

EFECTOS DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN RATAS

Gabriela Arata de Bellabarba, Nelia González de Moreno

Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción - Departamento de Fisiopatología
Facultad de Medicina - Universidad de Los Andes
Mérida - Venezuela

RESUMEN

La dehidroepiandrosterona (DHEA) y su ester sulfato (DHEA-S) son los esteroides más abundantes producidos por la corteza suprarrenal. A pesar de que sus funciones específicas no han sido claramente establecidas, se sabe que un aumento en los niveles séricos de la DHEA-S puede ir asociado con anovulación o con muerte fetal. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de la DHEA en dosis de 20 mg/Kg de peso (experimentales) o el vehículo (controles) durante los días 5º al 8º (implantación), 9º al 14º (embriogénesis) y 15º al 19º (crecimiento fetal). El día 20º, los úteros se extrajeron, se fijaron, se pesaron y luego, se disecaron los fetos, se pesaron y se estudiaron macroscópicamente. Cuando la DHEA se administró durante los períodos de implantación y embriogénesis no se obtuvieron fetos a término. Durante la última etapa (días 15º al 19º), la DHEA produjo una disminución significativa ($p < 0,001$) en el peso fetal (1,84 gr/feto vs 2,11 gr/feto control), sin alteración de su viabilidad. Los resultados demuestran que la administración de la DHEA durante las etapas de implantación y embriogénesis inhibe total y selectivamente el desarrollo del embrión, mientras que, durante la etapa de crecimiento fetal, la DHEA reduce el peso de los fetos sin alterar su anatomía macroscópica externa.

Palabras claves:

Dehidroepiandrosterona, Desarrollo embrionario, Mecanismos.

ABSTRACT

The dehydroepiandrosterone (DHEA) and its ester sulfate (DHEA-S) are the most abundant steroids produced by the adrenal cortex. Spite that its specific functions have not been clearly established, it's known that an increase in its serum value may be associated with anovulation and fetal of DHEA administration on rat embryo development. Pregnant rats were

injected with 20 mg/Kg of DHEA (experimental) or vehicle (control) on days 5th to 19th (fetal growth). On the 20th day animals were killed, the uterus dissected and the number, development and fetal weight registered. When DHEA was administered during the 5th to 14th day there were not well established fetuses. Administration of DHEA, during the 15th to 19th day diminished significantly ($p < 0,001$) embryo weight (1,84 gr/fetus vs 2,11 gr/fetus control) without affecting fetal viability. These results show that DHEA administration inhibits totally and selectively embryo development, while its administration on a later period (fetal growth) only affects fetal weight.

Key words:

dehydroepiandrosterone, embryo development, mechanism.

INTRODUCCIÓN

La dehidroepiandrosterona (DHEA) y su ester sulfato (DHEA-S), son los esteroides más abundantes producidos por la corteza suprarrenal de muchas especies, incluyéndose el hombre, sin embargo su función específica aún no está definida⁽¹⁾. Se sabe que la secreción de DHEA-S disminuye con la edad pero el significado funcional es incierto⁽²⁾; evidencias clínicas y experimentales sugieren que este andrógeno juega un rol importante en la prevención de la arterioesclerosis^(3,4), de la obesidad⁽⁵⁾ y del cáncer^(6,7,8).

Por otra parte es bien conocida la asociación entre niveles elevados de andrógenos y alteraciones en la función reproductiva de la mujer^(9,10,11,12). Una hiperfunción de la glándula suprarrenal produce un aumento importante en los niveles de DHEA-S la cual, además de ser un andrógeno débil, es sustrato para la síntesis de andrógenos más potentes⁽¹³⁾. En mujeres embarazadas con hiperandrogenismo se ha reportado un aumento en la frecuencia de muerte fetal⁽¹⁴⁾ y experimentalmente se ha demostrado que

la administración de DHEA inhibe la blastogénesis (15,16). El efecto de la hiperandrogenemia podría ser directo sobre el embrión y/o indirecto sobre el endometrio o sobre el cuerpo lúteo. Recientemente se demostró que la administración de DHEA, durante los primeros 4 días de la preñez en ratas, afecta directamente la formación del blastocisto pero no la función del cuerpo lúteo(16). Si el efecto es selectivo para el embrión, un aumento en los niveles de la DHEA durante cualquier período de la preñez, debería afectar el número y el desarrollo normal de los embriones. Este trabajo tiene como objetivo estudiar los efectos de la administración de la DHEA, durante las diferentes etapas de la preñez de la rata (implantación, embriogénesis y crecimiento fetal), sobre el desarrollo del embrión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron ratas Wister con un peso promedio de 200 ± 10 gr, colocadas en jaulas individuales con comida y agua a voluntad. El día del proestro, las ratas se aparearon con machos de fertilidad probada y a la mañana siguiente, se corroboró la presencia de espermatozoides en la vagina. Este día se consideró como el primer día de la preñez.

Esteroides:

La solución de dehidroepiandrosterona (Merck), se preparó en etanol y aceite de maíz comercial (1:9), se administró por vía subcutánea en un volumen de 0.1 ml, y la dosis utilizada fue de 20 mg/Kg de peso.

Experimentos:

A. Se conformaron 3 grupos de ratas preñadas; en cada grupo la mitad de las ratas fueron tratadas con DHEA a dosis de 20 mg/Kg de peso (experimentales) y las restantes, fueron inyectadas con el vehículo (controles). Los días seleccionados para administrar la DHEA, corresponden a las etapas del desarrollo embrionario descritas para los roedores(17) y fueron los siguientes:

Grupo I: conformado por 12 ratas preñadas, las cuales fueron inyectadas, durante los días 5º al 8º de la preñez. Durante este intervalo de tiempo, el embrión en estadio de blastocisto llega al útero y se implanta en el endometrio (etapa de implantación).

Grupo II: conformado por 12 animales, los cuales fueron inyectados durante los días 9º al 14º de la preñez. Durante este período el embrión ya implantado experimenta su desarrollo embrionario temprano (etapa correspondiente a la embriogénesis).

