

**LA EXPRESIÓN GÉNICA HIPOTALÁMICA DE LA ENZIMA CITOCROMO P450sc
EN RATAS HEMBRAS ES REGULADA POSITIVAMENTE POR ESTRÓGENO Y
NEGATIVAMENTE POR PROGESTERONA**

Giuliani F^{}, Yunes R^{*,**}, Cabrera, R.^{**,***}**

*Área de Farmacología, Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

**Instituto de Medicina y Biología Experimental (IMBECU-CCT Mendoza), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

***Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Mendoza.

Contacto: Dr. Ricardo Cabrera. RCABRERA@LAB.CRICYT.EDU.AR

RESUMEN

Los neuroesteroides son potentes moléculas modulatorias sintetizadas en sistema nervioso central y cuya actividad se restringe a dicho ámbito. En su síntesis participan enzimas del grupo del citocromo P450 (CP450) enzimas que no pertenecen a dicho grupo. En este trabajo se estudia la expresión génica de CP450scc a nivel de hipotálamo medio basal (HMB) de ratas hembra en diferentes condiciones hormonales, y se lo relaciona con su eventual regulación a través de esteroides gonadales, particularmente estrógenos y progesterona. Se proporciona evidencia de que existe una expresión diferencial en HMB, y que dicha expresión se encuentra positivamente modulada por estrógenos, y negativamente modulada por progesterona.

ABSTRACT

Neurosteroids are extremely potent modulatory molecules synthesized in the central nervous system (CNS), whose activity is limited to that ambit. Several types on enzymatic molecules participate of their synthesis, like enzymes related to the cytochrome P450 (CP450) and others not vinculated to this group. In this paper we study the gene expression of CP450scc in the mediobasal hypothalamus (MBH) of female rats under differents hormonal condition, and its eventual relationship with estrogen and progesterone regulation of that expression. Evidence is presented regarding differential gene expression of CP450scc in the MBH, as well as evidence related to its positive regulation by estrogen and negative regulation by progesterone.

Introducción

Las hormonas esteroideas han sido tradicionalmente vinculadas a su producción en gónadas y glándulas suprarrenales. Sin embargo, existen moléculas esteroideas sintetizadas en el sistema nervioso central –corteza, hipotálamo, pituitaria, entre otras regiones– denominadas neuroesteroides¹, y cuya acción se produce fundamentalmente en el sistema nervioso. El mecanismo de acción de estas moléculas involucra al menos dos tipos de respuestas: una lenta, mediada por receptores citosólicos y expresión génica, y otra rápida a través de la activación de receptores de membrana plasmática, vinculada a receptores ionotrópicos¹. Se ha demostrado que facilitan la acción del ácido γ -amino butírico (GABA), contribuyendo a la apertura del canal de cloro.^{2, 3} También se han relacionado con la modulación de receptores glutamatérgicos y sigma tipo 1, entre otros.⁴ Desde el punto de vista clínico, se los ha vinculado a diversos fenómenos: organogénesis a nivel neural, memoria, mielinización, ansiedad, trastornos convulsivos, estrés, depresión y neuroprotección.⁴ La síntesis de estos compuestos, derivados del colesterol, está directamente vinculada a la actividad de diversas enzimas. De modo genérico, podríamos decir que estas enzimas pertenecen a una de dos clases: las relacionadas con el citocromo P450 (CP450), y las no relacionadas con dicha oxidasa de función mixta.⁴ En tanto se conoce con bastante aproximación las vías sintéticas de los neuroesteroides y las enzimas intervinientes, poco se conoce acerca de la expresión génica de CP450, particularmente CP450scc, en sistema nervioso central.

En este trabajo, precisamente, se reporta los resultados de estudiar la expresión génica de CP450scc en hipotálamo medio basal de ratas hembra. Adicionalmente, este estudio intenta llenar el vacío respecto a la participación potencial de esta enzima durante el ciclo estral, y su eventual regulación por esteroides gonadales, particularmente estrógenos y progesterona.

