con un calibre Vernier (Fig. 7), 3 veces por semana, en coincidencia con los días de administración de hCG. Las medidas tomadas fueron de ancho y largo, y se calculó un área estimativa.

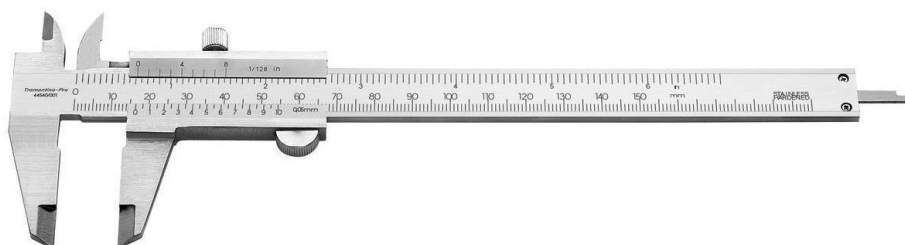


Figura 7. Calibre Vernier

Al final del experimento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Para la extracción del tumor se realizó un corte longitudinal en el abdomen del ratón de modo de exponer la zona del tumor. Una vez extraído, se tomó dato de

su peso. Además, se extrajo tejido de hígado y pulmones para la búsqueda de nódulos metastásicos.

3.2. Modelo transgénico de sobreexpresión hCG β

3.2.1. Cría y cuidado de animales

Se utilizaron ratones transgénicos portadores del gen correspondiente a la subunidad β de la hCG. Los mismos se mantuvieron durante el período de experimentación en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires), en condiciones controladas de luz y temperatura (12 horas luz, 12 horas oscuridad, a 20-23 °C). Fueron alimentados *ad libitum* hasta el momento de su sacrificio, respetándose en todo momento las reglas de la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH). Todos los procedimientos experimentales han sido previamente aprobados por el CICUAL del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

3.2.2. Cruces experimentales

Para evitar el rechazo inmunológico de la línea celular B16-F10, la cual fue desarrollada en animales de la cepa C57BL/6, se programaron cruzamientos entre esta cepa y los animales transgénicos a utilizar. Se llevaron a cabo los siguientes apareamientos: hembras C57BL/6 con machos FVB/n hCG β^+ para obtener una F1 FVB/C57BL simple transgénica hCG β^+ (Fig. 8). Las crías provenientes de dichos cruzamientos, luego del destete se separaron por sexo, se identificaron mediante muescas en las orejas, y se obtuvo una biopsia de cola (<1cm) para ser posteriormente genotipificadas, con el fin de detectar el transgén en su genoma.

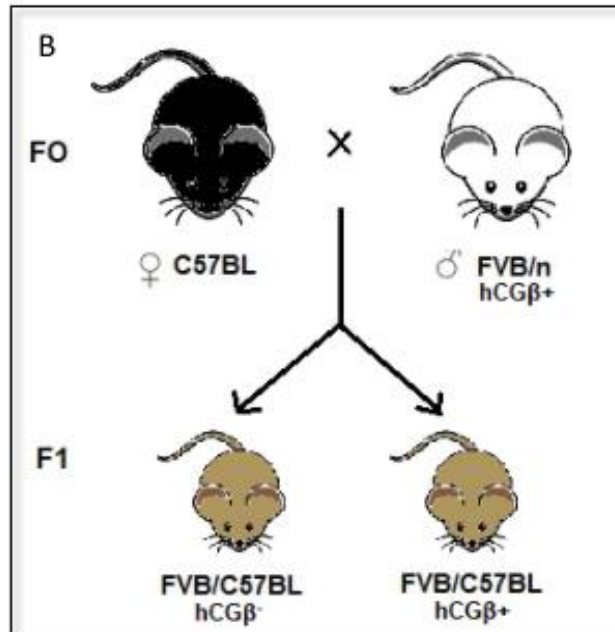


Figura 8. Cruzamiento hembra C57BL x macho FVB/n hCGβ+ para obtener F1 hCGβ- (control) y hCGβ+ (TG).

3.2.3. Identificación de los animales transgénicos

La identificación de los animales transgénicos se realizó a partir de análisis de ADN genómico por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras se obtuvieron a partir de biopsias de colas de las crías de aproximadamente 10-12 días de edad.

3.2.3.1. Extracción de ADN genómico

El tejido obtenido de las biopsias de cola se colocó en un buffer de lisis conteniendo TRIS 10 mM, EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich Chemical Co.), acetato de Na 0,3 M, SDS 1%, pH=8 (MP Biomedicals), proteinasa K (USB) 10 mg/ml, y se incubó 16-18hs a 37°C. Luego se agregó una solución de NaCl sobresaturada, se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 15 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se agregó etanol 96% y centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, descartándose posteriormente el sobrenadante. Luego se lavó el precipitado con etanol 70%, se centrifugó a 12000 rpm nuevamente durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se dejó secar. Por último, se disolvió el precipitado en

agua destilada estéril y se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la determinación del genotipo por PCR.

3.2.3.2. Técnica de PCR

La PCR se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos sintéticos específicos (*primers*) para el transgén, correspondientes a la secuencia del promotor en dirección sentido (UBI) y de la subunidad hCG β en dirección antisentido (Fig. 9, Tabla 1)

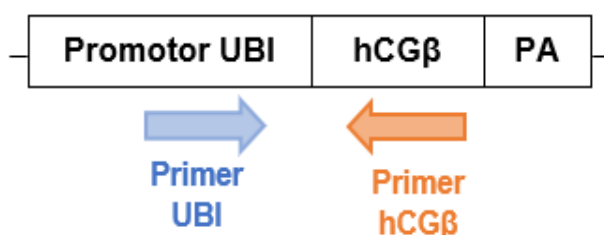


Figura 9. Construcción de los *primers* específicos para la subunidad hCG β de la hCG utilizados en la identificación de los ratones transgénicos. PA: cola de poliadenilación. UBI: Ubiquitina C

	Secuencia
UBI (Sentido)	5' TCAGTGTTAGACTAGTAAATTG 3'
hCG β (Antisentido)	5' CAGCCCTCCTTCTCCACA 3'

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección del genotipo de los ratones transgénicos por PCR.

Se agregaron 2 μl de la suspensión de ADN genómico a una mezcla de reacción de 28 μl conteniendo: buffer de reacción (1X), MgCl $_2$ 1.67 mM (Invitrogen), dNTPs 0,17 mM (Invitrogen), 50 UI de ADN polimerasa (Taq, Invitrogen), oligonucleótido UBI 0,33 μM y oligonucleótido hCG β 0,33 μM . Como control positivo se utilizó ADN de un animal de genotipo hCG β^+ ; como controles negativos se incluyeron un tubo con ADN de un animal WT y un tubo con la mezcla de reacción en ausencia de ADN. La PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad con los siguientes tiempos y temperaturas de reacción: 4 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (desnaturalización de ADN), 35 ciclos de 30 seg a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (desnaturalización), 1 min a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (hibridación) y 1 min 30 seg a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguidos por un ciclo final de 6 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (extensión).

