

IMPLICANCIAS DE LA ENZIMA 3 β HIDROXIESTEROIDE DEHIDROGENASA (3 β HSD) EN LA SINTESIS DE ANDROGENOS EN LA ADRENAL HUMANA*

ANDREA DARDIS, NORA SARACO, ESPERANZA BERENZSTEIN, MARCO RIVAROLA, ALICIA BELGOROSKY

Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría Garrahan, Buenos Aires

Resumen La adrenarquia se caracteriza por el aumento de secreción de andrógenos adrenales. Ocurre entre los 6-8 años de edad en humanos. Con el objetivo de evaluar el posible rol regulatorio de la 3 β HSD en la síntesis de andrógenos en la adrenal humana, se analizó la abundancia del ARNm de 3 β HSD (Dot blot y RT-PCR semicuantitativa(S)) en 11 tejidos adrenales humanos normales en dos grupos (Gr) de edades, Gr1: < 8 años (a) (n = 6, r: 0.1-2.5) y Gr2: \geq 8 años (n = 5, r: 8.0-13.0); en tejido de un tumor adrenal con Síndrome de Cushing (TSC) y de 2 T virilizantes (TV) y en células adrenales del TSC y 1 TV al 3er día de cultivo (basal y con ACTH e IGF-1). El ARNm de 3 β HSD fue más alto en el Gr1 que en el Gr2 (Dot blot: 4.65 ± 2.70 y 0.28 ± 0.27 UA, p = 0.006; RT-PCRS: 21.50 ± 12.50 y 6.77 ± 3.78 UA, p = 0.039 resp). Por otra parte, en el tejido TSC (8.74 ± 1.74) fue más alto que en los TV (0.47 ± 0.02 , 0.87 ± 0.08) p = 0.001. En cultivo del TSC el ARNm basal (0.82 ± 0.10) disminuyó con ACTH (0.55 ± 0.06), p = 0.005 y se incrementó con IGF-1 (2.36 ± 0.07) p = 0.006. En el TV no hubo cambios. Al 3er día de cultivo la DHEAS y androstenediona basales fueron en TV 1170.0 ± 210.0 y 335.0 ± 29.0 , TSC 17.1 ± 3.5 y 73.7 ± 11.7 pmol/10⁶ células en 24 hs respectivamente y se incrementaron bajo ACTH en TV (2006.0 ± 360.0 y 525.0 ± 76.0) y en TSC (29.8 ± 5.4 y 366.8 ± 129) p < 0.05 y disminuyeron con IGF-1 sólo en TSC (7.9 ± 2.4 y 43.7 ± 6.1) p < 0.05. Estos datos sugieren que la adrenarquia humana podría ser secundaria a una disminución de la abundancia del ARNm de 3 β HSD. El hecho de que bajo ACTH aumenta la secreción de andrógenos y disminuye el ARNm de 3 β HSD, mientras que el IGF-1 ejerce un efecto inverso, aporta nuevas evidencias del rol regulador ejercido por la 3 β HSD en la síntesis de andrógenos adrenales.

Abstract *Role of 3 β hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) in human adrenal androgen synthesis.* Adrenarche is the maturational increase of adrenal androgens that takes place in 6-8 year old children. In order to study the role of 3 β HSD in the regulation of the synthesis of human adrenal androgens, the abundance of 3 β HSD mRNA (Dot Blot and semiquantitative RT-PCR) was measured in 11 human prepubertal and early pubertal adrenal tissues. Subjects were divided in 2 age groups (Gr): Gr1, < 8 years (y) old (n = 6, range 0.1-2.5) and Gr2, \geq 8 y old (n = 5, range 8.0-13.0). Tissue from one adrenal tumor with Cushing's syndrome (TSC) and 2 virilizing adrenal tumors (TV), as well as adrenal cells prepared from the TSC and from 1 TV were also studied. They were maintained in culture for 3 days in basal conditions (BC) and under ACTH and IGF-1 stimulation. mRNA in Gr1 was higher than in Gr2 (Dot blot: 4.65 ± 2.70 and 0.28 ± 0.27 AU, p = 0.006; RT-PCR: 21.5 ± 12.5 and 6.77 ± 3.78 AU, p = 0.039, respectively). 3 β HSD mRNA in TSC (8.74 ± 1.74) was higher than in the 2 TVs (0.47 ± 0.02 and 0.87 ± 0.08) p = 0.001. In TSC cells, basal mRNA (0.82 ± 0.10) decreased under ACTH (0.55 ± 0.06), p = 0.005, and increased under IGF-1 (2.36 ± 0.07), p = 0.006. No changes were observed in TV cells. On day 3, TV cells in BC secreted 1170.0 ± 210.0 and 335.0 ± 29.0 pmol/10⁶ cells in 24 hs of DHEAS and androstenedione, while TSC cells secreted 17.1 ± 3.5 and 73.7 ± 11.7 , respectively. Values increased under ACTH in TV cells (2006.0 ± 360.0 and 525.0 ± 76.0) and in TSC cells (29.8 ± 5.4 and 366.8 ± 129) p < 0.05, but they decreased under IGF-1 only in TSC cells (7.9 ± 2.4 and 43.7 ± 6.1) p < 0.05. These data support the hypothesis that human adrenarche could be secondary to a decrease of 3 β HSD mRNA. Our finding that when 3 β HSD mRNA decreases androgen secretion increases (ACTH) and when 3 β HSD mRNA increases androgen secretion decreases (IGF-1), strongly suggests that 3 β HSD has a modulatory role in adrenal androgen steroidogenesis.