Material y métodos

Animales:

Se emplearon ratas hembra de nuestro bioterio, de la cepa Sprague-Dawley (adultos de 90-120 días de edad, de 250-300 gs. de peso), agrupados a razón de 4-5 animales por caja. Posterior a la ovariectomía se los alojó en cajas individuales hasta su completa recuperación. Se mantuvieron a temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) y ciclo luz-oscuridad (12h/12h) constantes, con acceso *ad libitum* a agua y alimento balanceado para roedores (GEPSA Feed, Grupo Pilar, Argentina). Cada animal fue utilizado por una única vez, siendo manipulados de acuerdo a los estándares de los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health, USA) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Reactivos:

Progesterona (4-Pregnene-3,20 dione), estrógeno (β -Estradiol 3-benzoato), (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). Enzima retrotranscriptasa (M-MLV RT) y el buffer RT (Promega, Madison, WI, USA), "random primers" (Invitrogen, Carlsbaal, CA, USA). Taq polimerasa, buffer green, primers ciclofilina y P450scc (Biodynamics, Austin, TX, USA).

Procedimientos quirúrgicos y tratamientos de los animales

Ovariectomía:

La ovariectomía (OVX) fue realizada bajo anestesia con hidrato de cloral disuelto en solución salina (NaCl 0.9%) (400 mg/kg i.p.). Se efectuó una incisión dorso lateral profunda, a un lado de la columna vertebral, por debajo del reborde costal. Una vez expuestos los ovarios los mismos fueron retirados de la cavidad y extirpados. Posteriormente, los cuernos uterinos fueron reubicados en la cavidad abdominal para

finalmente realizar una sutura por planos de músculo y piel. Los animales, debidamente tratados con antibióticos, se recuperaron por 10 días en aislamiento.

Impregnación hormonal de los animales ovariectomizados:

Para la impregnación hormonal, 48 hs. previas al experimento se les administró subcutáneamente (s.c.) una dosis de 25 μg /animal de benzoato de estradiol disuelto en 0.2 mL de aceite de maíz. Previo al experimento, cinco horas antes, se les administró una dosis s.c. de progesterona disuelta en 0.2 ml de aceite de maíz a razón de 1 mg/animal. La impregnación se realizó en todos los casos a la misma hora (10:00 a.m.). Las dosis empleadas para la impregnación, se sabe, son capaces de inducir el pico preovulatorio de LH⁶, provocando una condición hormonal endógena semejante al proestro del ciclo estrual de la rata⁷. A este grupo lo denominamos OVXep. Otro grupo de animales OVX fueron tratados solamente con 25 μg /animal de benzoato de estradiol disueltos en 0.2 mL de aceite de maíz (grupo OVXe). Por su parte, también se emplearon animales enteros (no ovariectomizados) y cuyas etapas del ciclo fueron determinadas de acuerdo a procedimientos estándar de examen del extendido vaginal⁸. Las hormonas esteroideas empleadas fueron primero disueltas en aceite de maíz, y luego adecuadamente ajustadas a su concentración final de trabajo. En el caso de los animales controles, sólo se utilizó aceite de maíz. La administración de las hormonas esteroideas sexuales se realizó por vía s.c., no excediendo en ningún caso 100 μL como volumen final.

Disección de hipotálamo medio basal e hipotálamo anterior:

Para obtener muestras de hipotálamo medio basal y anterior, las ratas fueron decapitadas, sus cerebros removidos y sus hipotálamos extraídos desde la cara basal del cerebro, utilizando para ello una tijera oftalmológica con la que se realizaron cortes de un milímetro en sus lados: frontal (inmediatamente por detrás de la entrada

de las cintillas ópticas), posterior (por delante de los cuerpos mamilares) y laterales, de similar profundidad al referido más arriba. Posteriormente se tomó la porción cúbica correspondiente al hipotálamo medio basal, incluyendo el núcleo arcuato y la eminencia media.

Expresión de P450scc:

Extracción de ARN

Se obtuvieron hipotálamos de ratas en las diferentes condiciones hormonales descritas anteriormente. Los hipotálamos, una vez extraídos, fueron conservados a -30°C . Una vez descongelados, el ARN total de los hipotálamos fue extraído usando el método de TRIZOL-Reagent. Una fracción de estas muestras fue tomada para medir la concentración de ARN total por espectrofotometría. Las muestras de ARN total extraídas fueron guardadas a -80°C hasta el momento de realizar la retrotranscripción.