Grupo III: constituido por 16 ratas, las cuales fueron inyectadas durante los días 15º al 19º de la preñez. Este lapso de tiempo corresponde a la última etapa de la preñez en la cual ocurre el crecimiento fetal.

El día 20 de la preñez, los animales de todos los grupos fueron pesados y sacrificados por sobredosis de éter. Luego de una incisión en la región pélvico-abdominal se les extrajeron los cuernos uterinos; éstos se libraron del tejido graso adyacente y se pesaron en una balanza de precisión (Mettler, H5). Posteriormente se procedió a colocar las muestras en el líquido fijador (Bouin) y al cabo de 72 horas, se disecó la pared del útero y se pesaron individualmente. Los fetos fueron examinados bajo la lupa estereoscópica a fin de establecer la normalidad o anomalía de su conformación externa.

B. Para descartar un posible efecto directo de la DHEA sobre el endometrio, se conformó un grupo de 10 ratas preñadas: 5 fueron inyectadas con DHEA (20 mg/Kg de peso) y 5 con el vehículo (control), durante los días previos a la implantación (días 1º al 4º de la preñez).

Al 5º día los animales se sacrificaron, se les extrajeron los cuernos uterinos e inmediatamente después, los úteros fueron fijados y preparados para su estudio histológico.

Preparación del tejido para microscopía óptica:

Luego de fijado, el tejido fue deshidratado, incluido en parafina y cortado a 5 micras de espesor. Posteriormente, los cortes se colorearon con hematoxilina y eosina y se observaron en un microscopio Zeiss Standard.

Análisis estadístico:

El peso de los úteros, así como el número y el peso de los fetos, obtenidos en cada grupo de ratas, se reportó como el valor promedio de cada uno con su respectivo error estándar de la media ($\pm$ ESM). La significación estadística de la diferencia entre el grupo experimental y el grupo control fue calculada usando la prueba «t» de Student.

RESULTADOS

Efecto de la administración de la DHEA durante la etapa de la implantación:

Al examinar macroscópicamente los cuernos uterinos, obtenidos de las ratas que fueron tratadas con la DHEA durante los días 5º al 8º, no se obser-

varon fetos a término sino ligeros abultamientos, los cuales al ser disecados y observados bajo la lupa estereoscópica, resultaron ser pequeñas masas friables de difícil manipulación (Figura 1). Como se puede observar en el Gráfico 1, el peso promedio de los úteros de las ratas tratadas con la DHEA fue de $0,9858 \pm 0,31$ gr, cifra significativamente menor que la obtenida en su correspondiente grupo control ($44,70 \pm 2,96$ gr) en el cual se obtuvieron fetos a término y viables. Para determinar si el defecto en el desarrollo del embrión pudiera ser ocasionado por algún efecto de la DHEA sobre el endometrio, se comparó histológicamente el endometrio de las ratas tratadas con la DHEA durante los 4 primeros días de la preñez con el de ratas preñadas no tratadas con la DHEA. La observación microscópica indica que no existen diferencias histológicas entre el endometrio de las ratas tratadas y sus respectivos controles (Figuras 2a y 2b).

Efecto de la administración de la DHEA durante la etapa de la embriogénesis:

Al estudiar los cuerpos uterinos de las ratas tratadas con la DHEA durante los días 8º al 14º de la preñez, tampoco se obtuvieron fetos a término; sólo se encontraron pequeños botones embrionarios, los cuales al ser observados bajo microscopio estereoscópico resultaron ser acúmulos de material semi-sólido, sanguinolento y difícil de manipular (Figura 3). Como se muestra en el Gráfico 1, el peso promedio de los úteros de las ratas tratadas fue de apenas $1,10 \pm 0,87$ gr, que comparado con el peso promedio obtenido para los úteros del grupo control ($46,73 \pm 3,66$ gr) fue significativamente menor ($p < 0,001$).

Efecto de la administración de la DHEA durante la etapa de crecimiento fetal:

Al examinar los cuernos uterinos de las ratas tratadas con la DHEA, durante los días 14º al 19º de la preñez, pudo detectarse un estado de gravidez evidente, con un promedio de $9,2 \pm 2,0$ fetos vivos por animal. Esta cantidad no difirió del número obtenido en el grupo de control, el cual presentó un promedio de $10,5 \pm 1,5$ fetos vivos por rata. Según puede apreciarse en el Gráfico 1, el peso promedio de los úteros de las ratas tratadas fue de $31,20 \pm 1,99$ gr, en tanto que el obtenido en el grupo de control fue de $45,34 \pm 2,01$ gr. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,005$). A fin de descartar que la disminución del peso uterino, obtenida en los animales tratados, pudiera deberse a una reducción global del peso corporal, se calculó el peso uterino relativo (peso uterino $\times 100$ / peso corporal). En el grupo ex-

perimental el peso uterino relativo fue de 11,35%, mientras que en el grupo control fue de 16,63%; esto indica que la reducción en el peso uterino no fue debida a una reducción del peso corporal pero sí a una disminución en el peso de los fetos, lo cual fue comprobado al pesar individualmente cada uno de ellos. El peso promedio de los fetos provenientes del grupo experimental fue de $1,84 \pm 0,069$ gr, en tanto que para el control fue de $2,11 \pm 0,032$ gr; la diferencia fue altamente significativa ($p < 0,0001$).

Al examen estereoscópico, los fetos obtenidos de las ratas tratadas con la DHEA, no mostraron anomalías anatómicas ni anomalías del desarrollo externo; las características morfológicas de la cabeza, el tórax, el abdomen, las extremidades anteriores y posteriores y la cola, fueron similares a aquéllas observadas en los fetos procedentes de las ratas controles (Figuras 4a y 4b).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, aunados a los ya reportados^(15,16), indican que un aumento en los niveles de la DHEA durante cualquier período de la preñez de la rata, tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del embrión. Un efecto similar de la DHEA también ha sido descrito en tejidos hematopoyéticos de roedores⁽¹⁸⁾, en los cuales se describe inhibición de la linfocitopoyesis pero no de la mielopoyesis; los mecanismos que definen esta especificidad se desconocen⁽¹⁹⁾.