Key words: 3 β HSD, adrenarche, normal and tumoral adrenal tissue.

La adrenarca o maduración sexual de los andrógenos adrenales se produce solamente en los primates superiores. Se caracteriza por el aumento de dehidroepiandrosterona (DHEA) y sulfato de DHEA (DHEA-S). En el ser humano comienza aproximadamente entre los 6 y 8 años de edad¹. La adrenarca no sería regulada ni por ACTH, gonadotropinas u otro péptido de origen pituitario sino por cambios locales en las células adrenales. Dado que, en la adrenal, la actividad exclusiva 17α hidroxilasa permite que a partir de pregnenolona se sintetice cortisol, mientras que la actividad 17-20 liasa es requerida para la síntesis de andrógenos, se ha postulado que la adrenarca podría ser secundaria a un aumento de la disponibilidad de equivalentes reductores generando un aumento de la relación entre la actividad 17-20 liasa y 17α hidroxilasa². Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser demostrada. Por otro lado, la enzima 3β hidroxies-teroi-de dehidrogenasa (3β HSD) cataliza la conversión de los 3β hidroxí-5-eno en esteroides 3-ceto-4-eno. En el humano han sido clonados dos genes activos para esta enzima y 3 pseudogenes. El ARNm tipo 1 está exclusivamente presente en piel y placenta, mientras que el tipo 2 se expresa predominantemente en adrenal, ovario y testículo. Ha sido descrito en pacientes con carcinomas adrenocorticales una alta concentración intratumoral de andrógenos con una concentración relativa de cortisol normal, siendo la actividad 3β HSD significativamente menor a la observada en glándulas adrenales normales. Estos resultados fueron confirmados a nivel transcripcional por un descenso específico de los niveles de ARNm de 3β HSD y similares niveles de ARNm de la enzima 17α hidroxilasa/17-20 liasa (P450c17) en tejido tumoral comparados con tejido normal. Además, en ambos, las actividades 17-20 liasa y 17α hidroxilasa fueron similares³. Por lo tanto, en el modelo natural de carcinoma adrenal virilizante la hipersecreción de andrógenos podría deberse a una inhibición de la actividad 3β HSD más que a un aumento de la relación actividad 17-20 liasa: actividad 17α hidroxilasa.

Asumiendo como hipótesis que una menor actividad de la enzima 3β HSD podría ejercer un papel regulatorio en la síntesis de andrógenos en las adrenales, y por lo tanto la adrenarca humana podría ser secundaria a una menor actividad de 3β HSD, el objetivo de este estudio fue analizar la abundancia del ARNm de 3β HSD en función de la edad en 11 tejidos adrenales prepuberales normales, y en 2 modelos de tejido adrenal tumoral, uno con baja producción de andrógenos y otro con alta producción androgénica.

Se estudió la abundancia del ARNm de 3β HSD en: 11 tejidos adrenales humanos entre 0.1 y 13.0 años de edad; tejido tumoral proveniente de un paciente con síndrome de Cushing (TSC) de 15.0 años de edad con niveles séricos normales de DHEAS y androstenediona (A) (228.0 y 1.6 ng/ml) y en 2 tejidos tumorales virilizantes

(TV) provenientes de pacientes de 1.5 y 1.2 años con niveles séricos elevados de DHEAS (45810.0 y 16515.0 ng/ml) y de A (21.6 y 27.0 ng/ml). Además se evaluó la abundancia del ARNm de 3β HSD al tercer día de cultivo en el TSC y en un TV, en condiciones basales y luego de la estimulación crónica con ACTH y factor de crecimiento insulina similar 1, recombinante humano (rhIGF-1) en una dosis de 10^{-8} M y 500 ng/ml, respectivamente. También se evaluó la secreción basal y bajo ambos estímulos de DHEAS y A al medio condicionado.

