



EXPRESIÓN DE ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS EN EL ÚTERO DE RATAS CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Acosta, María

*Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL UNL-CONICET). Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Santa Fe, Argentina.*

Directora: Dra. Verónica L. Bosquiazzo

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: SOP, útero, enzimas esteroídicas

INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es la endocrinopatía más común entre las mujeres en edad reproductiva. El SOP se asocia con ciclos anovulatorios, ovarios poliquísticos y/o hiperandrogenismo. Este síndrome es un factor de riesgo para el desarrollo de patologías uterinas como hiperplasia endometrial, cáncer e infertilidad (Li y col. 2019, Hardiman y col. 2010, Walters y col. 2010). Estudios previos han demostrado que la histoarquitectura uterina se modificó en animales con SOP. Específicamente, se observó un aumento en el peso uterino, la altura del epitelio luminal, la densidad de glándulas y el espesor de las paredes uterinas. El aumento del espesor se asoció con una disminución de la densidad de células estromales, lo que podría deberse a cambios en el número de células y/o en el espacio extracelular (Bracho y col. 2019). En este sentido se demostró una disminución de la proliferación celular en el estroma subepitelial uterino y un aumento en la organización de las fibras de colágeno e imbibición de agua en animales con SOP (Bracho y col. 2019). Estos cambios podrían ser causados por modificaciones en el estado endocrino. Se sabe que el útero es un órgano hormonodependiente y que su diferenciación funcional está regulada por estrógenos, progesterona y andrógenos. Dicha regulación puede estar mediada por esteroides originados en el ovario o por la producción local tisular que depende de la expresión y actividad de las enzimas que regulan la biosíntesis y el metabolismo de las hormonas esteroides. En endometrios obtenidos de mujeres con SOP, se evidenció una mayor expresión de la enzima 17β -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 1 (reduce la estrona a estradiol) y una menor actividad de sulfotransferasa (genera sulfato de estrógeno) en comparación con mujeres sanas fértiles, mientras que la expresión de la enzima aromatasa fue indetectable (Shang y col. 2012). Por el contrario, Zhao y col. (2014), demostraron una mayor expresión de aromatasa en endometrios de mujeres con SOP. Si bien los resultados sugieren una mayor concentración *in situ* de estradiol en las mujeres con SOP, más estudios son necesarios para conocer el ambiente endocrino y comprender la regulación de los cambios uterinos que podrían predisponer al desarrollo de las patologías uterinas asociadas al SOP.

Título del proyecto: " Efecto del hiperandrogenismo sobre el desarrollo histofuncional del útero "

Instrumento: PICT-2016-0390

Año de la convocatoria: 2016

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director: Dra. Verónica L. Bosquiazzo

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que el SOP cursa con niveles altos de andrógenos y que el receptor de andrógenos (RA) es inducido en los animales con SOP, nos propusimos: 1) evaluar los niveles séricos de 17β -estradiol (E2) y testosterona (T); 2) evaluar el estado endocrino a nivel uterino mediante la determinación de la expresión de genes reguladores de la esteroidogénesis: Cyp19a (P450arom), 17β -HSD tipo 1, 2, 3 y 4 y, STS (sulfatasa de esteroides); 3) determinar si dichos parámetros son regulados a través del RA.

METODOLOGÍA

Animales. El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética y seguridad de la investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Se utilizaron ratas hembras prepúberes (21 días de edad) de cepa Wistar pertenecientes al bioterio del ISAL. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas ($22\pm 2^\circ\text{C}$; 14 horas de luz desde las 06 hasta las 20 horas) con libre acceso a agua y comida (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina). Los animales se alojaron en jaulas de acero inoxidable con camas de viruta de madera previamente esterilizada y el agua fue provista a través de mamaderas de vidrio y tetinas de acero inoxidable.

Diseño experimental. Ratas hembras de 21 días de edad fueron tratadas por vía subcutánea con aceite de sésamo (grupo control), dehidroepiandrosterona (DHEA) 6mg/100gr de peso corporal (grupo SOP) o DHEA 6mg/100gr de peso corporal + Flutamida (antagonista del RA) 20mg/kg de peso corporal (grupo SOP+F), durante 20 días consecutivos. Se utilizaron entre 6-9 animales por grupo experimental. Todos los animales se sacrificaron a los 41 días de edad mediante asfixia con CO_2 . Al momento del sacrificio se obtuvo sangre y se disecaron los cuernos uterinos. Los cuernos uterinos se congelaron inmediatamente en N_2 líquido y se mantuvieron en freezer a -80°C hasta la extracción del ARN total (Chomczynski y Sacchi 1987).

