

HIPERANDROGENIZACIÓN PRENATAL EN RATAS Y EL METABOLISMO LIPÍDICO EN LA VIDA ADULTA

MARÍA F. HEBER, LEANDRO M. VÉLEZ, SILVANA R. FERREIRA, SABRINA AMALFI, ALICIA B. MOTTA

Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), UBA-CONICET, Buenos Aires

Resumen El síndrome del ovario poliquístico (PCOS) es una afección de alta incidencia en mujeres en edad fértil. Si bien la etiología de la enfermedad se desconoce, se cree que la exposición a andrógenos durante la vida intrauterina generaría reprogramación fetal afectando vías endocrinas y metabólicas que, junto a alteraciones génicas y ambientales, inducirían la aparición de PCOS en etapas muy tempranas de la vida. Es por ello que se buscan marcadores tempranos del desarrollo de PCOS. Utilizando un modelo murino de hiperandrogenización prenatal (HA) recreamos dos fenotipos de PCOS: ovulatorio y anovulatorio. La HA no alteró el colesterol circulante pero disminuyó el colesterol HDL y aumentó el LDL y los triglicéridos (TG) con respecto a los controles. La relación colesterol total/HDL como marcador de riesgo cardiovascular y la relación TG/HDL se vieron incrementadas con respecto a los controles, resultando mayor en el grupo PCOS anovulatorio. El presente trabajo demuestra la importancia de la determinación del perfil lipídico a edades tempranas en poblaciones de riesgo (como es el caso de hijas de madres con PCOS).

Palabras clave: síndrome del ovario poliquístico, dislipidemia, colesterol, triglicéridos, bajo peso al nacer, obesidad

Abstract *The role of prenatal hyperandrogenism on lipid metabolism during adult life in a rat model.*

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the commonest endocrine diseases that affect women in their reproductive ages; however, the etiology of the syndrome remains unknown. A hypothesis proposes that during gestation increased exposure of androgen would induce fetal programming that may increase the risk of PCOS development during the adult life. By means of a prenatally hyperandrogenized (HA) rat model we demonstrated the importance of determining the lipid profile at early ages. HA induced two different phenotypes: ovulatory and anovulatory PCOS. HA did not modify total cholesterol but decreased HDL cholesterol and increased both LDL and triglycerides (TG) when compared with controls. Both, the ratio total cholesterol: HDL (marker of cardiovascular risk) and TG:HDL (marker of metabolic syndrome) were increased in the HA group with respect to controls. In addition, these abnormalities were stronger in the anovulatory than ovulatory phenotype. Our results point out the need to find early markers of PCOS in girls or adolescents with increased risk to develop PCOS (as in daughters of women with PCOS).

Key words: polycystic ovary syndrome, dyslipidemia, cholesterol, triglycerides, low weight at birth, obesity

El síndrome del ovario poliquístico (PCOS) es una patología heterogénea con alta incidencia en mujeres en edad fértil; entre el 8 y el 12% de mujeres padecen PCOS¹. Según los últimos consensos (Rotterdam de 2003 y *Androgen Excess and PCOS Society* de 2006) aquellas mujeres que presenten dos de las siguientes alteraciones: i) oligo- o anovulación, ii) hiperandrogenismo clínico o bioquímico o iii) ovarios poliquísticos serán

diagnosticadas con PCOS¹. PCOS es mucho más que una enfermedad reproductiva, ya que la paciente puede presentar alteraciones del tipo metabólico y de la salud en general como insulino resistencia, riesgo cardiovascular incrementado, desbalance en el metabolismo lipídico y diabetes mellitus tipo 2^{2, 3, 4}. La aparición de PCOS es la suma de componentes génicos, ambientales y de estilo de vida. Si bien la etiología del síndrome no se ha establecido fehacientemente, se postula que durante la etapa gestacional un exceso de andrógenos induciría reprogramación génica de ciertos caminos endocrinos y metabólicos del feto en desarrollo². El hiperandrogenismo prenatal induciría condiciones de nutrición deficientes en el feto en desarrollo que se traduce en afecciones post-nacimiento⁵. Este mecanismo provocaría una mayor secreción de andrógenos suprarrenales⁶, adrena