El ARN total fue extraído con TRIzol™ (Gibco BRL). La abundancia del ARNm de 3β HSD en los tejidos adrenales humanos fue evaluada por Dot Blot y transcripción reversa (RT)-PCR semicuantitativa y en los tejidos tumorales sólo por RT-PCR semicuantitativa. El Dot Blot⁴ fue realizado utilizando una sonda de ADNcopia (ADNc) de 3β HSD humana (cedida por el Dr Labrie) y una sonda de ADNc de β -actina, marcadas con ³²P. La RT-PCR semicuantitativa se realizó coamplificando (ADNc en 2 diluciones), en presencia de primers específicos marcados con ³²P, un fragmento de 421 pb del ADNc de 3β HSD y uno de 523 pb del ADNc de β -actina. La coamplificación se llevó a cabo en fase exponencial. La estandarización de la fase exponencial se realizó utilizando ADNc de placenta como templado. Se observó que a los 20 ciclos tanto la β -actina como la 3β HSD se encontraban en la fase exponencial de amplificación. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de poli-acrilamida y se revelaron por radioautografía. La cuantificación final se realizó por densitometría. Los resultados se expresaron como la relación entre 3β HSD/ β -actina. Para determinar el tamaño del ARNm de 3β HSD tipo 2 se realizó Northern Blot⁵ en 3 muestras observándose la banda de 1.7 Kb correspondiente (Figura 1 panel inferior).

Las células tumorales en cultivo fueron obtenidas luego de una doble digestión con colagenasa y sembradas en placa de cultivo (5×10^5 células/well) y en frascos de cultivo para extracción del ARN total (3×10^6 células) en presencia de medio químicamente definido más 10% de suero fetal bovino. A las 48 hs se removió el medio y se reemplazó por medio fresco sin suero, con o sin estímulos (ACTH y rhIGF-1). Luego de 24 hs se recolectaron los medios condicionados, se cosecharon las células incubando la monocapa con tripsina-EDTA y se realizó el recuento celular. La DHEAS y A fueron determinadas por RIA. La abundancia del ARNm de 3β HSD se analizó por RT-PCR semicuantitativa.

El análisis estadístico de la abundancia del ARNm se realizó utilizando el Test de t de Student y el de los niveles de esteroides en los medios condicionados utilizando el Análisis de la Varianza y Test de Bonferroni.

Para el análisis de los resultados los tejidos adrenales normales fueron divididos en 2 grupos (Gr) en función de la edad cronológica, Gr1 menores de 8 años (n = 6, ran-