Determinación de hormonas esteroides. Los niveles séricos de E2 y T se determinaron por quimioluminiscencia utilizando un sistema Immulite 2000 (Siemens Healthcare, Buenos Aires, SA, Argentina), siguiendo las especificaciones del fabricante. El coeficiente de variación intraensayo fue de 6.7% para E2 y 10.1% para T.

Determinación de la expresión de enzimas esteroidogénicas. Se cuantificó en el útero la expresión a nivel de ARNm de las enzimas esteroidogénicas: Cyp19a (P450arom), 17β -HSD tipo 1, 2, 3 y 4 y, STS. Para ello se extrajo el ARN total de los úteros conservados a -80°C , el cual fue sometido a transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real. La amplificación de los genes blanco se realizó con oligonucleótidos específicos diseñados de acuerdo a las secuencias publicadas en GenBank y utilizando la técnica de colorante intercalante. Se empleó la expresión de la proteína ribosomal L19 como ARNm normalizador. La pureza de los productos de amplificación se confirmó por electroforesis en geles de agarosa utilizando el colorante GelRed™. La expresión de la proteína Cyp19a también se evaluó por Inmunohistoquímica (IHQ) para estudiar su localización celular en el útero.

Análisis estadístico. Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se utilizó el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn para evaluar la significancia estadística entre los grupos experimentales (SPSS-PASW Statistics v. 18). $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Evaluación de los niveles séricos de hormonas esteroideas. Los animales con SOP y SOP+F presentaron un aumento de los niveles séricos de T comparados con el grupo control (Figura 1). Respecto a los niveles séricos de E2, se observó que los animales con SOP no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Si bien los animales SOP+F presentaron niveles más bajos de E2 en relación a los animales controles, estos fueron similares a los observados en los animales con SOP.

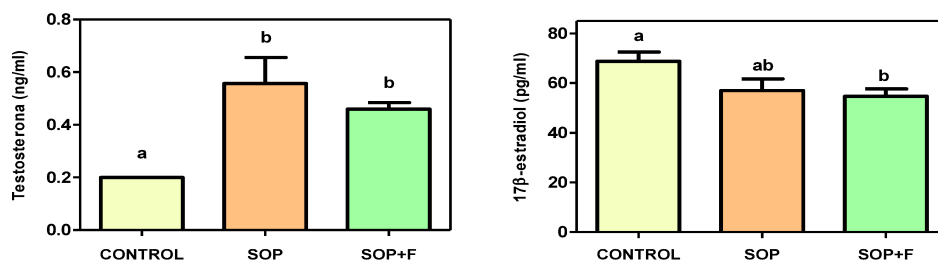


Figura 1. Niveles séricos de Testosterona y 17β-estradiol en los grupos control, SOP y SOP+F. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$). Los valores fueron representados como la media \pm error estándar de la media (SEM).

Evaluación de la expresión de enzimas esteroideogénicas. En todos los grupos experimentales se detectó expresión uterina, a nivel de ARNm, de las enzimas Cyp19a ($P450_{arom}$), 17β-HSD (1-4) y STS. En los animales con SOP, se observó un aumento de la expresión del transcrito de Cyp19a y 17β-HSD2 respecto al grupo control. Este efecto se mantuvo en los animales SOP+F para la enzima 17β-HSD2, sin embargo, dicho aumento no se demostró en los animales SOP+F para la enzima Cyp19a (Figura 2). La expresión de las enzimas STS y 17β-HSD (1, 3 y 4) resultaron similares entre los grupos experimentales.