Retrotranscripción

Dos μg de RNA total fueron retro-transcriptos utilizando retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV RT) en presencia de primers con secuencias al azar hexaméricas (random primers). Resumidamente, se llevó a cabo una pre-RT utilizando random primers, incubando 10 minutos a temperatura ambiente y luego 45 minutos a 42°C . Al total del producto de la pre-RT se le agregó buffer RT, M-MLV-RT, mezcla de nucleótidos (dNTPs) y se llevó a un volumen final de $50\ \mu\text{L}$ con agua tratada con DEPC. Se incubó 60 minutos más a 42°C , 15 minutos a 70°C y por último se inactivó la retro transcriptasa mediante la incubación de los tubos en baño de hielo. El producto de la RT (cDNA) fue conservado hasta realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron 10µl del producto de la reacción de RT como molde para la amplificación utilizando Taq DNA polimerasa y primers específicos. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf Thermal Cycler (USA), bajo los siguientes parámetros de ciclado: activación inicial de la Taq DNA Polimerasa, 94°C por 5 min, desnaturalización a 93°C por 1 min, anillado a 60°C. Se realizaron un total de 30 ciclos seguidos de una extensión final de 15 min a 72°C cada ciclo.

Los primers específicos sentido (sense) y antisentido (antisense) para P450scc y para el gen constitutivo de ciclofilina de rata, se muestran en la siguiente tabla.

Primer	Orientación	Secuencia	pb
P450scc	S	caacatcacagagatgctgagcagg	558
	AS	ctcaggcatcaggatgaggttgaa	
Ciclofilina	S	caagactgagtggctggatgg	293
	AS	acttgaaggggaatgaggaaaata	

S = sentido; AS = antisentido

Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1% impregnado con bromuro de etidio, y luego fueron visualizados bajo luz UV. La intensidad de las bandas fue analizada densitométricamente utilizando el programa image-analysis. Los resultados fueron expresados como unidades densitométricas relativas, normalizando los valores de P450scc en relación con los valores densitométricos obtenidos a partir de ciclofilina de rata.

Análisis estadístico:

Los datos se expresan como medias (+/- SEM) de 8-10 ratas por grupo, y se analizaron mediante un test de análisis de varianza de una vía (ANOVA1), seguido por el test de Newmann-Keuls para comparaciones entre grupos. Valores de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativos.

Resultados

En la Figura 1 se presenta en la parte superior las bandas representativas de resolución en gel del producto de la RT-PCR para los grupos OVXep, OVXe y OVX, en tanto en la parte inferior se muestra el gráfico resultante de comparar los valores densitométricos de cit P450scc relativos a ciclofilina de rata (promedio del total de bandas n) en las distintas condiciones hormonales ensayadas. Resulta claro que los niveles de expresión del gen de la citocromo P450scc se encuentran significativamente aumentados en el grupo OVX con respecto al grupo OVXep (0.26 ± 0.03 vs. 0.43 ± 0.04 ; $P < 0.05$). Por su parte, también es significativamente diferente la expresión génica entre el grupo OVXe con respecto a OVXep (0.26 ± 0.03 vs. 0.57 ± 0.08 ; $P < 0.01$).