3.2.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos provenientes de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (Biodynamics) 2% en buffer TBE (TRIS 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 20 mM, pH=8) conteniendo bromuro de etidio (Promega). Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV y se compararon con un marcador de fragmentos de ADN de número de pb conocidas (Invitrogen). El fragmento correspondiente a hCG β^+ tiene un tamaño de 290 pb.

3.2.4. Inoculación de animales transgénicos

Se utilizaron ratones F1 transgénicos hCG β^+ y no transgénicos hCG β^- de 7-8 semanas de edad. Estos últimos fueron tomados como grupo “control”.

En este experimento se incluyeron animales machos y hembras. La línea celular tumoral B16-F10 se mantuvo en las mismas condiciones indicadas en el ítem 3.1.2, así como la preparación del inóculo. Las células tumorales fueron introducidas mediante una inyección subcutánea de 200 μ l en el flanco derecho de los animales.

3.2.5. Evaluación tumoral

El tiempo de evaluación del crecimiento del tumor fue de 18 días post inoculación hasta el sacrificio. Se realizaron mediciones diarias del tamaño del tumor con un calibre Vernier a partir de la aparición del mismo, así como también del peso de los animales. Las medidas tomadas del tumor fueron de ancho y largo, y se calculó un área estimativa. Al final del experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina. Para la extracción del tumor se realizó un corte longitudinal en el abdomen del ratón para exponer la zona del tumor, extraerlo y pesarlo.

3.3. Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó utilizando el programa de estadística Graphpad Prism v7.0. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas mediante la prueba t de Student, o el test χ^2 . Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Establecimiento del modelo melanoma en hembras C57BL/6

En primera instancia se logró cultivar con éxito la línea celular de melanoma murino B16-F10, siguiendo las indicaciones de la organización ATCC (American Type Culture Collection). La misma se utilizó para todos los experimentos realizados. Estas células, *in vitro* crecen como una población adherente que adopta una morfología epitelial (Fig. 10).



Figura 10. Morfología línea celular melanoma murino B16-F10. Objetivo 10x.

In vivo, el implante de células B16-F10 tiene como resultado tumores sólidos que crecen agresivamente. Es importante señalar que, para el desarrollo efectivo de tumores, es fundamental una buena técnica de inyección. Cada ratón debe mostrar,

en el sitio de aplicación, una "ampolla" claramente visible y definida al momento de la inyección; si no es así, los ratones pueden mostrar un retraso en el crecimiento del tumor o ningún crecimiento.

En los experimentos realizados se pudo corroborar que el melanoma B16 es una neoplasia fácilmente trasplantable en su portador singénico. Con la técnica utilizada de inoculación subcutánea de las células tumorales, se consiguió un 100% de crecimiento tumoral en el primer experimento, en sus dos repeticiones.

4.1.1. Evaluación del efecto de hCG en el desarrollo del melanoma en hembras C57BL/6

Para evaluar si la hCG tiene algún efecto sobre el desarrollo del melanoma se formaron dos grupos de ratones hembras C57BL/6 inoculadas con 200.000 células B16-F10, y se trataron con o sin hCG (10 UI / ratón) tres veces por semana desde el día 1 post inoculación tumoral hasta el sacrificio. En este experimento se evaluó el desarrollo del tumor, así como el bienestar de los animales a través de los siguientes parámetros: a) área y peso tumoral, b) ulceraciones y metástasis, y c) peso corporal de los ratones y mortalidad.

Este experimento tuvo 2 repeticiones. La primera tuvo una duración de 22 días. La segunda repetición fue llevada a cabo en las mismas condiciones que la anterior, pero con una duración de 18 días. El día del sacrificio se estableció de acuerdo al estado general de los animales y la bibliografía consultada, la cual indica que los tumores alcanzan un tamaño considerable a los 14-21 días. Luego de tal punto, si se les permite crecer más, se vuelven necróticos y comienzan a ulcerarse (Overwijk & Restifo, 2001).

a) Área y peso tumoral

En la primera repetición, la aparición tumoral fue el día 13 post inoculación. Se midió la masa tumoral desde su aparición hasta el sacrificio de los animales, y se calculó un área estimativa. El día del sacrificio (día 22) los tumores de los animales del grupo hCG, se encontraban con grandes úlceras, lo que llevó a una gran pérdida de masa tumoral. Por tal motivo, en los mismos no pudo realizarse la medición

correspondiente (Fig. 11 A). La Figura 11 B muestra el peso de los tumores extraídos al final del experimento.

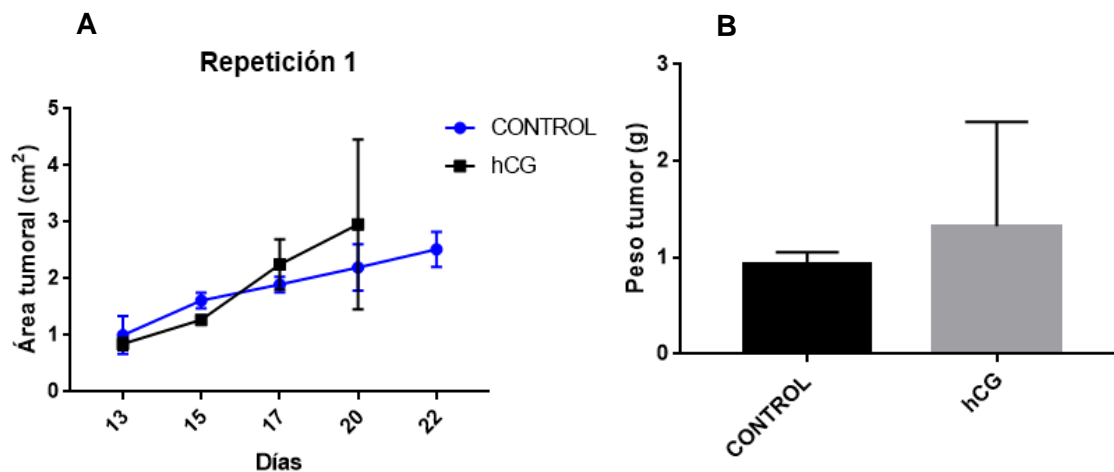


Figura 11. A) Área tumoral a diferentes momentos post implantación en ratones Control (n=3) y tratados con hCG (n=4) en la primera repetición. B) Peso tumoral (g) de ambos grupos. Los datos fueron analizados mediante t-test y se expresan como media \pm desviación estándar.

En la segunda repetición, la aparición tumoral fue el día 11 post inoculación. Los animales fueron evaluados de la misma manera que en la repetición anterior, sólo que se decidió disminuir el tiempo de evaluación a 18 días totales (Fig. 12).