Cuando la DHEA se administró durante los días correspondientes a la etapa durante la cual ocurre la implantación, el embrión no se desarrolló a pesar de la existencia de un endometrio histológicamente normal. La presencia de los botones embrionarios en los cuernos uterinos nos permite sugerir que los blastocistos se implantaron pero los niveles elevados de la DHEA inhibieron su desarrollo. Este efecto inhibitorio directo y aparentemente selectivo de la DHEA sobre las células embrionarias, también se presentó cuando ésta se administró durante la etapa posterior a la implantación (etapa de embriogénesis). En este período del desarrollo, los úteros de las ratas tratadas con la DHEA presentaron pequeños botones embrionarios atrofiados, que contrastaron con los fetos a término obtenidos de las ratas controles.

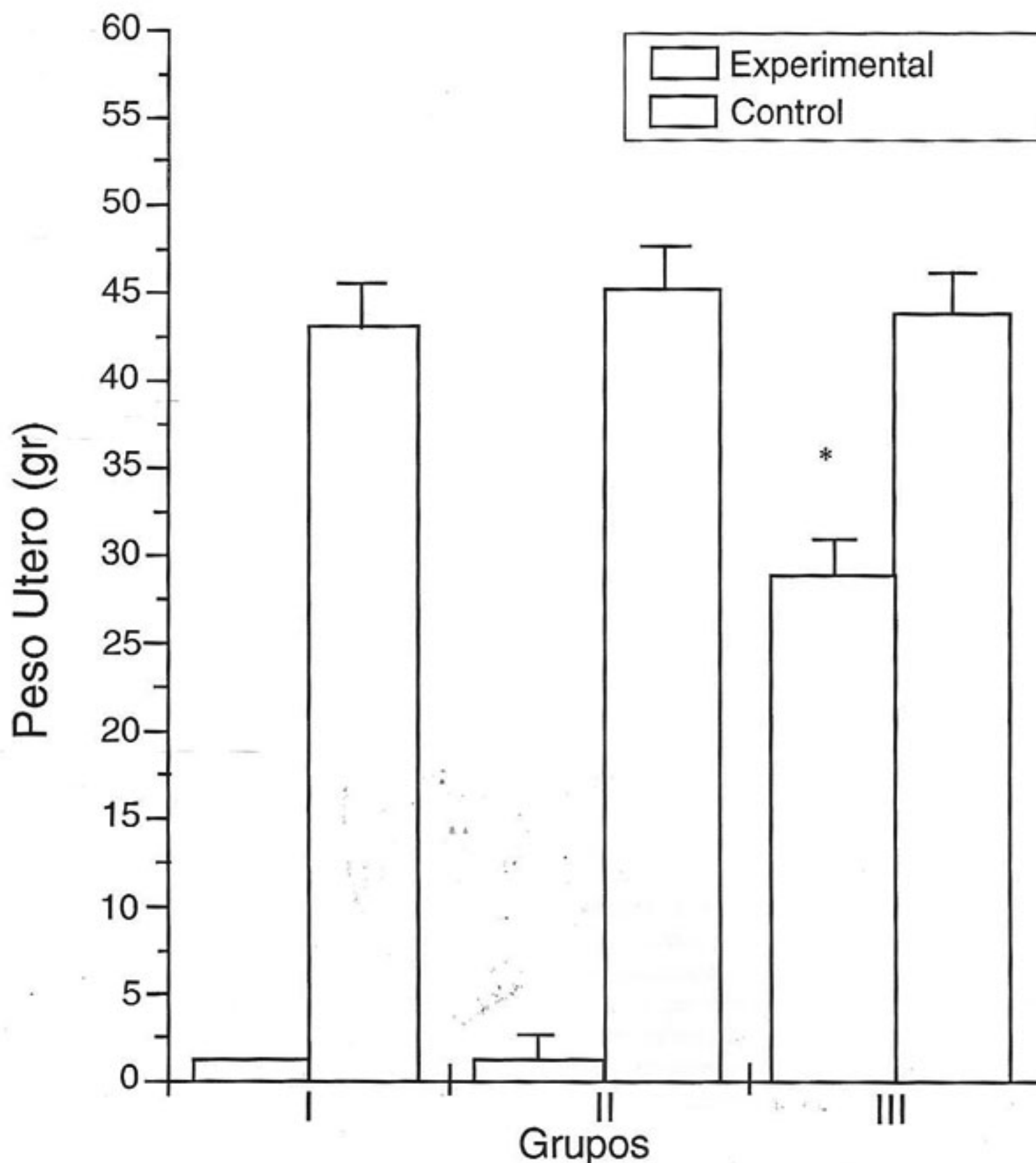
Cuando la DHEA se administró durante el último período de la preñez, también se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento fetal, puesto de manifiesto por una reducción significativa en su peso. El hecho de que las características morfológicas macroscópicas no se hayan alterado sugiere que, du-

rante este período, las células embrionarias estarían lo suficientemente diferenciadas y por lo tanto, parecerían ser menos susceptibles a la acción de la DHEA. La reducción en el peso de los fetos por el efecto de la administración de la DHEA, podría atribuírsele a una posible disminución en el número o en la velocidad de las divisiones celulares. Este

hecho probablemente sea debido a una falla en la duplicación del ADN, ya que experimentalmente se ha demostrado que la DHEA inhibe la glucosa o fosfato dehidrogenasa, lo cual limita la síntesis de las pentosas, indispensables para la duplicación de este ácido nucleico^(20,21), condición previa necesaria para que ocurra la mitosis.