Recibido: 31-I-2012

Aceptado: 16-VII-2012

Dirección postal: Dra. Alicia B. Motta, Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4508-3680 e-mail: aliciabmotta@yahoo.com.ar

precoz⁷ y alteración del metabolismo lipídico por lo que, durante la vida adulta, estas mujeres pueden a su vez presentar obesidad⁸. Las alteraciones en el metabolismo lipídico aumentan la condición de insulino resistencia que se presenta en las mujeres con PCOS y que en definitiva agravan su condición². Es la acumulación de grasa del tipo androide, más que el peso corporal, la que determina la presencia de insulino resistencia^{8, 9} y el aumento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares¹⁰. Los modelos murinos resultan de suma utilidad para el estudio del desarrollo y tratamiento del PCOS. Entre ellos, el de hiperandrogenización prenatal es el que más se acerca a lo que ocurre en la patología y por ello es uno de los más aceptados en la literatura. Este modelo presenta la ventaja de permitir el estudio de la reprogramación fetal^{11, 12}. Existe acuerdo en cuanto al momento de la administración del andrógeno en la rata en gestación (entre los días 16 y 19 del período gestacional por ser el período en el que se postula que el andrógeno altera la secreción de GnRH); sin embargo, se presentan controversias en cuanto a la dosis de testosterona a administrar. Wu y col.¹³ demostraron que a dosis mayores a 3 mg de testosterona libre se induce incremento de la mortalidad fetal y reabsorción embrionaria con respecto a los controles. Sin embargo, Demissie y col.¹⁴ encontraron que la inyección de 5 mg de testosterona libre no induce alteración en la viabilidad fetal. Estudios previos de nuestro laboratorio coinciden en parte con el grupo de Wu y col.¹³ ya que dosis mayores de 3 mg de testosterona inducían alteraciones en el número de crías nacidas, y es por ello que desarrollamos un modelo de hiperandrogenización prenatal (HA) tratando con 2 mg de testosterona libre. En un trabajo previo, inyectamos

2 mg/día de testosterona en ratas Sprague Dawley desde el día 16 hasta el 19 de preñez y estudiamos las crías hembras a los 21 y 60 días de edad. La HA disminuyó el peso corporal a los 21 días de edad en comparación con los controles¹⁵; sin embargo, a los 60 días de edad no existía diferencia entre el peso corporal de los animales HA y los controles¹⁵. Asimismo, la pendiente de la curva del crecimiento corporal era significativamente mayor en los animales HA respecto de los controles lo que sugería la existencia de un mecanismo compensatorio contrarrestando el ambiente intrauterino desfavorable en los animales HA¹⁵. Según lo expuesto, el objetivo de nuestro trabajo fue establecer el alcance de la HA sobre el metabolismo lipídico como mecanismo compensatorio de la malnutrición uterina.

Materiales y métodos

Ratas Sprague-Dawley preñadas recibieron inyecciones subcutáneas diarias de 2 mg de testosterona libre (Sigma T-1500) disuelta en 100 µl de aceite entre los días 16 a 19 de gestación (HA) mientras que el grupo control recibió vehículo (C). A los 21 días de nacimiento las crías se separaron de sus madres y se utilizaron solo las hembras. Los tratamientos no modificaron el número ni el sexo de las crías, el índice de mortalidad al nacimiento ni el tiempo de gestación. Un total de 10 animales por grupo tuvieron libre acceso a comida (*Purina Regular Chow*) y agua. Se determinó que la ingesta calórica entre el grupo control y HA fue la misma. Los animales recibieron un régimen de 12 h luz, 12 h oscuridad a 24 °C. A los 60 días del nacimiento y con un régimen de 8 horas de ayuno, los animales fueron anestesiados en atmósfera de dióxido de carbono y luego sacrificados por decapitación. De la sangre aislada se separó el suero en el que se evaluó el perfil lipídico por cuantificación de colesterol total con *kit*