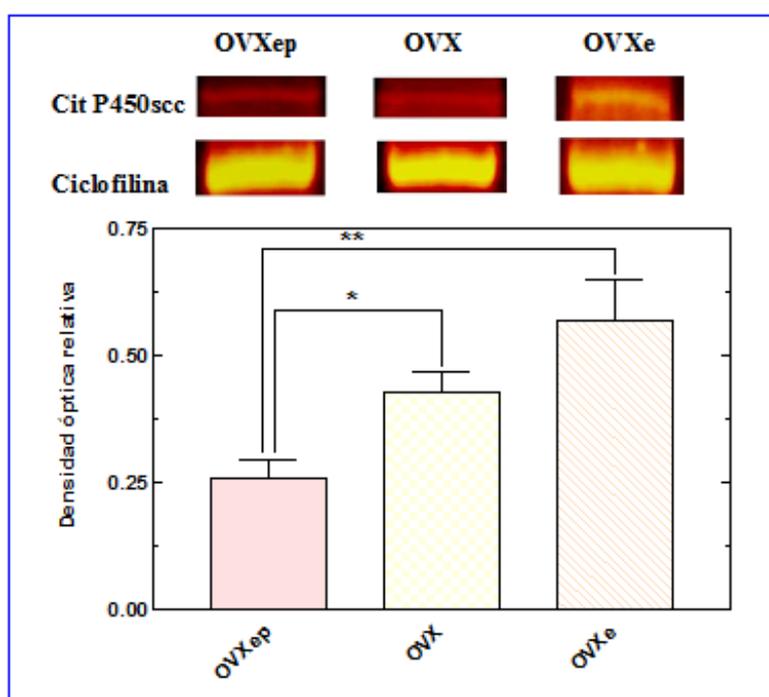


Fig. 1 En el panel superior se muestran bandas representativas del gel de resolución del producto de RT-PCR de Citocromo P450scc y Ciclofilina. En el panel inferior se muestra el gráfico correspondiente. Como se puede ver en el grupo OVX la expresión de cit P450scc es mayor que en OVXep y en el grupo OVXe esta expresión está aún más aumentada. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Por su parte, y ya en relación al ciclo estral, en la Figura 2 se muestran, en la parte superior, las bandas representativas de resolución en gel de los productos de RT-PCR correspondientes a hipotálamo medio basal de ratas en diferentes estadios del ciclo estral, en el panel inferior los valores analizados densitométricamente. El análisis estadístico de los valores presentados nos permite afirmar que no existen diferencias significativas en la expresión de cit P450scc en relación a los diferentes estadios del ciclo estral (0.4 ± 0.03 ; 0.39 ± 0.04 ; 0.39 ± 0.13 ; 0.31 ± 0.004 para los grupos Proestro, Estro, Diestro 1 y Diestro 2 respectivamente).

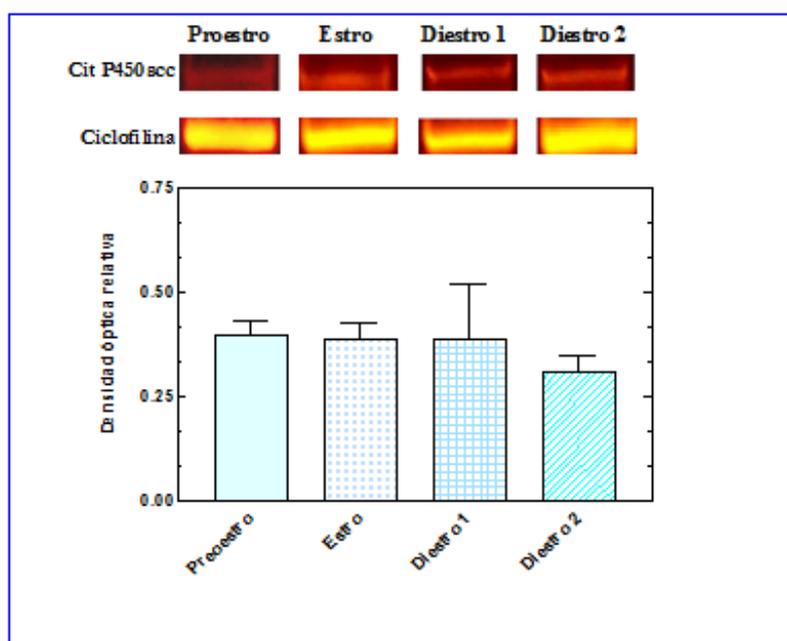


Fig. 2: La expresión génica de cit P450scc no muestra diferencias significativas entre los diferentes estadios del ciclo estral. En el panel superior de la figura vemos las bandas representativas del producto de RT-PCR y en el panel inferior el gráfico correspondiente luego del análisis estadístico.

Discusión

Como mencionamos previamente, los neuroesteroides (NE) son sintetizados activamente en SNC, cumpliendo sus múltiples funciones cercanos al sitio en el que fueron sintetizados. En dicha síntesis participan diversas enzimas, relacionadas o no con el citocromo P450 (CP450). Diversas evidencias indican que la expresión

diferencial y regionalizada de enzimas tiene que ver con los NE sintetizados en un sitio o momento en particular. Sin embargo, no resulta claro aún –debidos a los bajos niveles de ARNm encontrados– cuáles de estas enzimas resultan constitutivas o reguladas⁹. En este trabajo, y en relación a las oxidasas de función mixta, se estudió la expresión génica de CP450scc –responsable del paso de colesterol a pregnenolona⁴–, su relación con las fases del ciclo estral en la rata, y la eventual dependencia de su síntesis por esteroides gonadales.

