

EFFECTOS A LARGO PLAZO DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO SOBRE EL MICROAMBIENTE ENDOCRINO UTERINO DE RATA

Iñiguez Inri

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

Director/a: Dra. Verónica L. Bosquiazzo, Codirector/a: Dra. Gisela S. Bracho

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: SOP, esteroidogénesis uterina, rata.

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 y cáncer endometrial (Hardiman y col. 2003). En estudios previos demostramos que ratas a las que se les había inducido el SOP durante los primeros días de vida, presentaron en la adultez alteraciones en la histomorfología uterina: mayor incidencia de hiperplasia epitelial y mayor multiplicidad de alteraciones glandulares con metaplasia escamosa y conglomerados de glándulas (Bracho y col. 2023). Estos efectos podrían estar regulados por cambios en los niveles séricos de hormonas esteroides como así también por modificaciones en metabolismo tisular de las mismas. En este sentido, en endometrios obtenidos de mujeres con SOP y modelos animales se han demostrado cambios en la expresión y actividad de enzimas esteroidogénicas uterinas lo que sugiere una mayor concentración *in situ* de estrógenos (Zhao y col. 2014, Bracho y col. 2024). En función de estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo postula que el SOP induce cambios a largo plazo en el microambiente endócrino uterino, los cuales podría explicar, al menos en parte, las lesiones uterinas observadas en la adultez.

OBJETIVOS

Estudiar los efectos a largo plazo del SOP sobre el ambiente endócrino uterino de ratas evaluando los niveles séricos de 17β -estradiol (E2), progesterona (P4) y testosterona (T), la expresión de los transcritos de enzimas esteroidogénicas y la expresión de receptores de hormonas esteroideas.

METODOLOGÍA

Animales. El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética y seguridad de la investigación de la FBCB el 5 de noviembre de 2019 (Resolución CE2019-47, FBCB, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina). Se utilizaron ratas hembras de la 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).

Título del proyecto: Síndrome de ovario poliquístico y desarrollo de anomalías uterinas

Instrumento: PICT

Año de la convocatoria: 2019

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Directora: Dra. Verónica L. Bosquiazzo

Codirector/a: Dra. Gisela S. Bracho

Diseño experimental. Se utilizó un modelo animal de SOP, inducido mediante la administración de dehidroepiandrosterona (DHEA). Se utilizaron ratas hembras que fueron inyectadas subcutáneamente con DHEA, 60 mg/kg de peso corporal/día (grupo SOP, n= 5) o aceite de sésamo (grupo CONTROL, n=6) durante 20 días consecutivos iniciando el tratamiento a los 21 días de edad. Finalizado el tratamiento, se dejaron crecer los animales hasta la adultez (24 meses), momento en el que fueron sacrificados en la etapa de diestro determinado por citología vaginal. Al momento del sacrificio se obtuvieron muestras de sangre y se diseccionaron los cuernos uterinos que se procesaron para estudios histológicos y de biología molecular.

Evaluación del estado endócrino de los animales a nivel sistémico. A partir de las muestras de suero se determinaron los niveles séricos de E2, P4 y T por ensayos de quimioluminiscencia utilizando un sistema de diagnóstico in vitro Immulite®2000 (Siemens Healthcare SA, Argentina), siguiendo las especificaciones del fabricante. El coeficiente de variación intraensayo fue de 6.7% para E2, 9.7% para P4 y 10.1% para T. Con los valores de E2 y P4 se calculó la relación E2/P4.

Evaluación de la expresión génica de enzimas esteroidogénicas y receptores hormonales en el útero. Se cuantificó en útero la expresión a nivel de ARNm por PCR en tiempo real, usando el termociclador Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, Argentina), de: [proteína reguladora aguda esteroidogénica (*StAR*), 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa isoforma 2 (*17 β -Hsd2*), 5 α -reductasa isoforma 1 (*Srd5a1*), aromatasa (*Cyp19a1*) y sulfatasa de esteroides (*Sts*)] y la expresión de los receptores de estrógeno alfa (*Esr1*) y beta (*Esr2*), progesterona (*Pr*) y andrógenos (*Ar*). Se utilizó un protocolo de PCR en tiempo real optimizado usando la técnica de fluorescencia del ADN doble cadena con colorante intercalante EvaGreen™ (Bracho y col., 2024). La expresión del ARNm de la proteína ribosómica L19 se seleccionó como gen de referencia (control interno) ya que su expresión se mantuvo constante en todas las condiciones experimentales.