TABLA 1.– Determinación del ciclo estral y de la relación colesterol total/HDL y TG/HDL de los grupos control (C) e hiperandrogenizado prenatalmente (HA). Los resultados se analizaron por la prueba *t*-Student para valores no pareados. a vs. b; a vs. c; b vs. c; e vs. f; e vs. g; f vs. g; *p* = 0.001. Cada valor representa la media + desviación estándar, *n* = 10 animales/grupo

	Controles (C)		Hiperandrogenizados (HA)
Ciclan	100%		68%
Ciclo regular	30%		20%
			(fenotipo: quistes + ovulación)
No ciclan	0%		32%
			(fenotipo: quistes + anovulación)
Relación			
Colesterol total/HDL	1.564 ± 0.181 ^a	Ciclan	2.203 ± 0.043 ^b
		No ciclan	2.280 ± 0.087 ^c
Relación			
TG/HDL	0.320 ± 0.188 ^d	Ciclan	1.574 ± 0.170 ^e
		No ciclan	1.874 ± 0.040 ^f

Colestat enzimático AA, los triglicéridos (TG) con *TG Color AA*, y el colesterol HDL con *HDL Colesterol monofase AA plus* (Wiener, USA). Todos los *kits* detectan peróxido de hidrógeno como producto de degradación de colesterol, TG y HDL colesterol respectivamente. La reacción se midió por espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm y en el caso del HDL colesterol a 600 nm. El límite de detección es 0.63 mg/dl para colesterol, 0.9 mg/dl suero para TG y 4 mg/dl para HDL colesterol. El LDL colesterol se estimó indirectamente mediante la fórmula de Friedewald¹⁶, donde $LDL = \text{colesterol total} - HDL + \text{triglicéridos}/5$.

Análisis estadístico: Los resultados se analizaron por la prueba t-Student para valores no pareados; se consideró significativo cuando $P < 0.05$.

Resultados

Encontramos que el grupo HA presentaba niveles incrementados de testosterona circulante y por estudios histológicos determinamos la existencia de 3 quistes/

ovario, tal como en estudios previos¹⁵. Evaluamos el ciclo estral, desde los 45 a los 60 días de edad en ambos grupos ($n = 20/\text{grupo}$) mediante el estudio citológico del extendido vaginal. El 100% de los animales del grupo C presentaban ciclos estrales, de los cuales el 70% eran irregulares (de mayor duración debido a su condición de pubertad). En el grupo HA encontramos dos fenotipos de PCOS, el 68% de los animales HA ciclaban (el 80% con ciclos irregulares) mientras que el 32% presentaban fenotipo anovulatorio. Concluimos que la HA alteró el número y extensión del ciclo estral (Tabla 1).

Los grupos C y HA presentaron niveles similares de colesterol circulante (Fig. 1a). Al analizar el colesterol HDL y LDL se observó que en el grupo HA el HDL estaba disminuido (Fig. 1b), $p = 0.001$, mientras que el LDL incrementado (Fig. 1c), $p = 0.0001$, con respecto a los controles. El nivel sérico de TG estaba aumentado en el grupo HA con respecto a C (Fig. 1d), $p = 0.0001$.