Gráfico 1

Efecto de la administración de 20 mg/kg de DHEA sobre el desarrollo embrionario en ratas



Grupo I: Inyectadas los días 5º a 8º de preñez (implantación).
 Grupo II: Inyectadas los días 9º a 14º de preñez (embriogénesis).
 Grupo III: Inyectadas los días 15º a 19º de preñez (crecimiento fetal).
 * $p < 0.005$ vs Control.

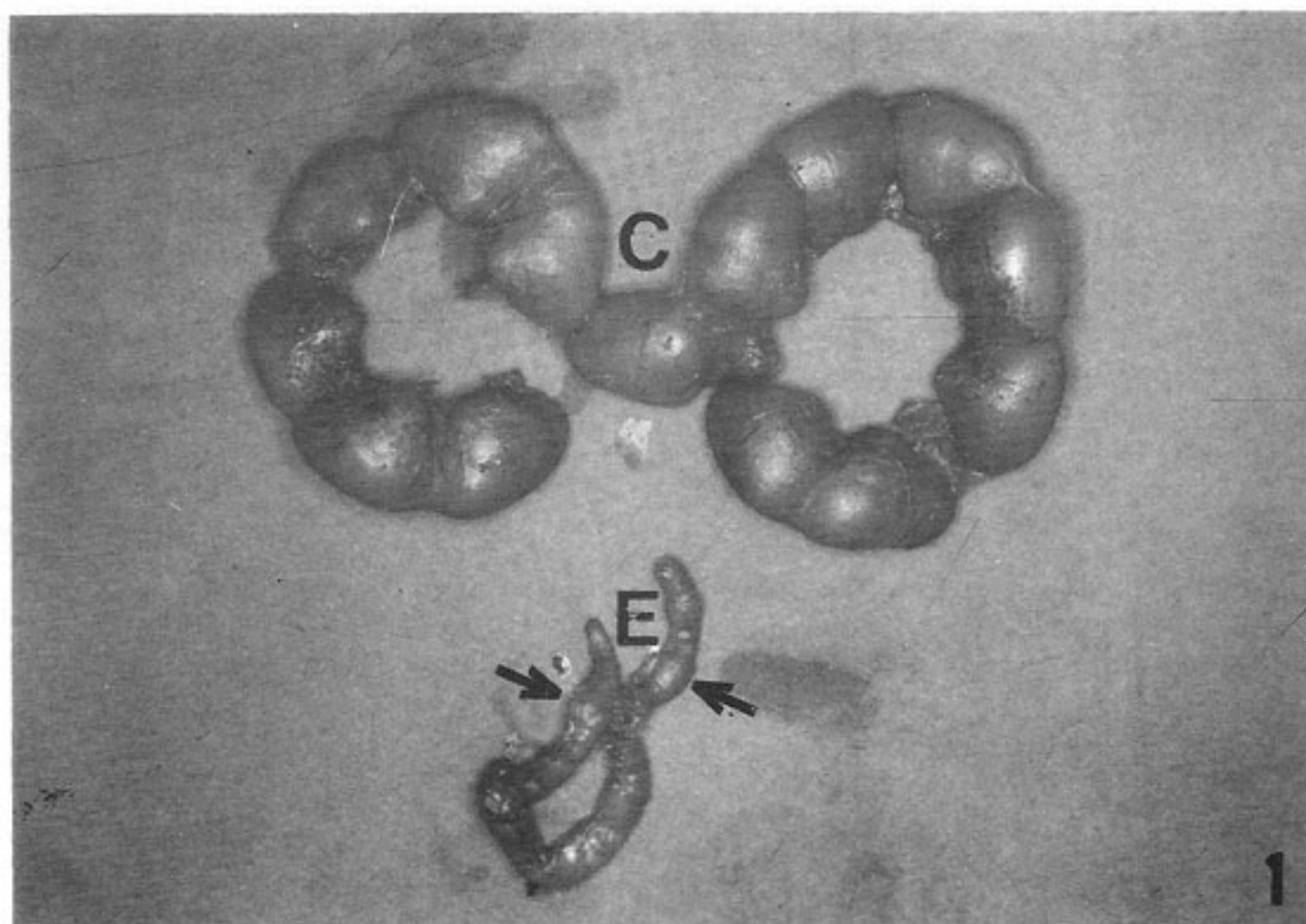
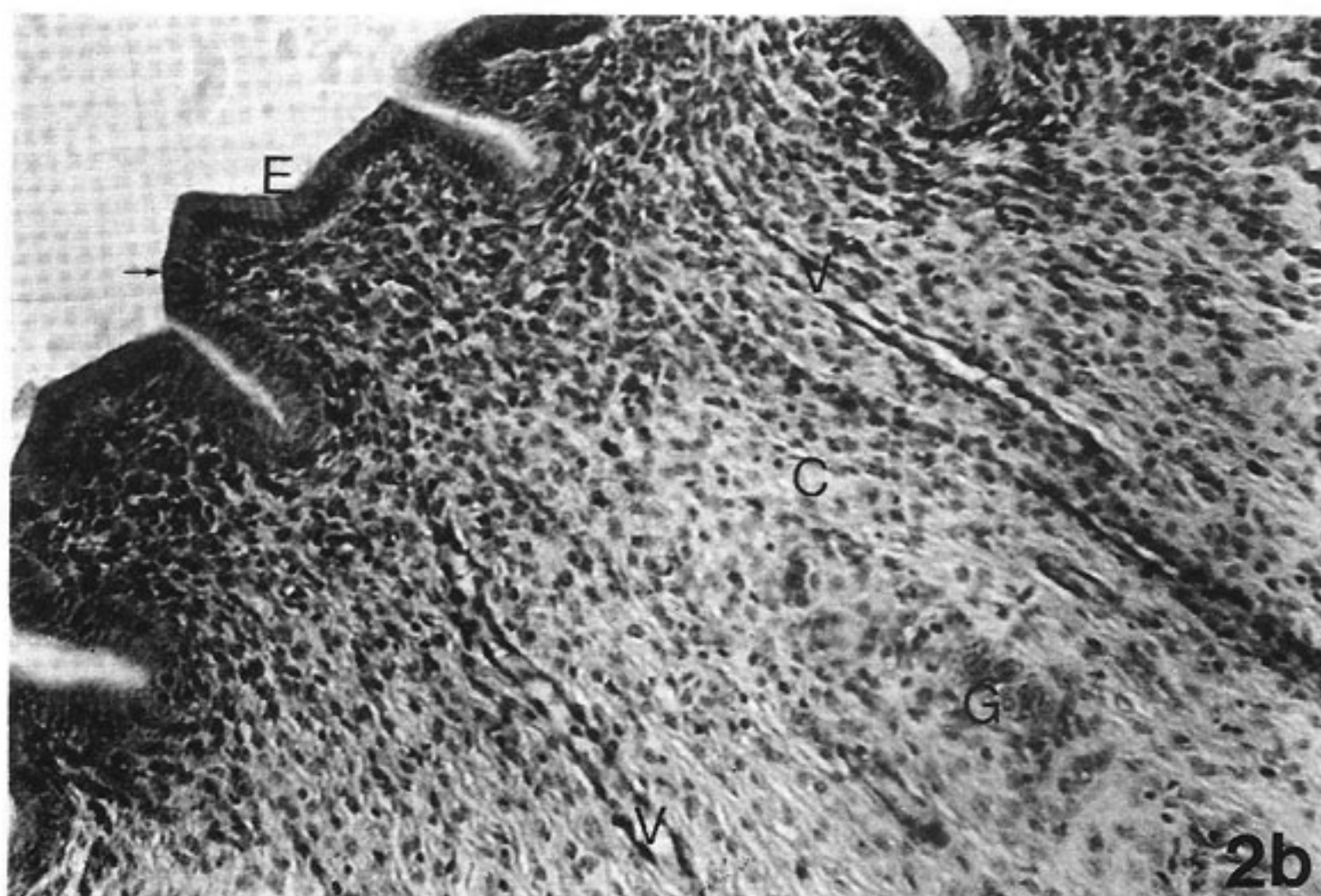