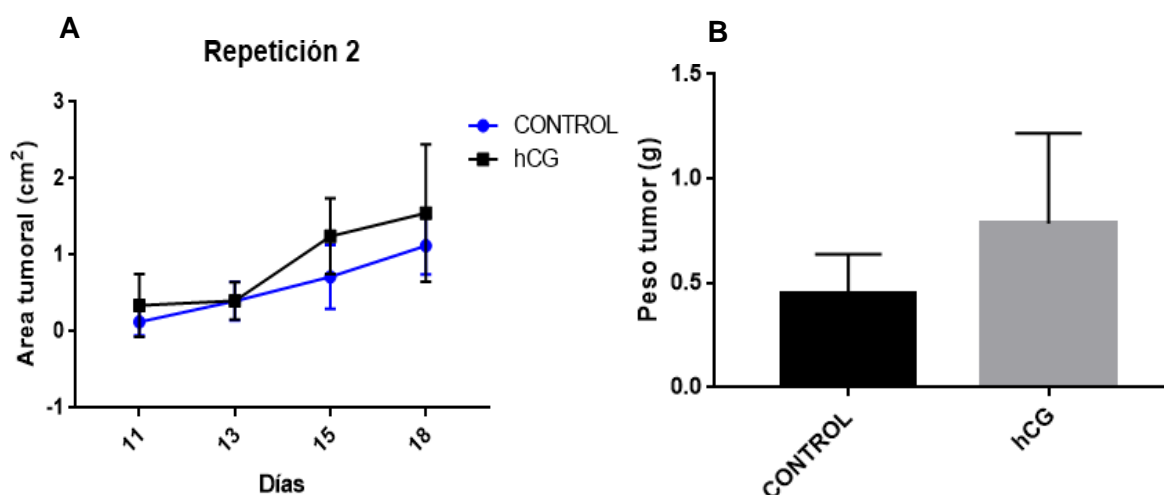


Figura 12. A) Área tumoral a diferentes momentos post implantación en ratones Control (n=6) y tratados con hCG (n=6) en la segunda repetición. B) Peso tumoral (g) de ambos grupos. Los datos fueron analizados mediante t-test y se expresan como media \pm desviación estándar.

Si bien los ratones tratados con hCG mostraron, en ambas repeticiones (1 y 2), una leve tendencia hacia un mayor tamaño y peso tumoral comparado a ratones controles, estas diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas.

b) Ulceraciones y metástasis

Los tumores, cuando se les permite crecer, a menudo se vuelven necróticos en el centro y comienzan a ulcerarse o sangrar; es recomendable sacrificar los ratones antes de este punto. En ambas repeticiones, fue mayor el porcentaje de ratones con sus tumores ulcerados en el grupo “hCG” comparado con el grupo control al final del experimento. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, cabe destacar que, en la primera repetición, el 100% de los animales del grupo “hCG” presentaron ulceraciones, mientras que sólo el 33% (1/3) de los ratones “control” presentaron este síntoma (Fig. 13).

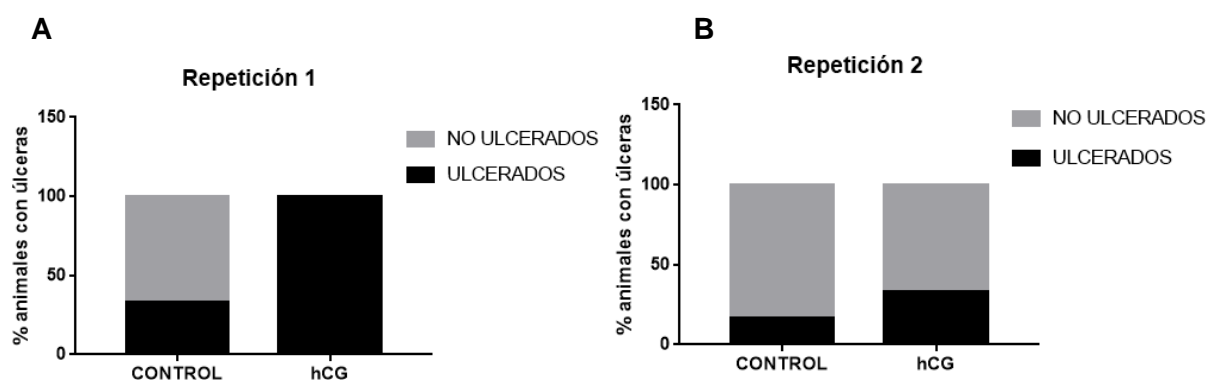


Figura 13. Porcentaje de animales control y tratados con hCG, con o sin úlceras en sus tumores al final del tratamiento, A) en la primera repetición (n=3 y n=4, respectivamente) y B) en la segunda repetición (n=6 y n=6). Datos analizados por test χ^2 .

Este modelo de melanoma, además, se caracteriza por la generación de metástasis a distancia, principalmente en pulmones. Sin embargo, en el presente estudio al último momento de observación, 18-22 días después de la implantación, no se observó macroscópicamente el desarrollo de metástasis en ninguno de los grupos, en ningún experimento.

c) Peso corporal y mortalidad de ratones

Los ratones fueron pesados al momento del sacrificio (Fig. 14). No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos en ambas repeticiones.

Sólo se registraron dos muertes, en la segunda repetición. Un ratón de cada grupo, los cuales se encontraban con sus tumores ulcerados.

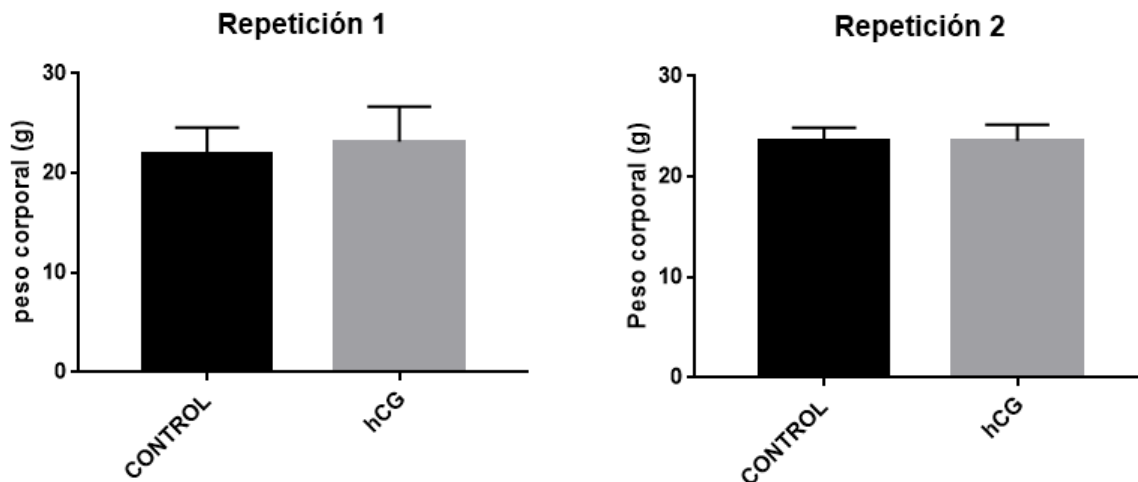


Figura 14. Peso promedio corporal (g) y su desviación estándar de ratones control y tratados con hCG. Se muestran los resultados de las dos repeticiones separadamente. Datos analizados mediante t-test.