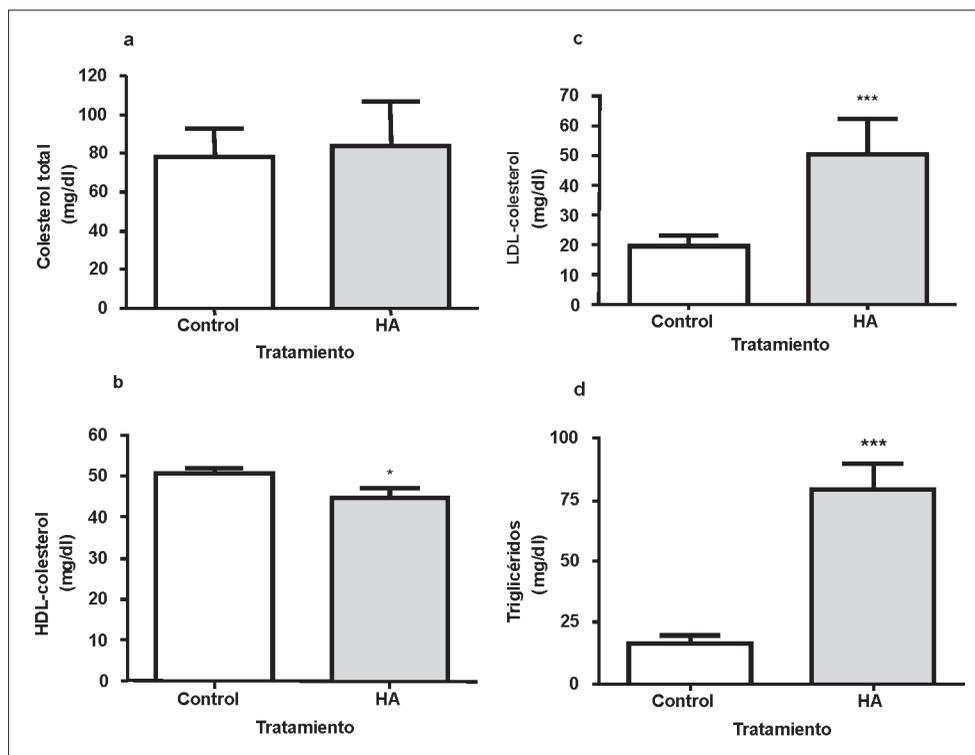


Fig. 1.— a) Niveles de colesterol total en suero de ratas Sprague-Dawley control (C) e hiperandrogenizadas prenatalmente (HA). El colesterol se midió utilizando un *kit* de Wiener, USA. Cada columna representa la media + desviación estándar ($n = 10$). Los valores están representados en mg/dl. Los resultados se analizaron por la prueba t-Student para valores no pareados. Los valores no son significativos ($p > 0.05$). b) Niveles de colesterol HDL en suero de ratas C y HA. El colesterol HDL se midió utilizando un *kit* de Wiener, USA. Cada columna representa la media + desviación estándar ($n = 10$). Los valores están representados en mg/dl. Los resultados se analizaron por la prueba t-Student para valores no pareados, a vs. b; $p = 0.001$. c) Niveles de colesterol LDL en suero de ratas Sprague-Dawley C y HA. El LDL colesterol se estimó indirectamente con la fórmula $LDL = \text{colesterol total} - HDL + \text{triglicéridos}/5$. Cada columna representa la media + desviación estándar ($n = 10$). Los valores están representados en mg/dl. Los resultados se analizaron por la prueba t-Student para valores no pareados, a vs. b; $p = 0.0001$. d) Niveles de triglicéridos en suero de ratas Sprague-Dawley C y HA. La medición se realizó usando un *kit* de Wiener, USA. Cada columna representa la media + desviación estándar ($n = 10$). Los valores están representados en mg/dl. Los resultados se analizaron por la prueba t-Student para valores no pareados, a vs. b; $p = 0.0001$.

Discusión

La dislipidemia y la insulino resistencia son dos agravantes en el desarrollo de PCOS¹⁻³, pero a su vez el hiperandrogenismo contribuye a la insulino resistencia por alterar la funcionalidad del tejido adiposo¹⁷. La insulino resistencia determina el fenotipo PCOS e incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares¹⁸⁻²⁰.

La relación colesterol total/HDL, tanto como la de LDL/HDL son conocidos como índices aterogénicos y de riesgo cardiovascular²¹. La obesidad, la hiperglucemia y la insulino resistencia elevan los niveles de TG y es por ello que la relación TG/HDL se toma como marcador de síndrome metabólico²². En el presente trabajo de investigación encontramos dos fenotipos PCOS. Analizando el fenotipo anovulatorio vemos que el mismo presentó mayor relación Colesterol total/HDL y TG/HDL con lo que podríamos sugerir que este fenotipo tendría un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y del síndrome metabólico.

