



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

EFFECTOS A LARGO PLAZO DEL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO SOBRE DESARROLLO DE ANOMALÍAS UTERINAS

López Angie

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

Directora: Dra. Verónica L. Bosquiazzo

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: Síndrome de ovario poliquístico, anomalías uterinas, remodelación de colágeno.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es la patología más común de exceso de andrógenos que afecta de un 8% a un 18% de las mujeres en edad reproductiva (aprox. 12 a 45 años) (Hoeger y col. 2021). Clínicamente es definido por quistes en los ovarios y oligo/anovulación crónica con hiperandrogenismo. El SOP es un factor de riesgo para el desarrollo de patologías uterinas como hiperplasia y cáncer endometrial (CE) (Hardiman y col. 2010). La prevalencia de CE es tres veces mayor entre las mujeres con SOP que entre las mujeres sin SOP (Dumesic & Lobo, 2013). Estudios han demostrado que la histoarquitectura uterina se modifica en animales con SOP. Se observó un aumento en el peso uterino, la altura del epitelio luminal, la densidad de glándulas y el espesor de las paredes uterinas en asociación con una disminución de la densidad de células estromales (Bracho y col. 2019). Si bien hay un creciente conocimiento de los mecanismos carcinogénicos, los potenciales mecanismos involucrados específicamente en mujeres con SOP son pobremente conocidos.

OBJETIVOS

Estudiar los efectos a largo plazo del SOP en el desarrollo de anomalías uterinas utilizando un modelo animal y evaluando en el útero: 1) incidencia y multiplicidad de anomalías, 2) remodelación del colágeno y 3) perfil inmune.

METODOLOGÍA

Animales. El protocolo experimental utilizado fue aprobado por el comité de ética y seguridad de la investigación de la FBCB, UNL. 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



Diseño experimental. Se utilizó un modelo de rata expuestas experimentalmente a dehidroepiandrosterona (DHEA) para inducir el SOP. Este modelo es ampliamente utilizado para estudiar el desarrollo y efectos del SOP en roedores (Bracho y col. 2019). Para ello se utilizaron 15 ratas tratadas por vía subcutánea con DHEA, 60mg/kg de peso corporal/día (grupo SOP) y 13 ratas con aceite de sésamo (grupo CONTROL) durante 20 días consecutivos iniciando el tratamiento a los 21 días de edad. Finalizado el tratamiento, se dejaron crecer los animales hasta la adultez (18-24 meses) momento en el que fueron sacrificados en la etapa de diestro determinado por citología vaginal. Al momento del sacrificio se diseccionaron los cuernos uterinos que se procesaron histológicamente. Las muestras incluidas en parafina fueron seccionadas longitudinalmente en cortes de 5 μm de espesor para su posterior estudio.

Evaluación de anomalías uterinas. Las muestras se colorearon con Hematoxilina – Eosina (H-E) o Ácido periódico de Schiff (PAS). Se analizó la histología y se evaluó la presencia de anomalías uterinas. La incidencia de cada alteración se cuantificó determinando el porcentaje de animales que presentaban al menos una alteración histológica. La multiplicidad de las anomalías se cuantificó determinando el porcentaje de cada anomalía por animal. Para la identificación de las glándulas con metaplasia escamosa se utilizó la inmunomarcación de citoqueratina 14 (CK14). La inmunohistoquímica se realizó utilizando el anticuerpo policlonal anti-CK14 (The Binding Site, Birmingham - UK) y el sistema de revelado estreptavidina-peroxidasa visualizándose mediante detección cromogénica con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno como sustrato enzimático.

Evaluación de la remodelación del colágeno. Los cortes fueron teñidos con picrosirius-hematoxilina. Se tomaron 20 imágenes en microscopio con polarización del estroma subepitelial y del miometrio circular por muestra. Las imágenes fueron analizadas con el programa Image Pro Plus 3.0.1. Determinando la intensidad y el área de birrefringencia se calculó la Densidad Óptica Integrada (DOI). La mayor birrefringencia de colágeno indica menor remodelación de las fibras (Rodríguez y col., 2003).

