

EXPOSICION PREPUBERAL A ANDRÓGENOS: SU EFECTO SOBRE EL DESARROLLO HISTOFUNCIONAL DEL ÚTERO.

Carla Waigandt^A, Gisela S. Bracho^A,

^A Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL-CONICET)

Área: Ciencias de la Salud

Sub-Área: Medicina

Grupo: X

Palabras clave: rata, útero, dehidroepiandrosterona

INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un desorden endocrino heterogéneo y complejo, de etiología multifactorial. Presenta una prevalencia de 6-10% en mujeres de edad reproductiva. Su comienzo es insidioso con un espectro clínico que incluye la clásica tríada de SOP: anovulación crónica, hiperandrogenismo y ovarios poliquísticos (de Melo y col. 2015). A nivel celular existen numerosos mecanismos potenciales que podrían promover la enfermedad neoplásica en las mujeres con SOP, incluyendo el estado anovulatorio crónico que conlleva a que la progesterona (Pg) producida sea insuficiente generando un desbalance en el microambiente hormonal y el estado de hiperandrogenismo asociado con la acción de una exposición constante a estrógenos (Eg) sin oposición (Giudice 2006).

El útero es un órgano hormonodependiente. Se conoce que los niveles elevados de Eg (sin oposición de Pg) pueden inducir hiperplasia endometrial (la cual representa una tasa de 12% a 49% en mujeres con SOP) y aumentar considerablemente el riesgo de desarrollar cáncer de endometrio (Chittenden y col. 2009). El cáncer de endometrio es promovido por el estradiol (E2) e inhibido por la Pg, mientras que el papel de los andrógenos sigue siendo controvertido. El posible papel de los andrógenos en el crecimiento uterino es apoyado por resultados experimentales *in vivo*. La dihidrotestosterona (DHT), andrógeno no aromatizable, promueve el crecimiento y la diferenciación del útero de roedores (Schmidt y Katzenellenbogen 1979), además se observó que la inactivación del receptor de andrógenos (RA) en ratones resultó en un útero más delgado con un área total reducida en comparación con hembras controles (Walters y col. 2009). Por el contrario, la androstenediona (un pro-andrógeno aromatizable) inhibió la proliferación de las células endometriales humanas *in vitro*, un efecto que fue revertido por un anti-andrógeno (acetato de ciproterona) sugiriendo que estos efectos fueron también mediado a través de acciones del RA en las células endometriales (Tuckerman y col. 2000).

En base a estos antecedentes se pone en evidencia que existe una clara asociación entre el hiperandrogenismo asociado al SOP y anomalías uterinas. Sin embargo, los mecanismos involucrados han sido muy poco estudiados.

OBJETIVO

Evaluar los efectos del hiperandrogenismo asociado al SOP sobre el desarrollo histofuncional del útero de ratas.

Proyecto: PICT2014-2348

Director del proyecto: Bosquiazzo, Verónica L

Director del becario/tesista: Bosquiazzo, Verónica L

METODOLOGÍA

Diseño experimental: Para inducir SOP se utilizó un modelo en ratas previamente caracterizado (Maliqueo y col. 2014). Ratas hembras prepúberes (21 días de edad) de la cepa Wistar fueron tratadas por vía subcutánea con: 0,1 ml de aceite de sésamo (**Grupo control**, 11 animales) y 6mg/100g de peso corporal de dehidroepiandrosterona (DHEA, Sigma) en aceite de sésamo (**Grupo DHEA**, 8 animales), durante 20 días a partir del día postnatal 21 (DPN21). El sacrificio de los animales se realizó 24 hs después de la última inyección (DPN42). A partir del destete (DPN21) y durante el resto del experimento, los animales fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum*. Dos horas antes del sacrificio, los animales fueron inyectados intra-peritonealmente con bromodeoxyuridina (BrdU; 6 mg/100g peso; Sigma) para determinar el índice de proliferación celular. Al momento del sacrificio se obtuvieron los cuernos uterinos y se fijaron 6hs en formol buffer y luego se procesaron hasta su inclusión en parafina.

Histología: Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina

Inmunohistoquímica (IHQ): Cortes histológicos de útero, de 5 µm de espesor, se desparafinaron y deshidrataron en gradiente de etanol. La incorporación de BrdU para detectar células en fase S del ciclo celular se evaluó por métodos previamente descritos en nuestro laboratorio (Kass y col. 2000). Se bloquearon los sitios no específicos de unión y la actividad endógena de peroxidasa. Los anticuerpos primarios para detectar BrdU (1/100, Novocastra), vimentina (1/100, Novocastra), desmina (1/100), α -actina de músculo liso (1/200, Novocastra) y RA (1/400, Santa Cruz) se incubaron durante toda la noche a 4°C. La reacción se reveló a través del método de la streptavidina-biotina peroxidasa y diaminobencidina (Sigma) como sustrato cromogénico. Las muestras se montaron con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma).