Debido a que en los dos experimentos anteriores observamos una gran variabilidad en todos los parámetros estudiados, una de las posibles causas de esta distorsión podría estar relacionada con las inyecciones intermitentes de hCG. Sobre todo, en los días avanzados post inoculación, cuando se dificulta la manipulación de los animales para la inyección debido al crecimiento del tumor. Por lo tanto, decidimos utilizar un modelo transgénico para el gen de la subunidad beta de la hCG de manera que estos animales en vez de recibir inyecciones de hCG, tienen una exposición endógena constante de la misma.

4.2. Modelo transgénico de sobreexpresión hCG β

Para este experimento fue necesario realizar cruzamientos entre los animales transgénicos y la cepa C57BL/6 como fue descrito en el ítem 3.2.2. Luego se identificó a las crías transgénicas en base a la presencia o ausencia del transgén hCG β mediante análisis de ADN genómico por PCR. El análisis de PCR reveló un

producto de ~290 pb en aproximadamente la mitad de los animales (45% hCG β ⁺ y 55% hCG β ⁻), tal como se esperaba (Fig. 15).

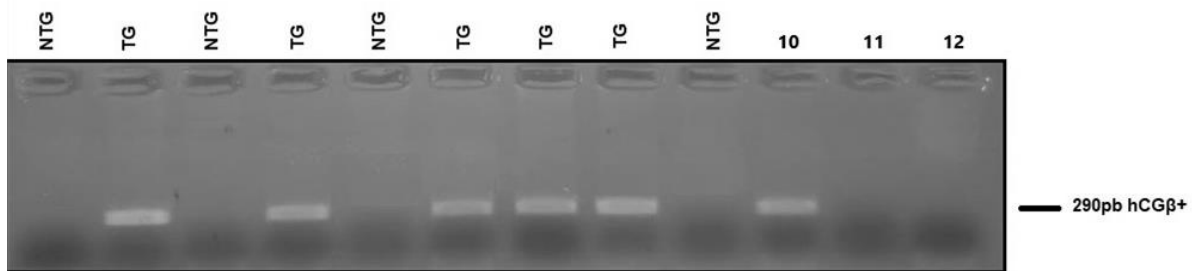


Figura 15. Detección del transgén hCG β por PCR de ADN genómico. Calles de 1 a 9: muestras de crías transgénicas (TG) y no transgénicas (NTG). Calle 10: control positivo de un animal hCG β ⁺; calle 11: control negativo de un animal WT; calle 12: control negativo en ausencia de

4.2.1. Evolución del melanoma en modelo transgénico de sobreexpresión hCG β

Ratones F1 transgénicos hCG β ⁺ y no transgénicos de ambos sexos fueron inoculados vía subcutánea con 200.000 células de melanoma B16-F10. Se evaluó el desarrollo del tumor, así como el bienestar de los animales a través de los siguientes parámetros: a) área y peso tumoral, b) ulceraciones y metástasis, y c) peso corporal de los ratones y mortalidad.

a) Área y peso tumoral

Mediante la técnica de inoculación tumoral subcutánea se obtuvo un 92% de éxito. Todos los animales desarrollaron tumores excepto dos en los que se observó un tumor sólo “palpable” y se excluyeron del análisis.

La aparición del tumor ocurrió el día 11 post inoculación, tanto en machos como en hembras. Se evaluó el crecimiento tumoral de cada grupo del día 11 al 17 (Fig.16). En ambos sexos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para los días analizados.

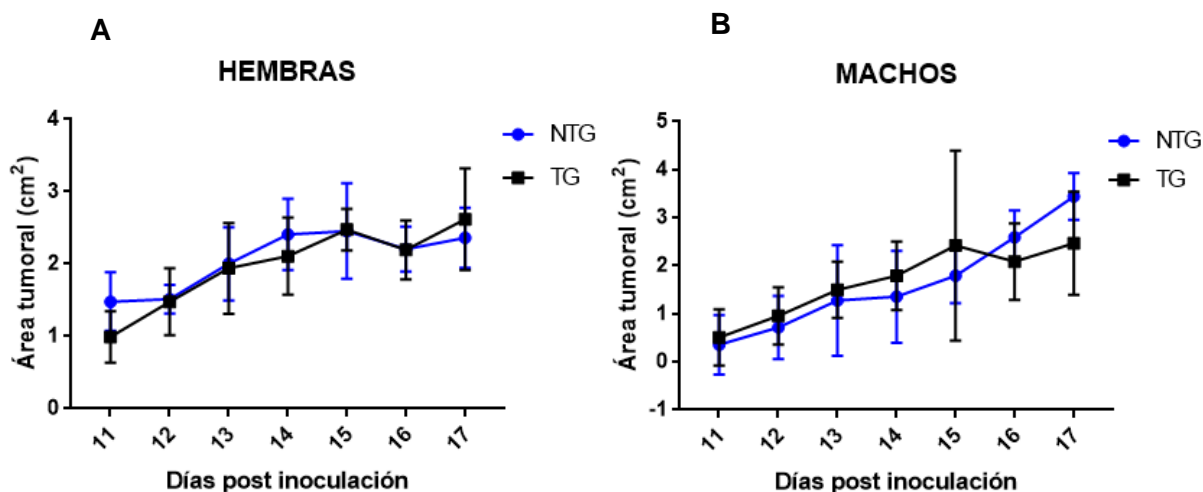


Figura 16. Área tumoral a diferentes momentos (días 11 a 17) post implantación en ratones A) hembras (NTG n=6; TG n=5) y B) machos (NTG n=3; TG n=4), transgénicos (TG) y no transgénicos (NTG). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar y fueron

La Figura 17 muestra el peso de los tumores provenientes de ratones machos y hembras al final del experimento, es decir el día 18 post inoculación. No se encontraron diferencias significativas en los pesos de los tumores entre los grupos en ambos sexos.