Evaluación del perfil inmune del útero. Los cortes fueron coloreados con la tinción de azul de toluidina para la identificación de mastocitos y sirius rojo para identificar eosinófilos. Se cuantificó la infiltración de eosinófilos en el estroma subepitelial y miometrio mediante el análisis de 50 imágenes de cada zona utilizando Image Pro Plus 3.0.1. Se determinó el número de eosinófilos por μm^2 de tejido. En el cálculo del área de tejido se descartó el área ocupada por glándulas y/o vasos sanguíneos.

RESULTADOS

Evaluación de anomalías uterinas. En la figura 1 se pueden observar las lesiones que se identificaron en el epitelio luminal y en glándulas endometriales, tanto en animales CONTROL como con SOP. La tabla 1 muestra la incidencia de cada una de estas lesiones.

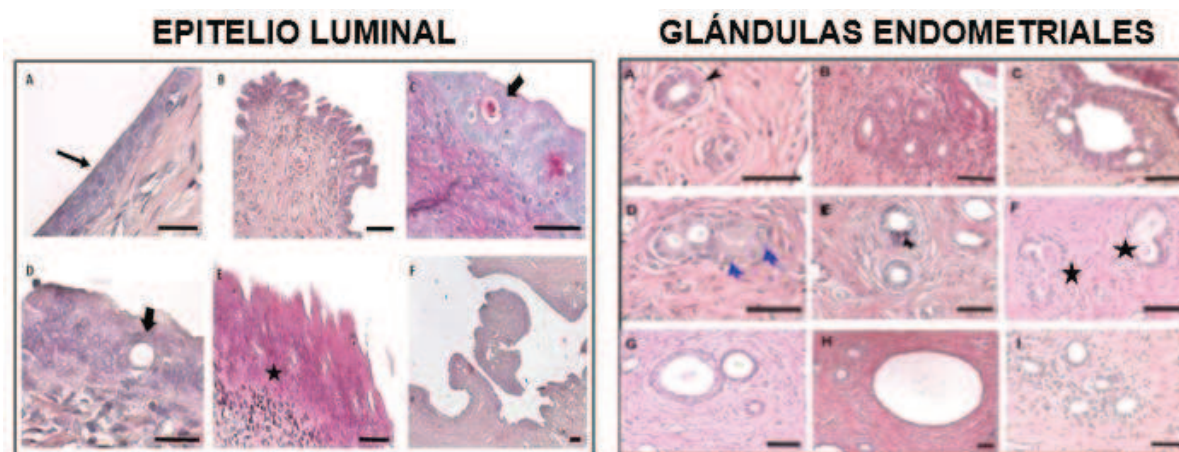


Figura 1. Anormalidades en epitelio luminal. **A)** Epitelio normal en etapa diestro (flecha). **B)** Epitelio papilar. **C)** Lúmen intraepitelial con marcación PAS positiva (flecha). **D)** Glándula intraepitelial (flecha). **E)** Hiperplasia (asterisco). **F)** Pólipo. A, B, D-F tinción con Hematoxilina y Eosina; C tinción con Acido Periódico de Shift. Barra de escala: 50 μ m. **Anormalidades en glándulas endometriales.** **A)** Glándula normal (flecha). **B)** Conglomerados de glándulas. **C)** Glándulas con glándulas hijas. **D-F)** Glándulas con atipias celulares: núcleos hipocrómicos (D, flechas azules), núcleo hiperocrómico (E, flecha negra), disposición anómala de las células (F, asteriscos). **G)** Glándula con metaplasia. **H)** Glándulas quísticas. **I)** Glándulas con vacuolas intracitoplasmática. A, B, D-F tinción con Hematoxilina y Eosina; C tinción con Acido Periódico de Shift. Barra de escala: 50 μ m.

Tabla 1: Incidencia de alteraciones en animales CONTROL y con SOP.