Morfometría:

a) *Evaluación del espesor del estroma subepitelial y muscular uterino:* Se midió el espesor del estroma subepitelial y muscular, en 3 profundidades, utilizando la detección IHQ de α -actina de músculo liso, vimentina y desmina. La cuantificación se realizó utilizando un sistema computarizado de análisis de imágenes, Image Pro Plus 5.0 con kit de captura Pro-Series 128 (Media Cybernetics), siguiendo la metodología previamente descrita en nuestro laboratorio (Ramos y col. 2003).

b) *Evaluación de la densidad de glándulas y de la densidad celular uterina:* Sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina y mediante el uso de un sistema computarizado de análisis de imágenes se cuantificó la densidad de glándulas determinando el área relativa ocupada por glándulas respecto al área del estroma subepitelial y la densidad de células determinando el área ocupada por núcleos en el estroma subepitelial o muscular respecto al área de dicho compartimento

d) *Determinación de la proliferación celular uterina:* El índice de proliferación celular se evaluó por detección IHQ de la BrdU incorporada. Se calculó el porcentaje de células BrdU positivas cuantificando 3000 células en epitelio luminal y 1000 células en epitelio glandular. En el estroma subepitelial y muscular el porcentaje de células positivas para BrdU se evaluó utilizando un sistema de imágenes computarizado.

e) *Evaluación de la expresión de receptores de andrógenos en el útero:* La detección por IHQ del RA se evaluó de forma cualitativa a través de la observación microscópica por 3 operarios distintos. La cuantificación fue expresada con cruces: 0 sin marcación, + marcación leve, ++ marcación moderada, +++ marcación intensa, distinguiendo si la inmunomarcación es citoplasmática y/o nuclear. Luego se determinó el porcentaje de animales que expresaron una marcación moderada-intensa del RA.

Análisis estadístico: Los resultados se expresaron como valor medio \pm SEM y se

analizaron usando *t* test. La expresión del RA se analizó utilizando el test de Fisher. $P < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Efectos del tratamiento con DHEA sobre la histomorfología uterina

El tratamiento con DHEA en animales prepúberes indujo un incremento significativo en el espesor del estroma subepitelial y muscular del útero comparado con los animales controles (Figura 1)

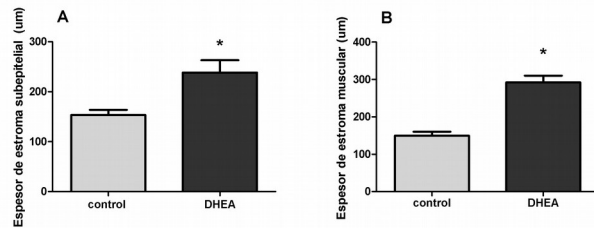


Figura 1. Efectos del tratamiento con DHEA sobre el espesor del estroma subepitelial (A) y muscular (B). Las barras representan el valor promedio \pm SEM. *, $p < 0.05$.

Los animales expuestos a DHEA demostraron una mayor densidad de glándulas respecto a los animales controles (Figura 2A). Además, en los animales tratados con DHEA se observó una disminución significativa de la densidad de células, tanto en el estroma subepitelial como muscular (Figura 2B-C).

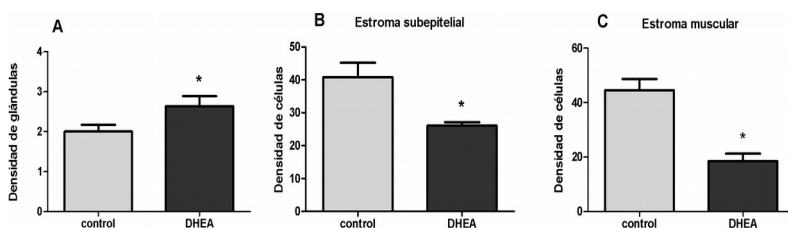


Figura 2. Efectos del tratamiento con DHEA sobre la densidad de glándulas (A) y de células en estroma uterino (B-C). Las barras representan el valor promedio \pm SEM *, $p < 0.05$.

Efectos del tratamiento con DHEA sobre la proliferación celular uterina.

La proliferación celular no presentó diferencias en el epitelio luminal y glandular y en el estroma muscular entre los grupos estudiados (Figura 3 A-B-D). Por el contrario, el índice de proliferación disminuyó en el estroma subepitelial de los animales expuestos a DHEA comparado con el grupo control (Figura 3 C).

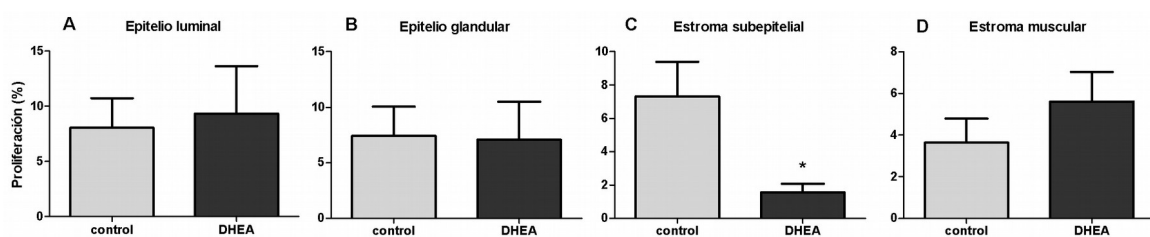


Figura 3. Efectos del tratamiento con DHEA sobre la proliferación celular en distintos compartimentos uterinos. Cuantificación de la proliferación en el epitelio luminal (A), epitelio glandular (B), estroma subepitelial (C) y estroma muscular (D). Las barras representan el promedio \pm SEM. *, $p < 0.05$.