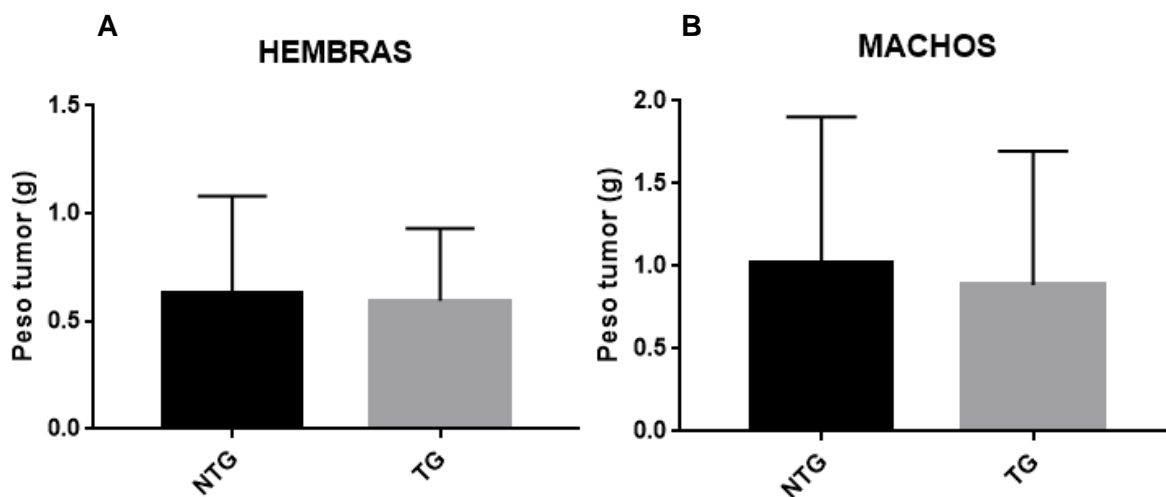


Figura 17. Peso de los tumores extraídos en (A) hembras (NTG n=6; TG n=5) y (B) machos (NTG n=3; TG n=4) transgénicos (TG) y no transgénicos (NTG) al día 18 post inoculación. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar y fueron analizados mediante t-test.

b) Ulceraciones y metástasis

En general se observó que los tumores fueron más agresivos comparados con los experimentos anteriores. Al día siguiente de la aparición tumoral (día 12 post inoculación) ya se observaron tumores con úlceras en ratones hembras

transgénicas y no transgénicas (Fig. 18). En el grupo de ratones machos sólo se observaron úlceras en uno de los animales del grupo transgénico el día 16 post inoculación, lo que causó una gran pérdida de masa tumoral y afectó el peso final del tumor extraído.

No se observaron metástasis en ninguno de los grupos de ambos sexos.

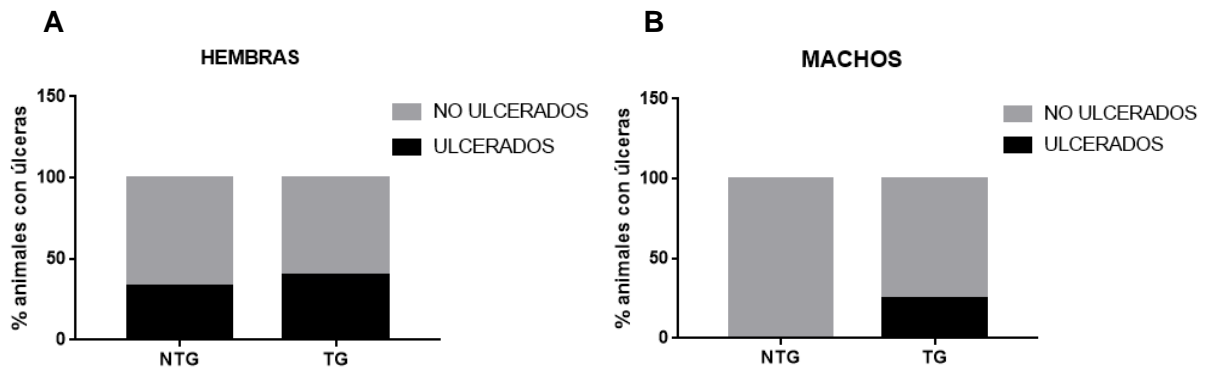


Figura 18. Porcentaje de animales hembras (A) (NTG n=6; TG n=5) y machos (B) (NTG n=3; TG n=4) con o sin úlceras en sus tumores en cada grupo, luego de 18 días post-inoculación. Datos analizados por test χ^2 .

c) Peso corporal y mortalidad de los ratones

Los animales fueron pesados antes de la implantación de las células tumorales, y cada día desde la aparición del tumor, hasta el día del sacrificio. La evolución del peso fue similar en ambos grupos de hembras, siendo mayor en las transgénicas, aunque no significativamente (Fig. 19 A). Por otro lado, los machos mostraron una evolución del peso similar en ambos grupos, sin diferencias significativas (Fig. 19 B).

En el experimento se registró sólo una muerte de un ratón hembra no transgénica, el día 17 post inoculación, la cual presentaba úlceras en sus tumores.

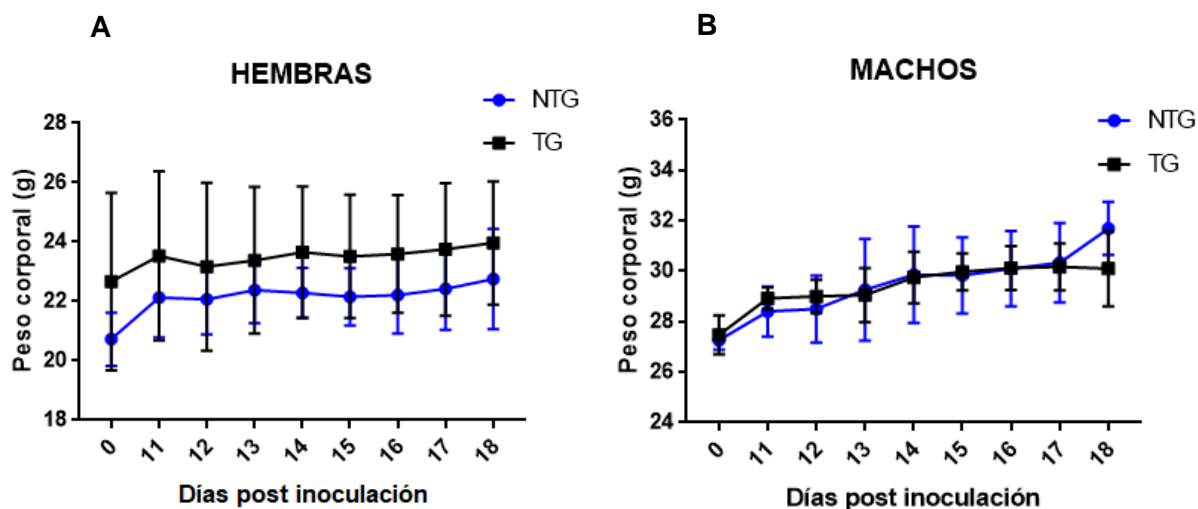


Figura 19. Evolución del peso corporal en hembras (A) (n=11) y machos (B) (n=7) transgénicos (TG) y no transgénicos (NTG), en los días de evaluación tumoral. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar y fueron analizados mediante t-test.

5. DISCUSIÓN

En 1948, Beard y Krebs reconocieron una sorprendente similitud entre un trofoblasto y un tumor, desde entonces, estas similitudes se han estudiado ampliamente (Enninga et al., 2014). Existen varias hipótesis sobre cómo el embarazo puede afectar la progresión del melanoma. Los cambios hormonales, la supresión inmunológica, y el aumento de la vascularización durante el embarazo son eventos que pueden implicar efectos adversos sobre el desarrollo tumoral (Stensheim et al., 2009). Otra hipótesis que podría explicar un peor pronóstico, es el aumento de la linfangiogénesis durante el período gestacional, que luego el melanoma utilizaría para su propio crecimiento (Enninga et al., 2014).