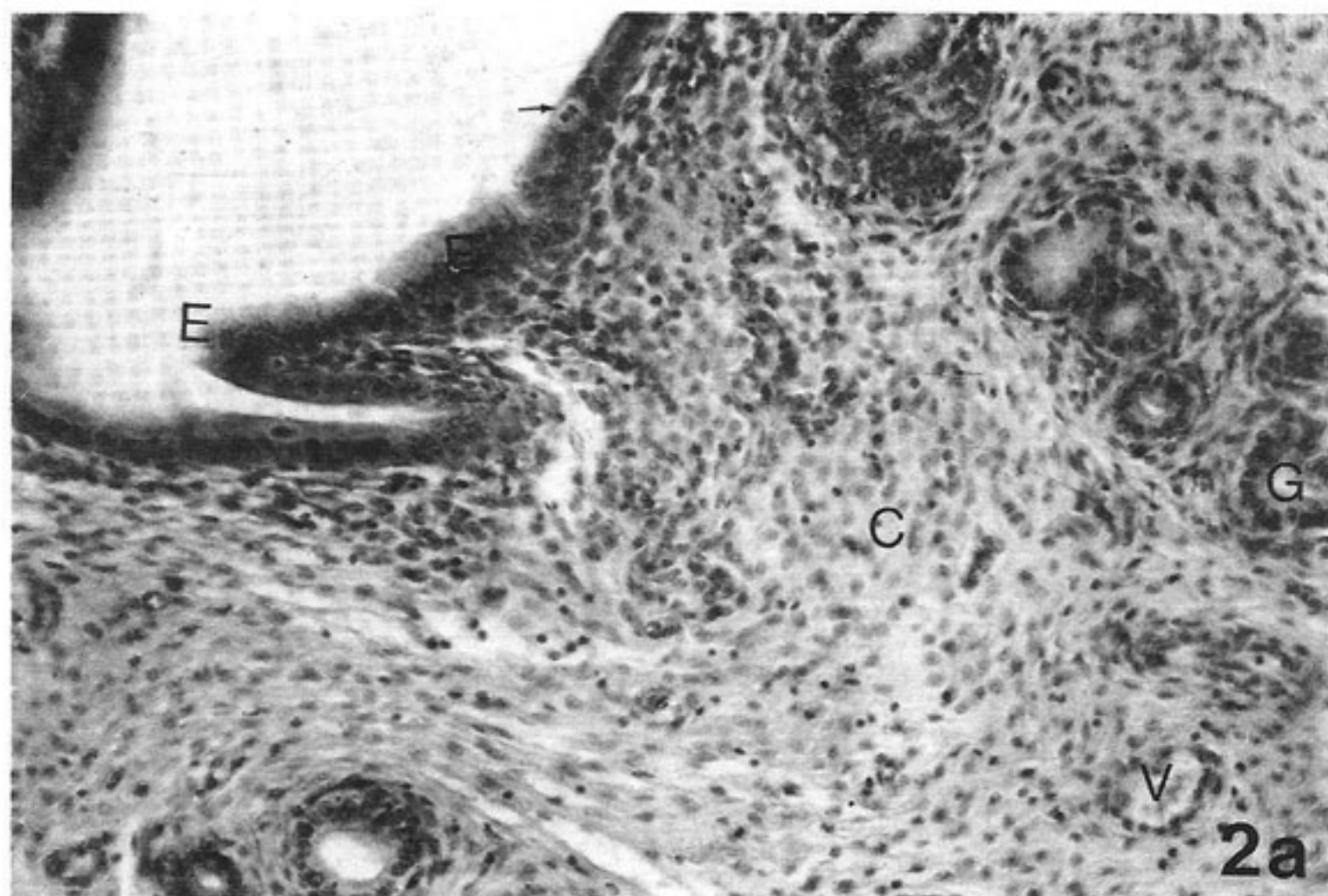


Figura 1

**Cuernos uterinos de ratas control (C) y experimental (E).
Nótense los pequeños abultamientos (flechas) en el útero de la rata ex-
perimental tratada con DHEA durante el período de implantación.
(Lupa estereoscópica x0.5)**



Figuras 2a y 2b

Cortes histológicos de la mucosa uterina (endometrio) de rata experimental (2a) y control (2b).