Efectos del tratamiento con DHEA sobre la expresión del receptor de andrógenos

El tratamiento con DHEA indujo la expresión del RA en el útero. La expresión del RA en el epitelio luminal y glandular se restringió al compartimento citoplasmático,

mientras que en el estroma la inmunodetección fue nuclear (Figura 4 A-C). En el grupo tratado con DHEA se observó un aumento significativo en el porcentaje de animales con moderada-alta expresión del RA (más de 2 cruces) comparado con el grupo control (Figura 4 D-G).

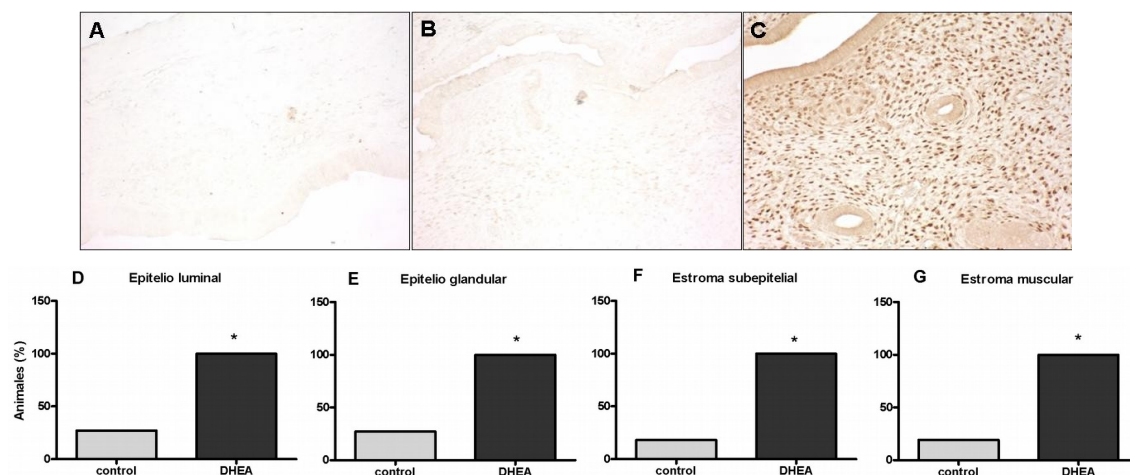


Figura 4: Expresión del receptor de andrógenos en el útero. A-C Fotomicrografías representativas de la inmunomarcación del RA en el útero, A) control negativo del ensayo de IHQ, B-C) útero de animales controles y tratados con DHEA respectivamente. Magnificación 20X. Cuantificación de animales que presentaban moderada-alta expresión del RA en el citoplasma del epitelio luminal (D) y glandular (E) y expresión nuclear en el estroma subepitelial (F) y muscular (G). Las barras representan el porcentaje de animales. *, $p < 0.05$.

CONCLUSIÓN

El presente estudio aporta evidencias de que el tratamiento con DHEA indujo cambios en la histomorfología uterina y la expresión de receptores esteroides que podrían tener consecuencias a largo plazo sobre el desarrollo de anomalías uterinas

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chittenden B.G., Fullerton G., y col.,** 2009. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online*. 19, 398-405.
- Giudice L.C.,** 2006. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 20, 235-244.
- Kass L., Varayoud J., y col.,** 2000. Detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissue. DNA denaturation following microwave or enzymatic digestion pretreatment is required. *Eur J Histochem*. 44, 185-191.
- Maliqueo M., Benrick A., y col.,** 2014. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. *Semin Reprod Med*. 32, 183-193.
- Melo A.S., Dias S.V., y col.,** 2015. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. *Reproduction*. 150, R11-24.
- Ramos J.G., Varayoud J., y col.,** 2003. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*. 144, 3206-3215.
- Schmidt W.N., Katzenellenbogen B.S.,** 1979. Androgen-uterine interactions: an assessment of androgen interaction with the testosterone- and estrogen-receptor systems and stimulation of uterine growth and progesterone-receptor synthesis. *Mol Cell Endocrinol*. 15, 91-108.
- Tuckerman E.M., Okon M.A., y col.,** 2000. Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil Steril*. 74, 771-779.
- Walters K.A., McTavish K.J., y col.,** 2009. Subfertile female androgen receptor knockout mice exhibit defects in neuroendocrine signaling, intraovarian function, and uterine development but not uterine function. *Endocrinology*. 150, 3274-3282.