La hCG es una hormona fundamental para el éxito del embarazo, y originalmente, se creía que su expresión estaba restringida a ese estado fisiológico. Cada vez más, la presencia de hCG, o de sus subunidades, se ha documentado en cánceres pertenecientes a linajes que se encuentran tanto dentro como fuera del sistema reproductivo (Singh et al., 2018). La mayoría de los cánceres secretan la subunidad β , aunque también puede producirse la secreción de la subunidad α , o de la holohormona (Bose et al., 2013). Una hipótesis, que explica la acción de hCG β en cánceres, se basa en la similitud estructural de la hormona con factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGF β), y el factor de crecimiento nervioso

(NGF) caracterizados por la presencia de un motivo de nudo de cisteína (Fig. 20) (Lapthorn et al., 1994). Se sugiere que, debido a esta similitud estructural, la hCG, al igual que los factores de crecimiento antes mencionados, pueden afectar a las células mediante la regulación de su proliferación (Bose et al., 2013).

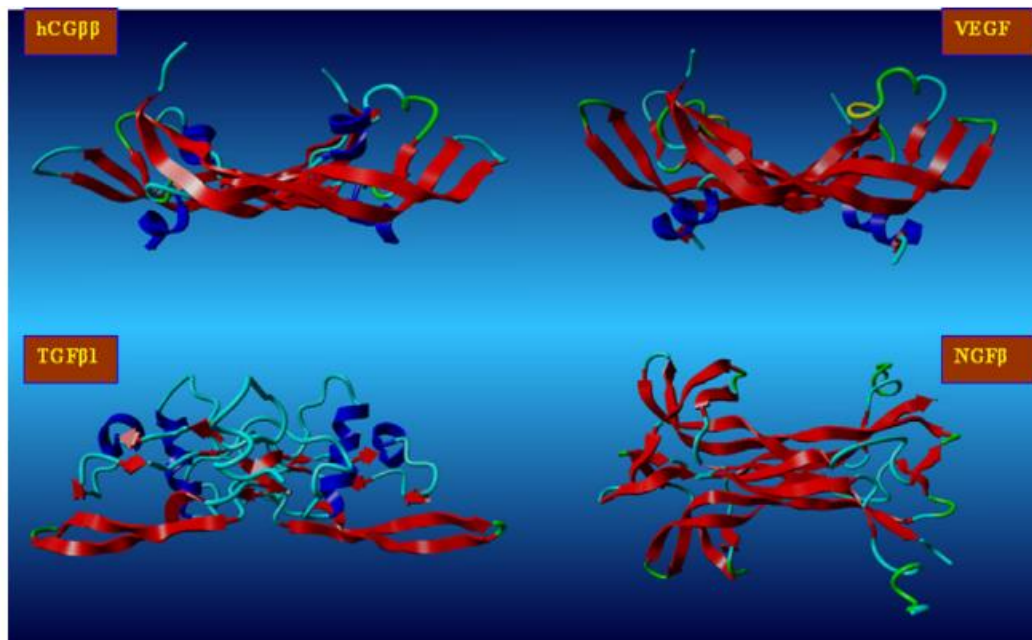


Figura 20. Comparación estructural de nudos de cisteína. Modelos moleculares de la estructura 3D de dímeros de TGF β , VEGF, NGF y homodímero hCG β . Tomado de Iles et al. (2010).

Otras pistas han surgido de experimentos *in vitro*, empleando la hormona completa o la subunidad β . Se ha demostrado que, además de mejorar la viabilidad de las células tumorales (Khare et al., 2017) e inducir la proliferación de las mismas (Gillott et al., 1996), la hormona promueve la secreción de mediadores de la angiogénesis e invasión, al tiempo que estimula la secreción de moléculas inflamatorias y citocinas inmunosupresoras (Khare et al., 2017). Dichos datos adquieren importancia a la luz del hecho de que los procesos fisiológicos que caracterizan la embriogénesis (invasividad, angiogénesis e inmunosupresión) se superponen en gran medida con los procesos patológicos que caracterizan la carcinogénesis (Singh et al., 2018). Experimentos *in vitro* e *in vivo* también han revelado que la hCG afecta la expresión de oncogenes, de una manera dependiente del tiempo y de la dosis, por lo que podría ser probable que la hormona afecte la proliferación y diferenciación celular a través de los mismos (Zhao et al., 2018).

Los modelos animales recientemente desarrollados dan más peso al postulado que vincula la hCG con la tumorigénesis. Los ratones transgénicos que expresan

β hCG bajo el promotor de ubiquitina C desarrollan obesidad, prolactinomas hipofisarios y adenocarcinomas de glándulas mamarias (Rulli et al., 2002). Aún más, se ha demostrado que la neutralización de hCG es eficaz en la regulación del crecimiento de células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* (Sachdeva et al., 2012).

En el presente trabajo final, se estudió el efecto de la hCG en la promoción del crecimiento del melanoma en dos modelos de ratones: el modelo C57BL6, y el modelo transgénico de hipersecreción de la hCG β .

En un principio, se pudo ver que las células utilizadas de melanoma B16-F10, son una línea celular efectiva, fácil de trabajar, y replicable, ya que en los experimentos realizados se lograron altas tasas de incidencia de tumores. Al ser singénicas de los ratones C57BL6, tienen una buena asimilación y disminuye el riesgo de rechazo por parte del sistema inmunológico del hospedador.

5.1. Efecto de la hCG en melanoma implantado en ratones C57BL6

En los experimentos llevados a cabo con el modelo C57BL6, los ratones tratados con hCG mostraron una leve tendencia hacia un mayor tamaño y peso tumoral comparado con los ratones del grupo control. Sin embargo, no se logró ver un efecto estadísticamente significativo de la hormona en el crecimiento y diseminación del melanoma. Las causas de estos resultados pueden ser varias, partiendo de la cantidad de células inoculadas. En ambos experimentos fueron implantadas 200.000 células B16-F10, las cuales dieron como resultado una incidencia del 100% de tumores en hembras C57BL/6. Sin embargo, los animales no lograron ser evaluados apropiadamente debido a un crecimiento tumoral rápido y agresivo. En la primera repetición, los animales fueron sacrificados el día 22 post inoculación. Ese día se observó que todos los ratones del grupo hCG se encontraban con sus tumores ulcerados, en los cuales no pudo realizarse la medición correspondiente y se vio afectado el peso tumoral final. Debido a esto, en la segunda repetición se decidió disminuir la duración de evaluación tumoral a 18 días, con el motivo de no perder masa tumoral por áreas necróticas y así poder realizar un mejor análisis. Aun así, no se logró observar una diferencia significativa en el peso tumoral final.