No se observaron diferencias microscópicas entre ambas. E: epitelio; flechas: figuras mitóticas; C: corion; V: vasos; G: glándulas.

Coloración: Hematoxilina eosina.

Microscopio óptico x250.

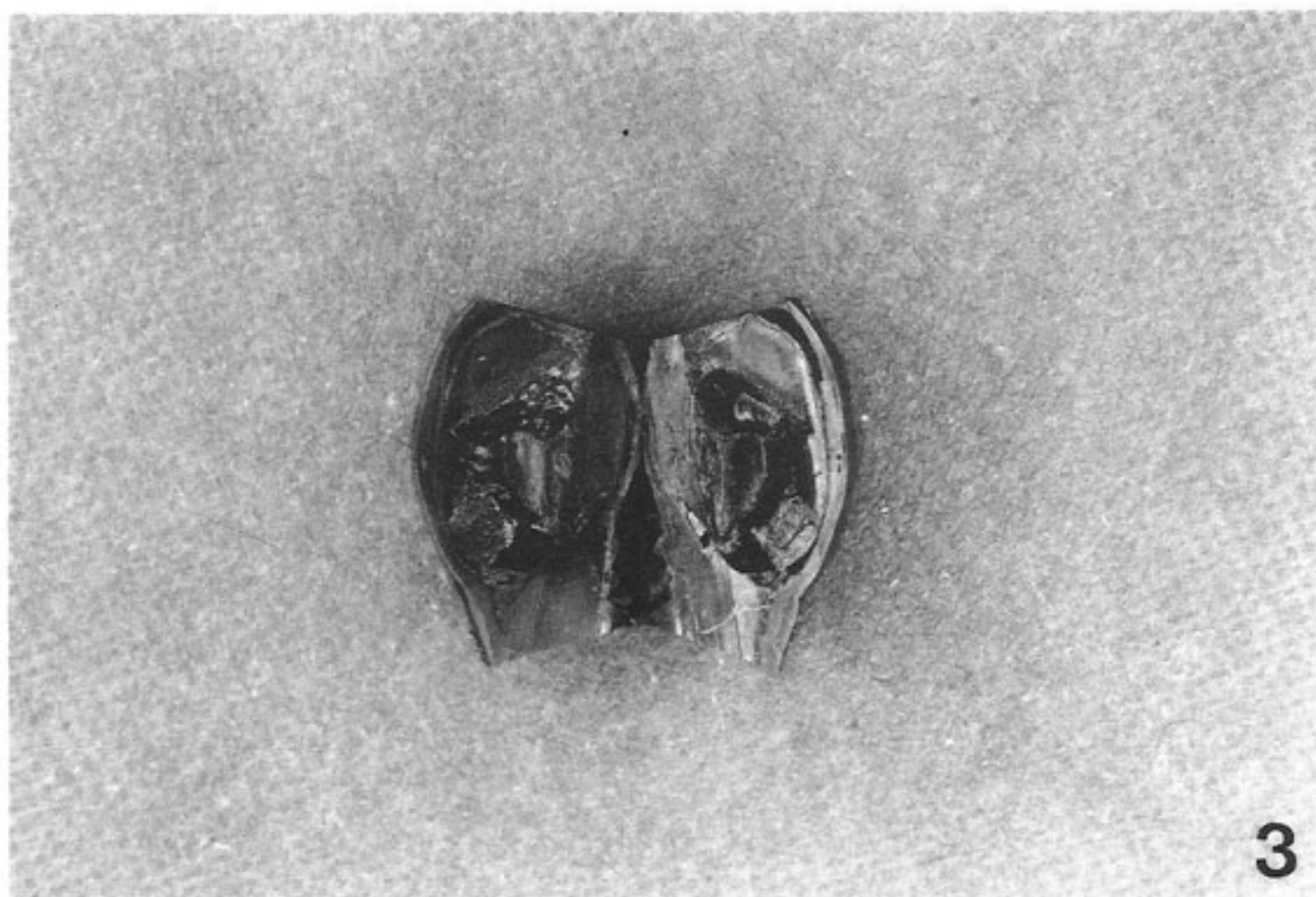