ALTERACIONES EN EL EPITELIO LUMINAL		
Anormalidades	CONTROL	SOP
Epitelio papilar	1/13 (7,7 %)	2/15(13,3 %)
Pólipos	5/13 (38,5 %)	4/15 (26,6 %)
Lúmen intraepitelial	3/13(23%)	11/15(73,3 %) *
Glándulas intraepiteliales	2/13 (15,4 %)	10/15 (66,7 %) *
Hiperplasia	1/13 (7,7 %)	8/15 (53,3 %) *
ALTERACIONES EN LAS GLÁNDULAS ENDOMETRIALES		
Metaplasia escamosa	13/13 (100 %)	15/15 (100 %)
Glándulas con glándulas hijas	10/13 (76,9 %)	13/15 (86,7 %)
Conglomerados	13 /13 (100 %)	15/15 (100 %)
Glándulas quísticas	12/13 (92,3 %)	13/15 (86,7 %)
Glándulas con atipias y/o otras alteraciones	11/13 (91, 7 %)	13/15 (86,7 %)
Glándulas con vacuolas intracitoplasmáticas	12/13 (92,3 %)	6/15 (40 %) *

Incidencia de alteraciones en animales CONTROL y con SOP. Los resultados son expresados como número de ratas con una anomalía / número de ratas por grupo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de animales que presentó cada lesión epitelial. * indica diferencia significativa respecto al grupo CONTROL (*, p<0,05).

Debido a que el 100% de los animales presentaron glándulas con metaplasia escamosa y conglomerados de glándulas se estudió la multiplicidad de estas lesiones. Los animales con SOP presentaron una mayor multiplicidad de estas lesiones respecto al grupo CONTROL (Figura 2).

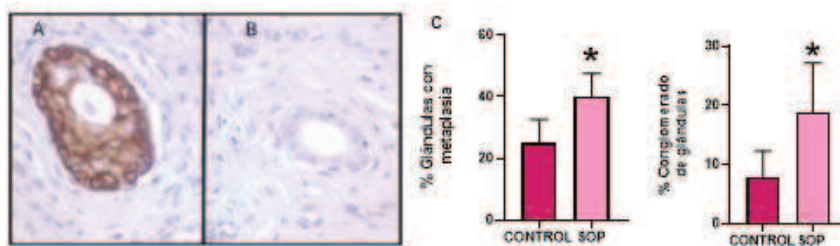


Figura 2. Multiplicidad de anomalías uterinas. **A)** Fotomicrografía de la inmunomarcación para CK 14 de una glándula con metaplasia escamosa. **B)** Glándula normal negativa para CK14. **C)** Cuantificación de la multiplicidad de metaplasia

escamosa y conglomerados de glándulas. Los valores fueron representados como la media \pm error estándar de la media (SEM). * indican diferencia significativa entre grupos (*, p<0,05).

Remodelación de las fibras de colágeno. Los animales con SOP presentaron en el estroma subepitelial una menor organización de las fibras de colágeno mientras que en el miometrio, la organización del colágeno fue mayor respecto a los animales CONTROL (Figura 3).

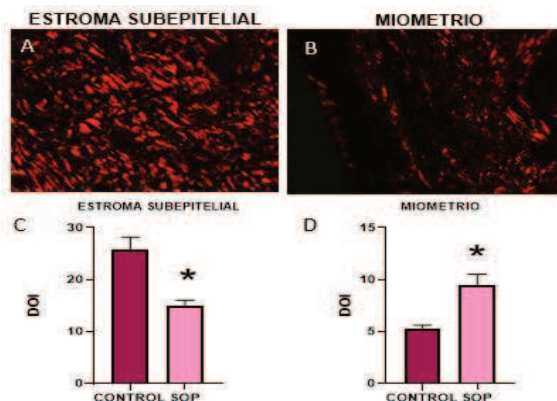


Figura 3. Evaluación de la remodelación del colágeno. Fotomicrografías de las fibras de colágeno birrefringentes (color rojo) en estroma subepitelial (A) y en miometrio circular de un animal con SOP (B). Cuantificación de la organización del colágeno en el estroma subepitelial (C) y en el miometrio (D). Los resultados son expresados como densidad óptica integrada (DOI). Los valores fueron representados como la media \pm error estándar de la media (SEM). * indica diferencia significativa respecto al grupo CONTROL (*, $p < 0,05$).