Esto nos llevó a pensar que la concentración inoculada de células tumorales pudo no ser la adecuada. Algunos autores plantean un protocolo de trabajo con concentraciones menores de células implantadas para el desarrollo de un modelo

más eficiente (Gregório et al., 2016). El implantar una menor cantidad de células tal vez permitiría un avance más gradual de la enfermedad, lo cual creemos que posibilitaría visualizar los efectos de la hCG en tiempos más tardíos. Otros autores incluso agregan que, al ser tan agresivos, los modelos no se asemejan al curso de una neoplasia maligna humana, ya que los seres humanos pueden sobrevivir durante meses o años a pesar del crecimiento del melanoma; en cambio una dosis tumorigénica mínima de melanoma B16 mataría a un ratón no tratado en tan solo unas semanas (Overwijk & Restifo, 2001).

Otra posible causa de estos resultados es la concentración de hCG utilizada para el tratamiento. En esta tesina, los ratones del grupo hCG fueron tratados con 10 UI de la hormona, tres veces por semana. En otro trabajo publicado, en el cual pudieron observar un efecto de la hCG sobre el crecimiento de células tumorales, utilizaron dosis mayores y aplicaciones durante varios días consecutivos (Zhao et al., 2018).

Cabe señalar que, el tamaño de muestra de los grupos estudiados pudo haber sido pequeño, por lo que un incremento en el número de ratones a evaluar podría permitir observar mejores resultados.

5.2. Evolución del melanoma en modelo transgénico de sobreexpresión hCG β

La disponibilidad de ratones transgénicos para hCG β es una gran herramienta para investigar los efectos de promoción del crecimiento de hCG (de manera endógena) en tumores sensibles a hormonas de linaje no reproductivo *in vivo* (Singh et al., 2018).

Con este modelo animal en el presente trabajo, mediante la técnica de inoculación subcutánea de las células tumorales B16-F10, se obtuvo un 92% de incidencia. En general se observó que los tumores fueron más agresivos comparados con los experimentos anteriores. Fueron implantadas la misma concentración de células tumorales que en los experimentos anteriores, pero el tiempo de evaluación fue menor, con un total de 17 días, ya que los animales presentaron úlceras y necrosis en sus tumores tempranamente. Como consecuencia, dichos síntomas pudieron afectar la determinación del peso del tumor al finalizar el experimento. Debido a la variabilidad de los datos obtenidos, creemos

que, para llevar a cabo estos estudios y analizar el crecimiento del tumor en forma gradual, sería más apropiada la inoculación de un menor número de células tumorales. Otros autores, utilizando este modelo transgénico, han demostrado un efecto de la gonadotropina en la promoción del crecimiento de tumores implantados *in vivo* (Bose et al., 2013; Singh et al., 2018). Particularmente, el trabajo de Singh et al. mostró un aumento en la incidencia y el volumen de tumores al implantar células de carcinoma pulmonar de Lewis (singénicas de C57BL6) en ratones F1 transgénicos para hCG β . Dicho volumen tumoral resultó significativamente mayor en los animales transgénicos el día 40 post-implantación tumoral, mientras que, en nuestro experimento, el día 17 post-inoculación los animales ya tuvieron que ser sacrificados debido al rápido crecimiento tumoral. En dicho trabajo mencionado, los animales fueron inoculados con un número mucho menor de células tumorales (40.000) (Singh et al., 2018). Cabe destacar, además que, en nuestro modelo, pudo haber habido un rechazo inmunológico hacia las células tumorales singénicas de la cepa C57BL6, dado que los experimentos se realizaron sobre la F1 resultante del cruzamiento de dicha cepa con el modelo transgénico, donde seguiría siendo predominante el “background” o patrimonio genético de la cepa FVB/n de los animales transgénicos. Sería, entonces, necesario realizar los estudios futuros en generaciones posteriores, donde predomine el patrimonio genético de la cepa C57BL6.

Otra característica a tener en cuenta es que, si bien la hCG es producida en forma continua por los animales transgénicos desde edades tempranas del desarrollo (Rulli et al., 2002; 2003), es posible que los niveles de hCG producidos no sean lo suficientemente elevados como para ejercer los efectos esperados sobre este modelo tumoral (0,1 UI/ml hCG; Rulli et al., 2002). Esto último podría dar una explicación al hecho de que, en nuestro trabajo, no observamos diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre los animales transgénicos y no transgénicos.

Por otra parte, si bien se observó una tendencia a un aumento en el peso corporal de las hembras transgénicas a lo largo del experimento, la misma no llegó a ser significativa. El desarrollo de obesidad en las hembras es una característica intrínseca del modelo transgénico, debido a la hipersecreción de hCG (Rulli et al., 2002), por cuanto este evento sería independiente del desarrollo tumoral. Se deduce

entonces de los resultados que un aumento en el número de animales permitiría mostrar más claramente las diferencias entre los grupos.

6. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en esta tesina, creemos que indudablemente la concentración de células tumorales B16-F10 inoculadas en los modelos de ratones C57BL y TG debería ser menor, ya que la utilizada no nos permitió observar el efecto de la hCG en tiempos prolongados, debido a la agresividad de los tumores. Ajustando ésta, y las demás variables discutidas anteriormente, sostenemos que podría evaluarse de una mejor manera la hipótesis planteada. Se requieren estudios adicionales en el futuro que permitan dilucidar el rol de la hormona hCG sobre el establecimiento, diseminación y desarrollo de esta patología.

7. BIBLIOGRAFÍA

Antohe, M., Nedelcu, R. I., Nichita, L., Popp, C. G., Cioplea, M., Brinzea, A., Hodoroagea, A., Calinescu, A., Balaban, M., Ion, D. A., Diaconu, C., Bleotu, C., Pirici, D., Zurac, S. A., & Turcu, G. (2019). Tumor infiltrating lymphocytes: The regulator of melanoma evolution (Review). *Oncology Letters*, 17(5), 4155–4161.

Becker, J. C., Houben, R., Schrama, D., Voigt, H., Ugurel, S., & Reisfeld, R. A. (2010). Mouse models for melanoma: A personal perspective. *Experimental Dermatology*, 19(2), 157–164.

Betts, G. J., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., Korol, O., Johnson, J. E., Womble, M., & DeSaix, P. (2013). Anatomía y fisiología (OpenStax (ed.)).

Bose, A., Huhtaniemi, I., Singh, O., & Pal, R. (2013). Synergistic Activation of Innate and Adaptive Immune Mechanisms in the Treatment of Gonadotropin-Sensitive Tumors. *PLoS ONE*, 8(4), 1–13.

Byrd, B. F., & McGanity, W. (1954). The effect of pregnancy on the clinical course of malignant melanoma. *Southern Medical Journal*, 219(3), 196–200.

Casarini, L., Santi, D., Brigante, G., & Simoni, M. (2018). Two hormones for one receptor: Evolution, biochemistry, actions, and pathophysiology of LH and hCG. *Endocrine Reviews*, 39(5), 549–592.

Costa Valles, C. (1995). Estudio mediante animales transgenicos del papel de la hormona de crecimiento y el IGF-1 en el desarrollo de diabetes mellitus (Issue 1). Universidad Autonoma de Barcelona.