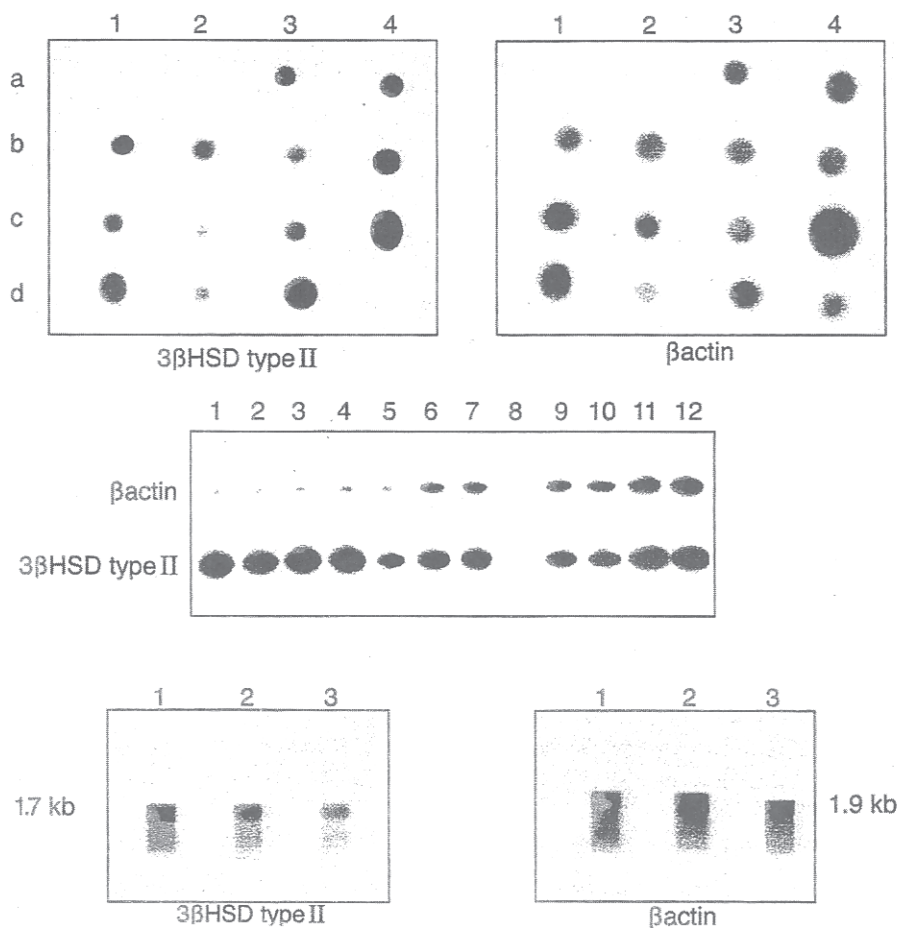


Fig. 1.- Paneles superiores. Autorradiografía del Dot blot luego de hibridización con β-actina (βactin y 3β HSD (3β HSD type II)). Desde a3 a d1: "dots" correspondientes a ARN de tejidos adrenales de 11 individuos normales, ordenados por edad cronológica, 3β HSD tipo 2 (izquierda) y β-actina (derecha). d2: placenta, d3: adrenal adulta normal, d4: leucocitos de sangre periférica. Panel medio. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos amplificados por RT-PCR semicuantitativa. Calles 1-4: tejido adrenal de un sujeto de 0.6 años de edad en 2 diluciones, por duplicado. Calles 5-7: tejido adrenal de un sujeto de 9 años de edad en 2 diluciones, muestra simple (calle 5) y duplicados (calles 6-7). Calle 8: control negativo. Calles 9-12: tejido adrenal de un sujeto de 11 años de edad en 2 diluciones, por duplicado. Panel inferior. Northern blot del ARNm de 3β HSD tipo 2 (izquierda) y β actina (derecha) de tres individuos de 0.1, 0.6 y 1.6 años de edad.

TABLA 1.- Abundancia del ARNm de 3β HSD en células adrenales tumorales en cultivo y en tejido adrenal tumoral

	Basal	ACTH	rhIGF-1	TAT
TSC	0.82 ± 0.10	0.55 ± 0.06 ⁺⁺	2.36 ± 0.07 ⁺⁺	8.74 ± 1.74
TV	0.04 ± 0.01 [*]	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.47 ± 0.02 ⁺
TV	-	-	-	0.87 ± 0.08 ⁺

Los resultados están expresados en unidades arbitrarias (Media ± DS)
 TSC: Tumor síndrome de Cushing; TV: Tumor virilizante; TAT: Tejido adrenal tumoral;
 rhIGF-1: Factor de crecimiento insulina símil 1, recombinante humano; ⁺TV vs TSC,
 p = 0.01; ⁺⁺ vs Basal p = 0.005; ^{*} TV vs TSC p = 0.001

go 0.1-2.5 años) y Gr2 iguales o mayores de 8 años (n = 5, rango 8.0-13.0 años). La abundancia del ARNm de 3 β HSD determinada por Dot Blot y RT-PCR semicuantitativa (Figura 1 paneles superiores y medio, respectivamente) fue significativamente mayor en el Gr1 (Media \pm DS, 4.65 \pm 2.70 y 21.50 \pm 12.50 unidades arbitrarias-UA-, respectivamente) que en el Gr2 (0.28 \pm 0.27 y 6.77 \pm 3.78 UA, respectivamente), p = 0.006 y p = 0.039 respectivamente. En los tejidos adrenales tumorales se observó que la abundancia del ARNm de 3 β HSD fue significativamente más alta en el TSC que en los TV (Tabla 1) p = 0.01. Al tercer día de cultivo, en el TSC la abundancia del ARNm de 3 β HSD disminuyó significativamente bajo ACTH (p = 0.005), mientras que bajo el rhIGF-1 se observó un aumento significativo (p = 0.005). Sin embargo en el TV no se observaron cambios bajo ACTH e rhIGF-1 pero el basal fue significativamente más bajo que en el TSC p = 0.001 (Tabla 1). Además, la secreción basal al medio condicionado de DHEAS y A fue en el TV significativamente más alta (1170.0 \pm 210.0 y 335.0 \pm 29.0 pmol/10⁶ células en 24 hs) que en el TSC (17.1 \pm 3.5 y 73.7 \pm 11.7 pmol/10⁶ células en 24 hs, respectivamente) p = 0.001. Bajo ACTH, la DHEAS y A aumentaron significativamente en ambos tumores (TV: 2006.0 \pm 360.0 y 525.0 \pm 76.0 pmol/10⁶ en células. 24 hs; TSC: 29.8 \pm 5.4 y 366.8 \pm 129.0 pmol/10⁶ células en 24 hs, respectivamente) p < 0.05. Bajo rhIGF-1, sólo en el TSC la DHEAS y la A disminuyeron significativamente (7.9 \pm 2.4 y 43.7 \pm 6.1 pmol/10⁶ células en 24 hs, respectivamente) p < 0.05.