Evaluación de la expresión proteica de receptores en el útero. Se estudió la expresión proteica de ESR1, PR, AR mediante inmunohistoquímica siguiendo un protocolo previamente optimizado (Bracho y col., 2024). La inmunomarcación positiva fue evaluada como densidad óptica integrada (DOI) en los compartimentos uterinos donde estas proteínas se expresen de manera nuclear. Para ello se tomaron imágenes de al menos 10 campos en cada sección y se evaluaron 3 secciones por animal con una cámara de video color Spot Insight V 3.5 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) acoplada a un microscopio óptico (Olympus, BH2, Tokio, Japón). Debido a que la DOI es un parámetro adimensional, los resultados se expresan como unidades arbitrarias (Bracho y col., 2024).

Análisis estadístico. Se utilizó el test de Mann-Whitney (SPSS-PASW Statistics v. 20.) donde los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM (Error Estándar de la Media). $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Niveles séricos de hormonas esteroides. Los animales de ambos grupos presentaron niveles detectables de E2 similares entre ellos, sin embargo, los niveles de P4 fueron menores en el grupo SOP (Tabla 1). La relación E2/P4 aumentó en los animales del grupo con SOP con respecto a los del grupo CONTROL (Figura 1). La T no se detectó en los grupos experimentales (Tabla 1).

Hormonas	LD	Media $\pm$ SEM	
		CONTROL	SOP
E2 (pg/mL)	5 pg/mL	13,50 $\pm$ 3,54	18,34 $\pm$ 4,57
P4 (ng/mL)	0,03 ng/mL	22,37 $\pm$ 6,18	5,98 $\pm$ 1,94 *
T (ng/mL)	0,025 ng/mL	ND	ND

Tabla 1. Hormonas esteroideas séricas en animales CONTROL y con SOP. El asterisco indica $p < 0,05$.

LD: Límite de detección, ND: no detectable

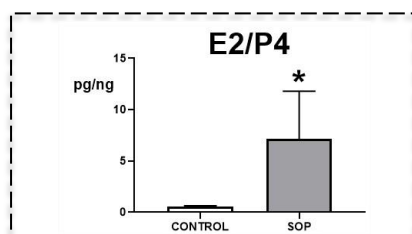


Figura 1. Relación E2/P4 en los animales del grupo CONTROL y SOP. Los datos se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media. El asterisco indica $p < 0,05$.

Expresión de receptores de hormonas esteroideas. En los animales con SOP se observó una disminución de la expresión génica del receptor de andrógenos que no se observó a nivel proteico (Figuras 2 y 3). La expresión del ESR1 aumentó en el epitelio luminal y miometrio de los animales con SOP (Figura 3), mientras que no se observaron cambios en la expresión del PR (Figuras 2 y 3)

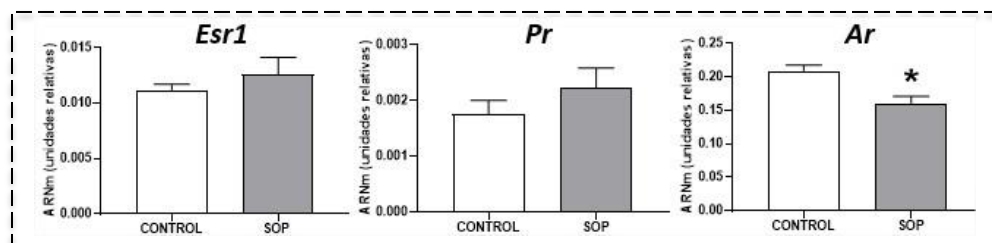


Figura 2. Expresión de ARNm de los receptores de estrógeno alfa (*Esr1*), progesterona (*Pr*) y andrógeno (*Ar*). Los datos se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media. El asterisco indica $p < 0,05$.