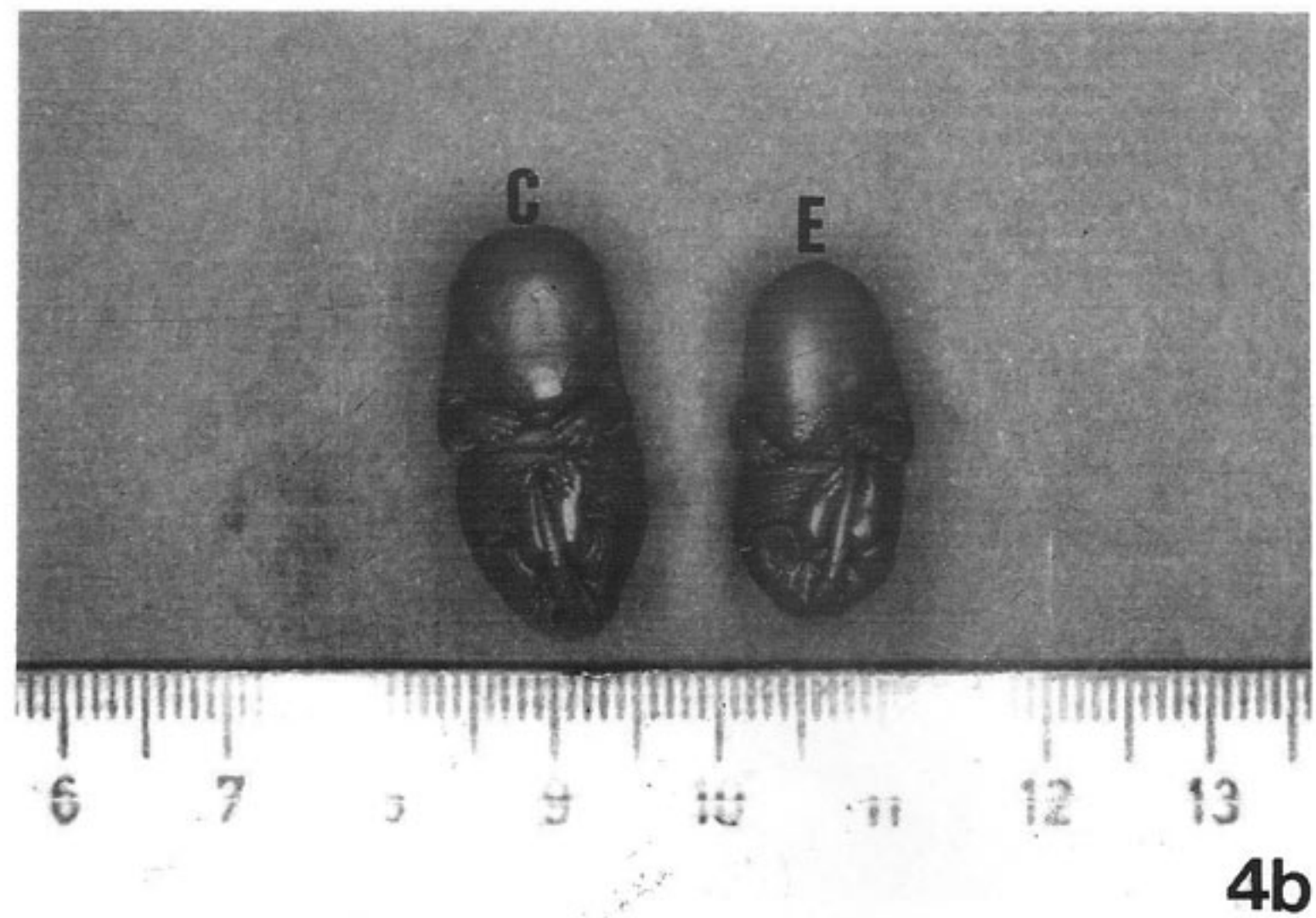
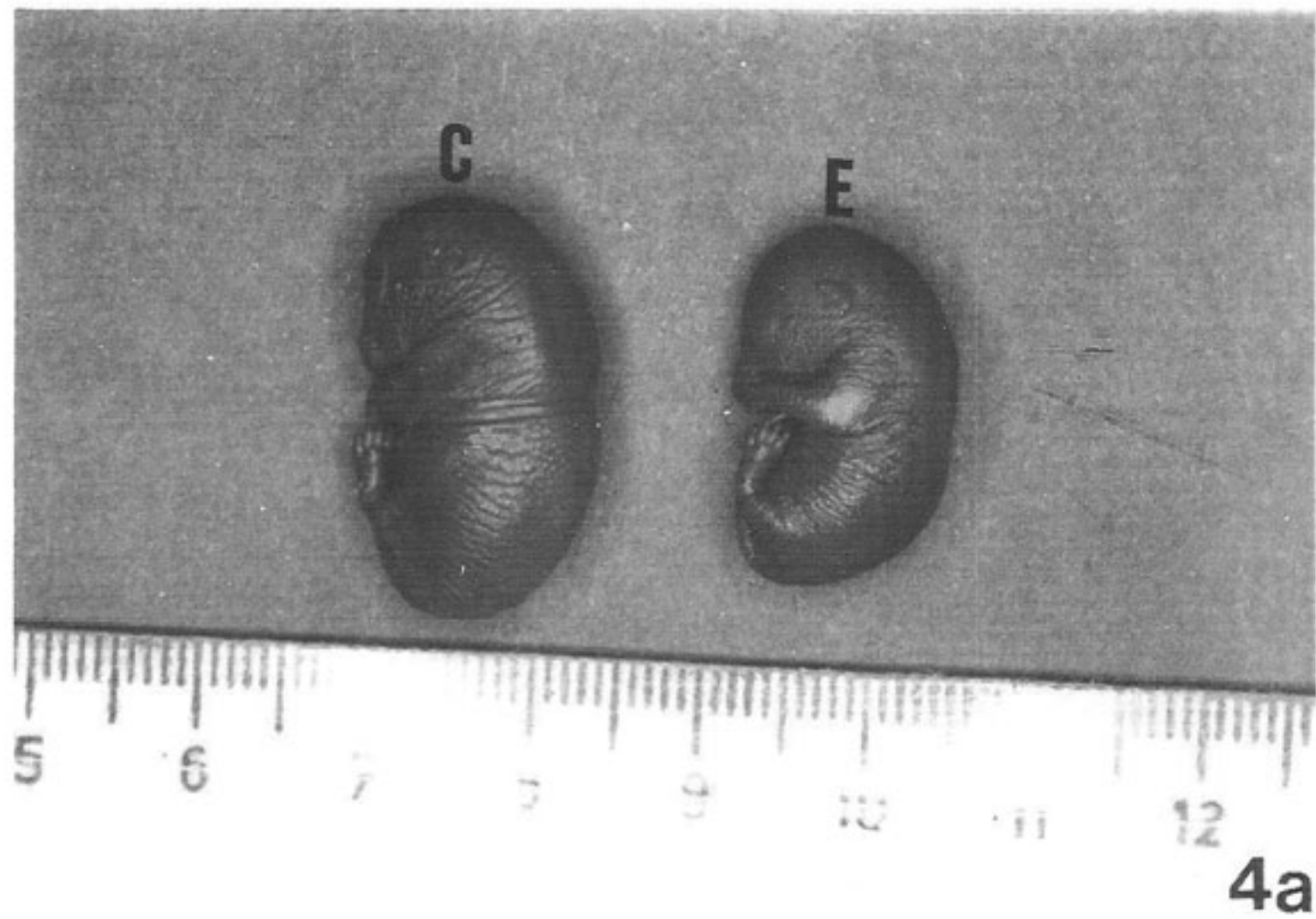


Figura 3

Botón embrionario obtenido de una rata experimental, tratada con DHEA durante el período de la embriogénesis y sacrificada el día 20º de la preñez. Microscopio óptico x20.