Este estudio demuestra que la abundancia del ARNm de 3 β HSD en tejido adrenal humano normal prepuberal es más alta en el grupo de menor edad que en el grupo con edades comprendidas entre 8.0-13.0 años. Dado que la adrenarca en el hombre aparece a partir de los 8 años de edad⁶, estos resultados sugieren que los cambios en la actividad de la enzima 3 β HSD podrían estar involucrados en la aparición de la adrenarca. Ha sido descrito que la zona reticularis en la adrenal humana comienza a diferenciarse a partir de los 4 años de edad⁷. Por otro lado, dado el hecho que la actividad 3 β HSD es baja en este tipo celular⁸ los resultados de este estudio podrían reflejar un incremento en la población celular de la zona reticularis. Sin embargo, son interesantes los resultados hallados en este estudio cuando se analizó la abundancia del ARNm de 3 β HSD en un modelo de tejido adrenal tumoral con baja síntesis de andrógenos y otro con alta producción androgénica. Utilizando este modelo se halló que el incremento de la vía androgénica se asocia a un descenso de la abundancia del ARNm de 3 β HSD, mientras que una disminución de la síntesis de andrógenos se asocia a un incremento de la abundancia del ARNm de 3 β HSD. Más aún, las células tumorales en cultivo provenientes de TSC fueron capaces de respon-

der al estímulo con ACTH incrementando la vía androgénica. Este incremento se asoció a una disminución de la abundancia del ARNm de 3 β HSD. Además, el hecho que bajo rhIGF-1 en el TSC el incremento de la abundancia del ARNm de 3 β HSD se asoció con una disminución de la secreción de andrógenos refuerza aún más la hipótesis de que la actividad de 3 β HSD podría regular la síntesis de andrógenos en la adrenal humana. Sin embargo, la falta de respuesta al estímulo con rhIGF-1 en las células del TV en cultivo no es clara, se podría especular con la presencia de una alteración del receptor de IGF-1 tipo 1 en este tipo celular. Nuestros resultados sugieren que la adrenarca humana podría ser secundaria a una disminución de la abundancia del ARNm de 3 β HSD, no sólo por incremento de la población de células reticulares sino que podría haber cambios madurativos intraadrenales. Finalmente estos resultados refuerzan la hipótesis de que la expresión del gen de 3 β HSD sería la llave reguladora de la síntesis de andrógenos en la adrenal humana.

Bibliografía

1. Sklar CA, Kaplan SL, Grumbach MM. Evidence for dissociation between adrenarche and gonadarche studies in patients with idiopathic precocious puberty, gonadal dysgenesis, isolated gonadotrofin deficiency and constitutionally delayed growth and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 548-56.
2. Lin D, Black SM, Nagaham Y, Miller WL. Steroid 17 α hydroxylase and 17-20 lyase. Activities of P450c17. Contributions of serine 106 and P450 reductase. *Endocrinology* 1993; 132: 2498-506.
3. Sakai Y, Yanase T, Hara T, Yakayanagi R, Haji M, Nawata H. Mechanism of abnormal production of adrenal androgens in patients with adrenocortical adenomas and carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 36-9.
4. Voutilainen R, Tapanainen J, Chung B-Ch, Matteson KJ, Miller WL. Hormonal regulation of P450c17 (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase) in cultured human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 202-7.
5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, Cold Spring Harbor; Laboratory Press, 1989, p 46-52
6. Parker LN. Adrenarche. *Endocrinol Metab Clin NA* 1991; 20: 71-8.
7. Gell JS, Atkins B, Margraf L, et al. Adrenarche associated with decreased 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in the adrenal reticularis. *Endocr Res* 1996; 22: 723-8.
8. Endoh A, Kristiansen SB, Casson PR, Buster JE, Hornsby PJ. The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 3558-65.