Perfil inmune del útero. Los mastocitos se localizaron cerca de los grandes vasos sanguíneos (Figura 4A) y no se observaron diferencias en el número de estas células entre los grupos. La figura 4B muestra la tinción específica para eosinófilos de rata. En el estroma subepitelial no se observan diferencias en la infiltración de eosinófilos entre los grupos experimentales, sin embargo, en el miometrio si se observa diferencia estadística. (Figura 4 C-D).

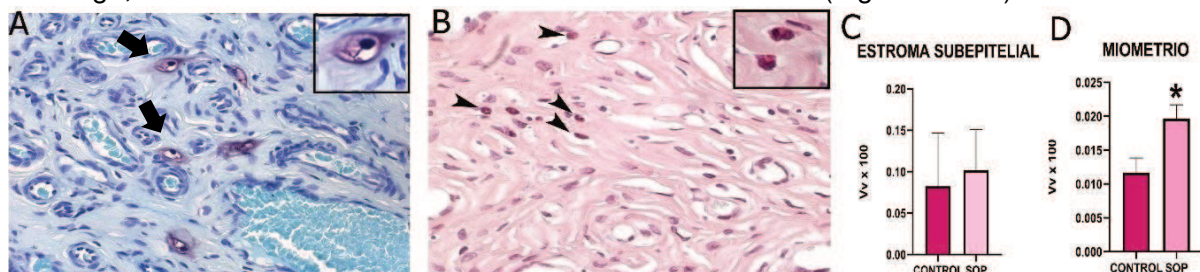


Figura 4. Evaluación de células infiltrantes. A) Fotomicrografía del estroma subepitelial uterino teñido con azul de toluidina, las flechas indican tinción específica de mastocitos (magnificación 40X). El inset muestra el mastocito a mayor aumento. B) Fotomicrografía del estroma subepitelial uterino teñido con sirius rojo. Las puntas de flecha señalan los eosinófilos (magnificación 40X) El inset muestra eosinófilos a mayor aumento. Cuantificación de eosinófilos en el estroma subepitelial (C) y en el miometrio (D). Los valores fueron representados como la media \pm error estándar de la media (SEM). * indica diferencia significativa respecto al grupo CONTROL (*, $p < 0,05$).

CONCLUSIONES

El SOP a largo plazo aumentó la incidencia de anomalías uterinas pre-neoplásicas. Estas modificaciones se asociaron con una menor organización del colágeno en el estroma subepitelial y una mayor organización en el miometrio en conjunto con una mayor infiltración de eosinófilos. Los resultados aportan evidencias de los efectos del SOP que contribuyen a entender el mayor riesgo de padecer cáncer endometrial observado en las mujeres con SOP.

BIBLIOGRAFÍA

- Bracho, G. S., Altamirano, G. A., Kass, L., Luque, E. H., Bosquiazzo, V. L. 2019. Hyperandrogenism Induces Histo-Architectural Changes in the Rat Uterus. *Reprod Sci.* 26: 657-668.
- Dumesic, D. A., Lobo, R. A. 2013. Cancer risk and PCOS. *Steroids.* 78: 782-785.
- Hardiman, P., Pillay, O. C., Atiomo, W. 2003. Polycystic Ovary Syndrome and Endometrial Carcinoma. *Lancet.* 361: 1810-1812.
- Hoeger, K. M., Dokras, A., Piltonen, T. 2021. Update on PCOS: Consequences, Challenges, and Guiding Treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 106: 1071- 1083.
- Rodríguez, H. A., Kass, L., Varayoud, J., Ramos, J. G., Ortega, H. H., Durando, M., Muñoz de Toro, M., Luque, E. H. 2003. Collagen Remodelling in the Guinea-Pig Uterine Cervix at Term is Associated with a Decrease in Progesterone Receptor Expression. *Mol Human Reprod.* 9: 807-813.