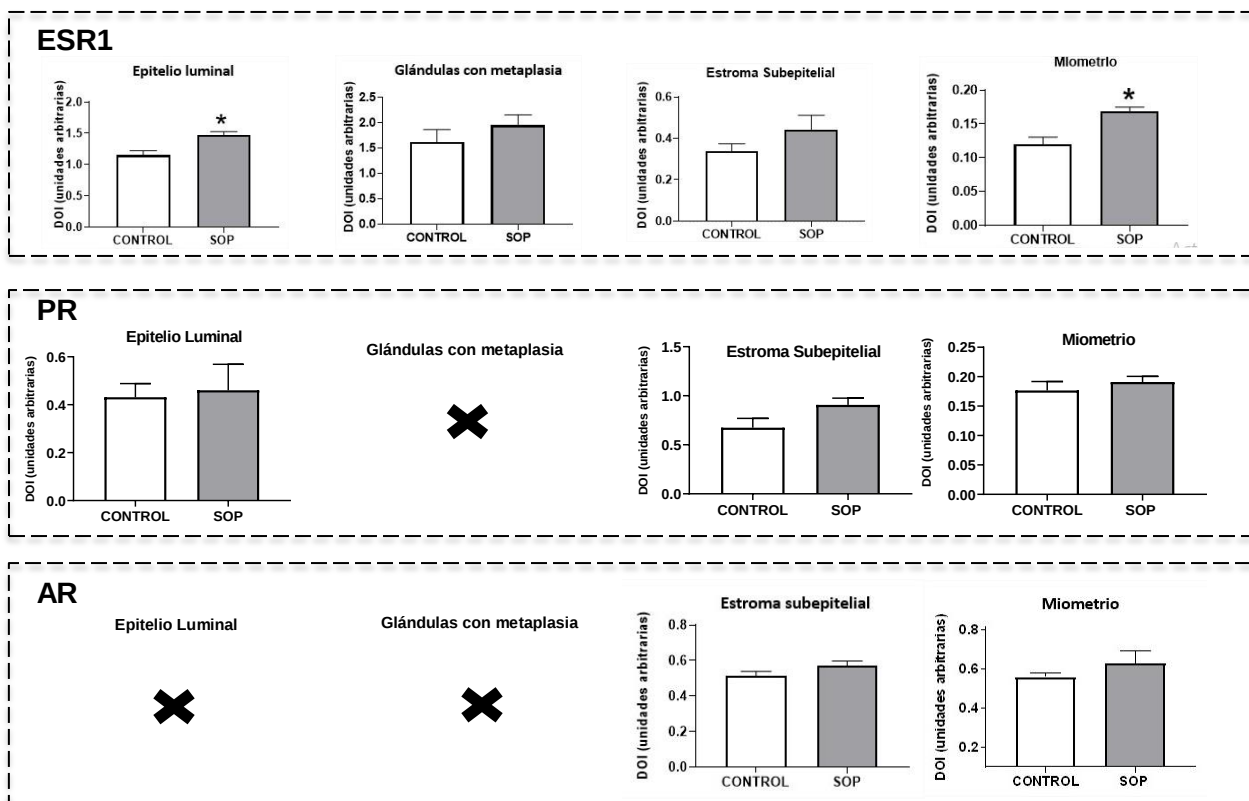


Figura 3. Cuantificación proteica de receptores de estrógenos alfa (ESR1), progesterona (PR) y andrógenos (AR) en diferentes compartimentos uterinos de animales de los grupos CONTROL y SOP. Los datos se expresaron como media $\pm$ error estándar. El asterisco indica $p < 0,05$. La cruz indica que no se

expresa el receptor en ese compartimento. DOI (densidad óptica integrada).

Cuantificación de enzimas esteroidogénicas. La figura 4 muestra un resumen de los cambios observados en las enzimas de la síntesis de esteroides para el grupo SOP.