Figuras 4a y 4b

Vistas lateral (4a) y frontal (4b) de fetos controles (C) y experimentales (E) tratados con DHEA durante el período de crecimiento fetal.
Lupa estereoscópica x2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NESTLER, J.E.; CLORE, J.N. and BLACHARD, W.G. «Metabolism and actions of dehydroepiandrosterone in humans». *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 40, 599-605, 1991.
2. ORENTREICH, N; BRIND J.L.; RIZER, R.L. and VOGELMAN, J.H. «Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations through adulthood». *J. Endocrinol. Metab.* 59, 551-555, 1984.
3. BARRET-CONNOR, E; KHWA, T and YEN S.C. «A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality and cardiovascular disease». *N. Engl. J. Med.* 315, 1519-1524, 1986.
4. LACROIW, A.Z; YANG, K. and REED, D.M. «Dehydroepiandrosterone sulfate, incidence of myocardial infarction, and extent of atherosclerosis in men». *Circulation* 86, 1529-1535, 1992.
5. SCHWART, A.G; HARD, G.C; PASHKO, L.L; ABOU-GHARBIA, M and SWERN, D. «Dehydroepiandrosterone an anti-obesity and anti-carcinogenic agent». *Nutr. Cancer* 3, 46-53, 1981.
6. MOON, R.C. «Inhibition of rat mamary gland chemical carcinogenesis by dietary dehydroepiandrosterone or a fluorinated analogue of DHEA». *Cancer Res.* 51, 481-486, 1991.
7. HELZLSOUER, K.J; GORDON, G.B; ALBERG, A.J; BUSH, T.L. and COMSTOCK, G.W. «Relationship of prediagnostic serum levels of dehydroepiandrosterone to the risk of developing premenopausal breast cancer». *Cancer Res.* 52, 1-4, 1992.
8. BOCOZZI, G; ARAGNO, M. and BRIGNARDELLO, E. «Opposite effects of dehydroepiandrosterone on the growth of 7,12-dimethylbenz-anthracene-induced rat mamary carcinomas». *Anticancer Res.* 12, 1479-1483, 1992.
9. LOBO, R.A. «Androgen excess and infertile woman». *Obstet. Gynecol. Clin. Med. N.A.* 14, 955-978, 1978.
10. LOBO, R.A; WELLINGTON, P; MARCH C.M. and GRANGER, L. «Clomiphene and dexametasone in women unresponsive to clomiphene alone». *Obstet Gynecol* 60, 497-501, 1982.
11. KOWALSKI, W. and CHATERTON, R.T. «Effects of subchronic infusion of dehydroepiandrosterone sulfate on serum gonadotropin levels and ovarian function in the cynomolgus monkey». *Fertil. Steril.* 57, 912-920, 1992.
12. PARKER, C.R. and MAHESH, V.B. «Interrelations between excessive levels of circulating androgens in blood and ovulatory failure» *J. Reprod. Med.* 17, 75-90, 1976.
13. HANING, V; FLOOD, C.A; HACKETT, R.J; LOUGHLING, J.S; MAC-CLURE, N. and LONGOSCOPE, C. «Metabolic clearance rate of dehydroepiandrosterone in vivo». *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 1088-1095, 1991.
14. SIDEL'NIKOVA, V.M; ORLOVA, V.G; RAISOVA, A.T. and AGADZHANOVA, A.A. «Diagnosis of the causes and prevention of intrauterine fetal death in the second trimester of pregnancy in women with hyperandrogenism». *Akush. Ginek. Mosk.* 10, 16-19, 1991.
15. PROUGH, S.G; AKSEL, S; YEOMAN, R.R. and WIEBE, R.H. «Peritoneal fluid from patients with unexplained infertility inhibits growth of 2 cell mouse embryos». *Int. J. Fertil.* 36, 13-20, 1991.
16. BELLABARBA, A.G; MOLINA, C. Z; MONTARROSO, A.M; VELAZQUEZ, E; VALERI, P.M. and BELLABARBA C. «Dehidroepiandrosterona y preñez en la rata». *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.* 53, 203-206, 1993.
17. ROBERTS, R. «The mouse. Its reproduction and development». Ed. Burgers Publishing Company, 1967.
18. RISDON, G; COPE, J. and BENNETT, M. «Mechanisms of chemoprevention by dietary dehydroepiandrosterone. Inhibition of lymphopoiesis». *Am. J. Pathol.* 136, 759-769, 1990.
19. BLAUER, K.L; ROGERS, W.M. and BEMTHON, E.W. «Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of glucocorticoids on lymphocyte proliferation». *The Endocrine Society Proceeding of 71st Annual Meeting, Baltimore, Williams and Williams. Abstr.* 29, 1989.
20. MARKS, P.A. and BANKS, J. «Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate-dehydrogenase by steroids». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46, 447-452, 1960.
21. FEO, F; DAINO, L; SEDDAIU, M.A; SIMILE, M.M; PASCAL, R; McKEATING, J.A; DAVLIAKOS, G.P; SUDOL, K.S. and RAO, K.N. «Differential effects of dehydroepiandrosterone and deoxyribonucleosides on DNA synthesis and the novo cholesterologenesis in hepatocarcinogenesis in rats». *Carcinogenesis* 12, 1581-1586, 1991.

AGRADECIMIENTO

A la Sra. Aurora Prieto por su valiosa asistencia técnica.

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes por el soporte económico: Proyecto M 407-92.