Dika, E., Patrizi, A., Lambertini, M., Manuelpillai, N., Fiorentino, M., Altimari, A., Ferracin, M., Lauriola, M., Fabbri, E., Campione, E., Veronesi, G., & Scarfì, F. (2019). Estrogen Receptors and Melanoma: A Review. *Cells*, 8(11), 1463.

Driscoll, M. S., Martires, K., Bieber, A. K., Pomeranz, M. K., Grant-Kels, J. M., & Stein, J. A. (2016). Pregnancy and melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 75(4), 669–678.

Enninga, E. A. L., Shernan, G. H., Douglas J, C., Roxana S, D., Wendy K, N., & Markovic, S. O. S. N. (2014). Immunomodulatory effects of sex hormones: requirements for pregnancy and relevance in melanoma. *Bone*, 23(1), 1–7.

Fidler, I. J. (1973). Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature*, 241, 148–149.

Gharib, S. D., Chin, W. W., Wierman, M. E., & Shupnik, M. A. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrine Reviews*, 11(1), 177–199.

Gillott, D. J., Iles, R. K., & Chard, T. (1996). The effects of beta-human chorionic gonadotrophin on the in vitro growth of bladder cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, 73(3), 323–326.

Gregório, A. C., Fonseca, N. A., Moura, V., Lacerda, M., Figueiredo, P., Simões, S., Dias, S., & Moreira, J. N. (2016). Inoculated cell density as a determinant factor of the growth dynamics and metastatic efficiency of a breast cancer murine model. *PLoS ONE*, 11(11), 1–19.

Heidegger, H., & Jeschke, U. (2018). Human chorionic gonadotropin (hCG)—an endocrine, regulator of gestation and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 29–31.

Herrera González, N. E., & Flores, A. Y. A. (2010). Melanoma in Mexico. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 15(3), 161–164.

Ingraffea, A. (2013). Melanoma. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 21(1), 33–42.

Jhaveri, M., Driscoll, M., & Grant-Kels, J. (2011). Melanoma in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54(4), 239–252.

Khare, P., Bose, A., Singh, P., Singh, S., Javed, S., Jain, S. K., Singh, O., & Pal, R. (2017). Gonadotropin and tumorigenesis: Direct and indirect effects on inflammatory and immunosuppressive mediators and invasion. *Molecular Carcinogenesis*, 56(2), 359–370.

Khosrotehrani, K., Huu, S. N., Prignon, A., Avril, M. F., Boitier, F., Oster, M., Mortier, L., Richard, M. A., Maubec, E., Kerob, D., Mansard, S., Merheb, C., Moguelet, P., Nassar, D., Guégan, S., & Aractingi, S. (2011). Pregnancy promotes melanoma metastasis through enhanced lymphangiogenesis. *American Journal of Pathology*, 178(4), 1870–1880.

Ko, J. S., Gastman, B. R., Conic, R., Tellez Diaz Trujillo, A., Diaz-Montero, C. M., Billings, S. D., Tarhini, A., Funchain, P., & Atanaskova Mesinkovska, N. (2019). Decreased T-Cell Programmed Death Receptor-1 Expression in Pregnancy-Associated Melanoma. *American Journal of Dermatopathology*, 41(3), 180–187.

Laphorn, A. J., Harris, D. C., Littlejohn, A., Lustbader, J. W., Canfield, R. E., Machin, K. J., Morgan, F. J., & Isaacs, N. W. (1994). Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 369(6480), 455–461.

Linck, R. D. M., Costa, R. L. de P., & Garicochea, B. (2017). Cancer immunology and melanoma immunotherapy. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(6), 830–835.

Loria, D., Abriata, G., Santoro, F., & Latorre, C. (2020). Cutaneous melanoma in Argentina: an analysis of its characteristics and regional differences. *Ecancermedicalscience*, 14, 1–16.

Marcial, A. L. (2015). Efectividad de un anticuerpo monoclonal ANTI-hCG para prevenir disfunciones reproductivas y metabólicas en ratones transgénicos. Universidad de Belgrano.

Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 17(8), 469–482.

Mukherji, B. (2013). Immunology of melanoma. *Clinics in Dermatology*, 31(2), 156–165.

Muzzio, D., Zygmunt, M., & Jensen, F. (2014). The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. *Frontiers in Endocrinology*, 5(APR), 1–5.

Overwijk, W. W., & Restifo, N. P. (2001). B16 as a melanoma model for human. In *Curr Protoc Immunol*.

Pack, G. T., & Scharnagel, I. R. (1951). The prognosis for malignant melanoma in the pregnant woman. *Cáncer*, 4, 324–334.

Policastro, P. F., Daniels-McQueen, S., Carle, G., & Boime, I. (1986). A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 261(13), 5907–5916.

Richtig, G., Byrom, L., Kupsa, R., Schaider, H., Hofmann-Wellenhof, R., Wolf, I. H., Soyer, H. P., & Richtig, E. (2017). Pregnancy as a driver for melanoma. *British Journal of Dermatology*, 177(3), 854–857.

Rulli, S. B., Kuorelahti, A., Karaer, Ö., Pelliniemi, L. J., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2002). Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 143(10), 4084–4095.

Sachdeva, R., Bhardwaj, N., Huhtaniemi, I., Aggrawal, U., Jain, S. K., Zaidi, R., Singh, O., & Pal, R. (2012). Transgenesis-Mediated Reproductive Dysfunction and Tumorigenesis: Effects of Immunological Neutralization. *PLoS ONE*, 7(11).

Schumacher, A. (2017). Human chorionic gonadotropin as a pivotal endocrine immune regulator initiating and preserving fetal tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10).

Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 345–358.

Singh, P., Sarkar, M., Agrawal, U., Huhtaniemi, I., & Pal, R. (2018). The transgenic expression of the β -subunit of human chorionic gonadotropin influences the growth of implanted tumor cells. *Oncotarget*, 9(78), 34670–34680.

Stensheim, H., Møller, B., Van Dijk, T., & Fosså, S. D. (2009). Cause-specific survival for women diagnosed with cancer during pregnancy or lactation: A registry-based cohort study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(1), 45–51.

Tsampalas, M., Gridelet, V., Berndt, S., Foidart, J. M., Geenen, V., & d'Hauterive, S. P. (2010). Human chorionic gonadotropin: A hormone with immunological and angiogenic properties. *Journal of Reproductive Immunology*, 85(1), 93–98.

Tucci, M., Passarelli, A., Mannavola, F., Felici, C., Stucci, L. S., Cives, M., & Silvestris, F. (2019). Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells. *Frontiers in Oncology*, 9(November), 1–14.

Zelin, E., Conforti, C., Giuffrida, R., Deinlein, T., Meo, N. di, & Zalaudek, I. (2020). Melanoma in pregnancy: certainties unborn. *Melanoma Management*, 7(3), MMT48.

Zhao, R., Zhang, T., Xi, W., Sun, X., Zhou, L., Guo, Y., Zhao, C., & Bao, Y. (2018). Human chorionic gonadotropin promotes cell proliferation through the activation of c-Met in gastric cancer cells. *Oncology Letters*, 16(4), 4271–4278.