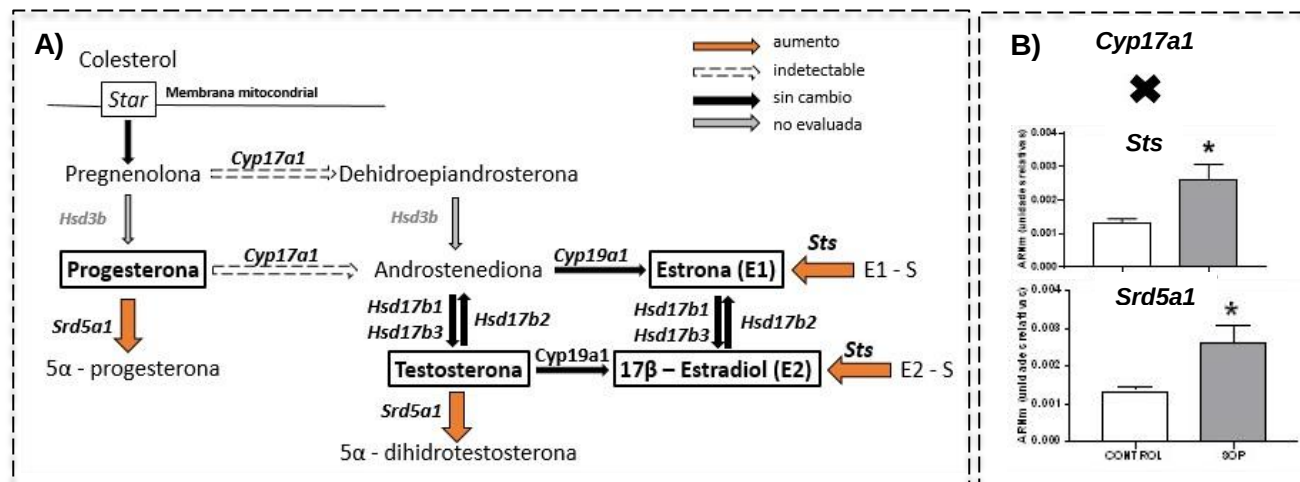


Figura 4. Niveles de transcritos de proteínas implicadas en el metabolismo tisular de hormonas. Las enzimas resaltadas en negritas fueron evaluadas por RT-PCR. **A)** Esquema que resume las principales vías de síntesis de esteroides y los cambios en la expresión de ARNm en el grupo SOP. **B)** Resultados de la cuantificación de los niveles de expresión de ARNm de *Sts* y *Srd5a1*. Los datos se expresaron como media ± error estándar. El asterisco indica $p < 0,05$. La cruz indica que no se detectó el ARNm de la enzima.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que a largo plazo el SOP induce alteraciones en el microambiente endócrino uterino. A nivel sistémico se demostró un menor nivel de P4 lo que determinó un aumento en la relación E2/P4. A nivel tisular la expresión de los transcritos de *Sts* (estrógenos sulfatados → estrógenos) y *Srd5a1* (progesterona → 5α progesterona) fue mayor, lo que favorecía un ambiente estrogénico con menos P4 tisular. Sumado a esto, el aumento en la expresión del ESR1 podría indicar una mayor sensibilidad estrogénica. Todos estos resultados podrían explicar la mayor incidencia/multiplicidad de las lesiones uterinas observadas en los animales con SOP.

BIBLIOGRAFÍA

- Bracho G.S., Iñiguez I., López A.F., Acosta M.V., Kass L., Luque E.H., Bosquiaz V.L., 2023.** Polycystic ovary syndrome alters the endocrine profile and increases histomorphological alterations in the uterus of aged rats in the long-term. Join Meeting (SAIC). Summary. Medicine – Volume 83 – (Supl. V)
- Bracho G. S., Acosta M.V., Altamirano G.A., Alcaraz M.R., Montemurro M., Culzoni M.J., Rossetti M.F., Kass L., Luque E.H., Bosquiaz V.L., 2024.** Uterine histopathology and steroid metabolism in a polycystic ovary syndrome rat model. Mol Cell Endocrinol. 518:110973
- Hardiman P., Pillay O.C., Atiomo W., 2003.** Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. Lancet. 361:1810-1812.
- Zhao P.L., Zhang Q.F., Yan L.Y., 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.