Considerando que los animales de los grupos C y HA presentaban a los 60 días igual peso corporal, mientras que los del grupo HA mostraron dislipidemia sérica, podemos concluir que la concentración de colesterol HDL y LDL y los TG, y no el peso corporal, resultan ser buenos marcadores del desarrollo de PCOS durante la vida adulta. Nuestros resultados coinciden con los del grupo de Rizzo y col.²³ en la búsqueda de marcadores de síndrome metabólico y riesgo cardiovascular en una población determinada de mujeres con PCOS y con aquellos autores que establecen que el desbalance lipídico y no la obesidad sería un buen marcador temprano de PCOS⁸. Estamos abocados al estudio de la composición de la grasa corporal y a nuevos marcadores del síndrome de insulino resistencia así como la funcionalidad hepática en el grupo HA.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el apoyo económico a través del PICT 71/2010 y a la Lic. Marcela Márquez y el Lic. Enzo Cuba por el apoyo técnico para el cuidado de los animales.

Conflictos de interés: No existen conflictos de interés a declarar.

Bibliografía

1. Azziz R. PCOS: A diagnostic challenge. *Reprod Biomed Online* 2004; 6: 644-8.
2. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol* 2002; 174: 1-5.
3. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *New Engl J Med* 1995; 333: 853- 61.
4. Azziz R, Dumesic DA, Goodarzi MO. Polycystic ovary syndrome: an ancient disorder? *Fertil Steril* 2011; 95: 1544-8.
5. Zegher F, Ibañez L. Prenatal growth restraint followed by catch-up of weight: a hyperinsulinemic pathway to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 86: 4-5.
6. Ong KK, Dunger DB. Birth weight, infant growth and insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 131-9.
7. Marti-Henneberg C, Vizmanos B. The duration of puberty in girls is related to the timing of its onset. *J Pediatr* 1997; 131: 618-21.
8. Kirchengast S, Huber J. Body composition characteristics and body fat distribution in lean women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16: 1255-60.
9. Hong Y, Yang D, Liu W, et al. Dyslipidemia in relation to body mass index and insulin resistance in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2011; 25: 365-74.
10. Wild RA. Dyslipidemia in PCOS. *Steroids*. 2012; 77: 295-9.
11. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Abbott DH, et al. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to offspring of overweight females. *Endocrinology* 2010; 151: 595-605.
12. Nisenblat V, Norman RJ. Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16: 224-31.
13. Wu XY, Li ZL, Wu CY, et al. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats. *Endocr J* 2010; 57: 201-9.
14. Demissie M, Lazic M, Foecking EM, et al. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E262-8.
15. Amalfi S, Velez L, Heber F, et al. Prenatal hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depend on the levels of testosterone. *PLoS One* 2012; 7: e37658.
16. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
17. Corbould A. Chronic testosterone induces defective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. *J Endocrinol* 2007; 192: 585-94.
18. Austin MA, King MC, Vranizan KM, et al. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 80: 495-506.
19. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM* 2006; 99: 1-14.
20. Ibañez L, Valls C, Potau N, et al. Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: ontogeny of the low-birth-weight effect. *Clin Endocrinol* 2001; 55: 667-72.
21. Kimm H, Lee SW, Lee HS, et al. Associations between lipid measures and metabolic syndrome, insulin resistance and adiponectin. - Usefulness of lipid ratios in Korean men and women. *Circ J* 2010; 74: 931-7.
22. Wierzbicki AS, Clarke RE, Viljoen A, Mikhailidis DP. Triglycerides: a case for treatment? *Curr Opin Cardiol* 2012; 398: 398-404.
23. Rizzo M, Longo RA, Guastella E, et al. Assessing cardiovascular risk in Mediterranean women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2011; 34: 422-6.