Como quedó en evidencia, existe una clara expresión génica de CP450 durante todo el ciclo estral de la rata, sin evidenciarse modificaciones cuantitativas a lo largo de dicho período (Fig. 2). Esto indica, tratándose de animales intactos, que pareciese no existir una dependencia crítica de la producción de esteroides gonadales para la expresión de CP450scc. No obstante ello, en animales ovariectomizados y tratados con esteroides de reemplazo, se pudo observar que el gen de CP450scc se expresaba diferencialmente según el tratamiento: así, en animales sin tratar la expresión representa un punto intermedio entre animales tratados con estrógeno solamente, en los que se observa un significativo aumento de la expresión, y los tratados con estrógeno y progesterona, en que se observa una disminución significativa de la expresión (Fig. 1). Puesto así, parece existir una regulación positiva –estimuladora– de estrógeno sobre la expresión, en tanto una regulación negativa –inhibitoria– por parte de progesterona cuando se la administra en conjunción con estrógeno. Todo esto es indicativo de un efecto genómico de estos esteroides, en lugar del efecto rápido ejercido a nivel de receptores de membrana. Esta rica regulación contrasta vivamente con la controlada expresión a lo largo del ciclo estral, en el cual los niveles de expresión del gen de CP450scc aparecen constantes.

Teniendo en cuenta el corto ciclo estral de la rata, es posible que lo visualizado con terapia hormonal de reemplazo no sea un reflejo exacto de lo que ocurre en animales

intactos, en los cuales los ascensos-descensos hormonales esteroideos son rápidos y transitorios, aunque de gran impacto. En tanto estrógeno no forma parte de la vía metabólica de los NE, progesterona es uno de sus elementos más conspicuos¹⁰. En dicho sentido es posible que el rol estimulador inhibitorio de progesterona refleje un mecanismo de retroacción negativo que no forma parte del rol funcional de estrógeno en la misma situación. Si bien no es posible en este momento establecer fuera de toda duda la relación entre regulaciones estimulatorias e inhibitorias, no obstante es claro que tales regulaciones existen y deben potencialmente resultar de significación biológica y biomédica. Estudios en curso contribuirán a esclarecer el tema aún más.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por las siguientes instituciones: 1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5942); 2) Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado (SECTyP, Proyecto n° 06/J288) de la Universidad Nacional de Cuyo; y 3) Universidad de Mendoza (Resolución N° 113/07). Expresamos nuestro agradecimiento al Sr. Jorge González por su aporte técnico y logístico en buena parte del trabajo realizado, como así también la asistencia de varios colegas en la lectura crítica del manuscrito.

Referencias bibliográficas

1. Robel P, Baulieu B. Neurosteroids Biosynthesis and function. Trends Endocrinol Metab. 1994; 5(1):1-8.
2. Majewska, M. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. Prog Neurobiol. 1992; 38(4):379-95.
3. Paul S, Purdy R. Neuroactive neurosteroids. FASEB J. 1992; 6(6):2311-22.
4. Mellon S, Griffin L. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. Trends Endocrinol Metab. 2002 Jan-Feb;13(1):35-43.
5. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Second Edition. Academic Press, Paris, 1986.
6. Schiaffini O, Patterson AM, Martin B. Sexual cycle and metabolism of the hipophysiotropic and septal areas, caudal nucleus, adenohypophysis and cerebral cortex. Reproduction 1974; 1:361-366.
7. Caligaris L, Astrada JJ, Taleisnik S. Influence of age on the release of luteinizing hormone induced by oestrogen and progesterone in immature rats. J Endocrinol 1972; 55:97-103.
8. Marcondes F, Bianchi F, Tanno A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol 2002; 62(4A):609-614.
9. Warner M, Wyss A, Yoshida S, Gustafsson J. Cytochrome P450 enzymes in brain. En: de Kloet ER, Sutanto W. Neurobiology of Steroids. Academic Press. Inc. San Diego, California, 1994; 51-66.
10. Zwain I, Yen S. Neurosteroidogenesis in Astrocytes, Oligodendrocytes, and Neurons of Cerebral Cortex of Rat Brain. Endocrinology 1999; 140:3843-3852.