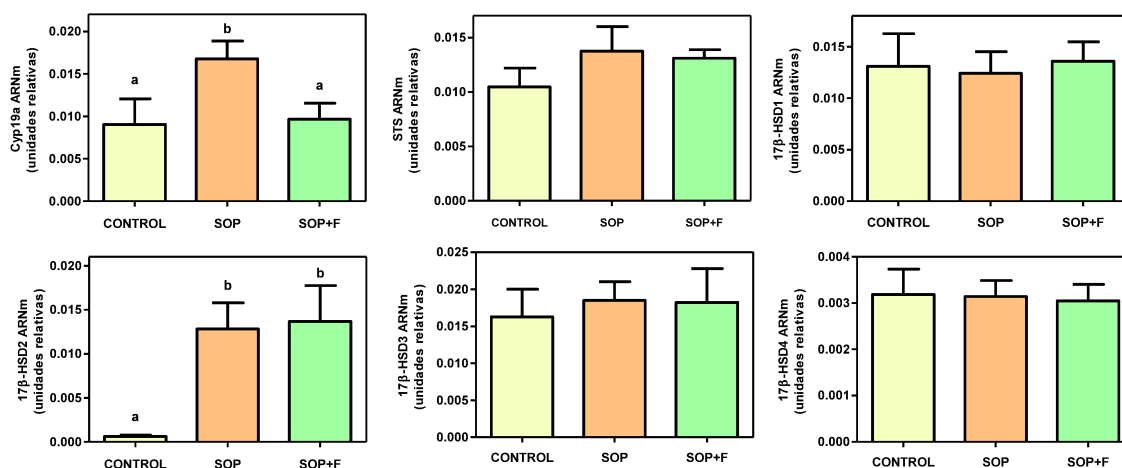


Figura 2. Expresión ARNm de Cyp19a, STS y 17β-HSD 1, 2, 3 y 4 en los grupos control, SOP y SOP+F. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$). Los valores fueron representados como la media \pm error estándar de la media (SEM).

A nivel de proteínas, se estudió la localización celular por IHQ de Cyp19a. La expresión fue citoplasmática localizada en los epitelios (luminal y glandular) y el miometrio (Figura 3).

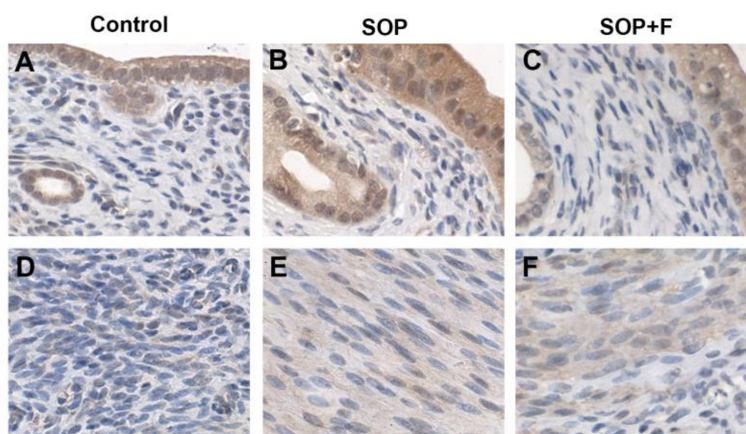


Figura 3. Expresión proteica de Cyp19a en diferentes compartimentos uterinos de los grupos control, SOP y SOP+F. Fotomicrografías representativas de secciones uterinas mostrando la inmunomarcación en epitelio luminal, glandular y subepitelio (A-C) y miometrio (D-F). Magnificación 400X.

CONCLUSIONES

- A nivel sistémico se demostró un aumento de los niveles de T en los animales con SOP, lo que confirma la hiperandrogenemia asociada al SOP. Este parámetro no fue modificado en los animales tratados con Flutamida.
- Se demostró la expresión uterina de enzimas asociadas al metabolismo de los esteroides.
- La expresión uterina de Cyp19a y 17 β -HSD2 se modificó en animales con SOP, siendo la expresión de Cyp19a regulada a través del RA.

Los resultados sugieren que los animales con SOP podrían tener mayores niveles uterinos de estrógenos que favorecerían el desarrollo de anomalías uterinas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bracho GS, Altamirano GA, Kass L, Luque EH, Bosquiazzo VL, 2019.** Hyperandrogenism Induces Histo-Architectural Changes in the Rat Uterus. *Reprod Sci.* 26:657-668.
- Chomczynski P, Sacchi N, 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159.
- Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W, 2003.** Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet.* 361:1810-1812.
- Li Y, Zheng Q, Sun D, Cui X, Chen S, Bulbul A, Liu S, Yan Q, 2019.** Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome. *J Cell Physiol.* 234:7435-7447.
- Shang K, Jia X, Qiao J, Kang J, Guan Y, 2012.** Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci.* 19, 674-683.
- Walters KA, Simanainen U, Handelsman DJ, 2010.** Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum Reprod Update.* 16:543-558.
- Zhao PL, Zhang QF, Yan LY, Huang S, Chen Y, Qiao J, 2014.** Functional investigation on aromatase in endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome cases. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15:8975-9.