SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO: ¿CÓMO AFECTA LA HISTOMORFOLOGÍA UTERINA?

Ramis Aldana

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 Biológicas
Palabras claves: Síndrome de ovario poliquístico, rata, angiogénesis uterina.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de ovario poliquístico (SOP) es la patología más común de exceso de andrógenos que afecta entre un 8 y 18% de todas las mujeres en edad reproductiva y se asocia con trastornos metabólicos, infertilidad y cáncer endometrial (Hoeger y col. 2021). Su comienzo es insidioso e incluye: oligo/anovulación, hiperandrogenismo y quistes en los ovarios.
El útero es un órgano dinámico expuesto cíclicamente a las hormonas esteroides que regulan su histofuncionalidad. En un modelo animal de SOP se demostraron modificaciones en el metabolismo de hormonas esteroides en el útero que sugieren mayores niveles de estrógenos (Eg) (Bracho y col. 2024). Los Eg estimulan la permeabilidad vascular uterina y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bosquiazzo y col. 2010). Esto es considerado como un prerrequisito para la angiogénesis (formación de nuevos vasos a partir de la microvasculatura ya existente) (Bosquiazzo y col 2010). En este sentido, el cambio hormonal observado en los animales con SOP podría modificar la angiogénesis uterina. Existe evidencia de que pacientes con SOP tienen una expresión desregulada de factores angiogénicos en su endometrio, incluido el VEGF, angiopoyetinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta y algunos factores básicos de crecimiento de fibroblastos (Han Gong y col. 2019).
Nuestra hipótesis postula que el estado endocrino asociado al SOP induce alteraciones en procesos relacionados con la angiogénesis que podría favorecer al mayor riesgo de desarrollar hiperplasia endometrial y cáncer de útero.

OBJETIVO

Evaluar la angiogénesis uterina mediante la determinación de la proliferación de células endoteliales y la expresión del VEGF utilizando un modelo animal de SOP.

Título del proyecto: Síndrome de ovario poliquístico y su efecto sobre la histofuncionalidad uterina.
Instrumento: CAI+D
Año de la Convocatoria: 2020
Organismo financiador: UNL
Directora: Bosquiazzo, Verónica Lis

METODOLOGÍA

Animales y tratamiento: Ratas hembras se trataron por vía subcutánea con aceite de sésamo (grupo control) o DHEA (60mg/kg de peso corporal - grupo SOP) desde el día postnatal 21 y durante 20 días. Los animales se mantuvieron con agua y comida ad libitum. Se utilizaron entre 5 y 7 animales por grupo experimental. Los animales se sacrificaron 24 h después de la última inyección, seleccionando los controles que se encontraban en la misma fase del ciclo estral que los animales con SOP (determinado por extendidos vaginales). Al momento del sacrificio se diseccionaron ambos cuernos uterinos. Uno de los cuernos fue procesado para estudios histológicos y el otro para estudios de biología molecular.

Inmunohistoquímica (IHQ) simple: Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor, los cuales se sometieron a desparafinización e hidratación, recuperación de la antigenicidad, y bloqueo de la peroxidasa endógena y de las uniones inespecíficas. Luego se incubaron con el anticuerpo primario específico toda la noche a 4°C: Anti-VEGF (clon C-1, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), marcador de células endoteliales capaces de proliferar Anti-Nestina (Biosciences, CA, USA), marcador de células endoteliales Anti-FvW (DAKO, Glostrup, Denmark), marcador de fibroblastos Anti-Vimentina (clon V9, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), marcador de células musculares Anti-Desmina (clon DER 11, Novocastra) y Anti- alfa actina de músculo liso (clon α-SMA, Novocastra). Se revelaron con un segundo anticuerpo conjugado con biotina (anti-ratón o anti-conejo según corresponda), seguidos de extravidina-peroxidasa, y usando diaminobencidina (DAB, marcación marrón) o DAB-Níquel (marcación negra) como sustrato cromogénico.

IHQ doble: Consiste en dos IHQ sucesivas y se realizó para identificar células endoteliales en proliferación. Primero se realizó la inmunomarcación de Ki-67 (ISAL, Santa Fe, Argentina) como se describió para la IHQ simple, revelada con DAB. Luego las secciones se calentaron en microondas para eliminar cualquier resto del ensayo anterior. Se vuelven a bloquear las uniones inespecíficas para luego incubar durante la noche a 4 °C con un anticuerpo anti-nestina. Se siguió el mismo sistema de revelado que la IHQ simple, pero se utilizó DAB con níquel.

La inmunomarcación de VEGF se cuantificó como densidad óptica integrada (DOI) aplicando análisis de imágenes siguiendo protocolos descritos previamente por nuestro grupo (Bosquiazzo y col. 2010). La proliferación de células nestina positivas se evaluó determinando el porcentaje de células doblemente positivas (Ki67/nestina) por el número total de células endoteliales nestina positiva. Las cuantificaciones se realizaron en los distintos compartimentos celulares del útero.

Doble inmunofluorescencia: Se realizó una doble marcación usando combinaciones de los anticuerpos anti-vimentina y anti-nestina. Se siguió el mismo protocolo que la IHQ doble a diferencia que el sistema de revelado consistió en un anticuerpo anti-ratón marcado con reactivo fluorescente Cy2 (verde) para nestina y anti-ratón biotinilado seguido de extravidina marcada con el fluoróforo TRICT (rojo) para vimentina. Luego se identificaron los núcleos con DAPI (azul). Finalmente, todas las secciones se montaron con medio de montaje fluorescente Fluorshield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real: El ARN total de úteros conservados a -80°C se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL. Los mismos se sometieron a RT-PCR en tiempo real, utilizando la técnica de fluorescencia del ADN doble cadena con el colorante Evagreen, y siguiendo un protocolo utilizado en nuestro laboratorio (Bracho y col 2024). La amplificación de los genes blanco se realizó con oligonucléotidos específicos diseñados de acuerdo con las secuencias publicadas en GenBank o previamente publicados. Se empleó la expresión de la proteína ribosomal L19 como ARNm normalizador. La pureza de los productos de amplificación se confirmó por curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa utilizando el colorante GelRed™ (Biotium ®).

Análisis estadístico: Los resultados se expresaron como el promedio ± SEM (Error Estándar de la Media). Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos, la comparación de los datos entre los grupos experimentales se realizó con la prueba t de Student o Mann-Whitney, según correspondía (SPSS-PASW Statistics v. 20). Se aceptaron como diferencia significativa valores con $p < 0,05$ entre los grupos.

RESULTADOS

Expresión de nestina en útero. La IHQ de nestina mostró marcación específica en células endoteliales y además se observó sólo en los animales con SOP una marcación específica debajo de la membrana basal del epitelio luminal (Fig. 1, panel superior). Para caracterizar dichas células se evaluó α-SMA, desmina y FvW que no mostraron marcación, mientras que sí se observó inmunodetección de vimentina en esa zona (Fig. 1, panel inferior). Posteriormente, se realizó una IF doble para vimentina y nestina, demostrando que coexpresión de ambas proteínas (Fig. 2).

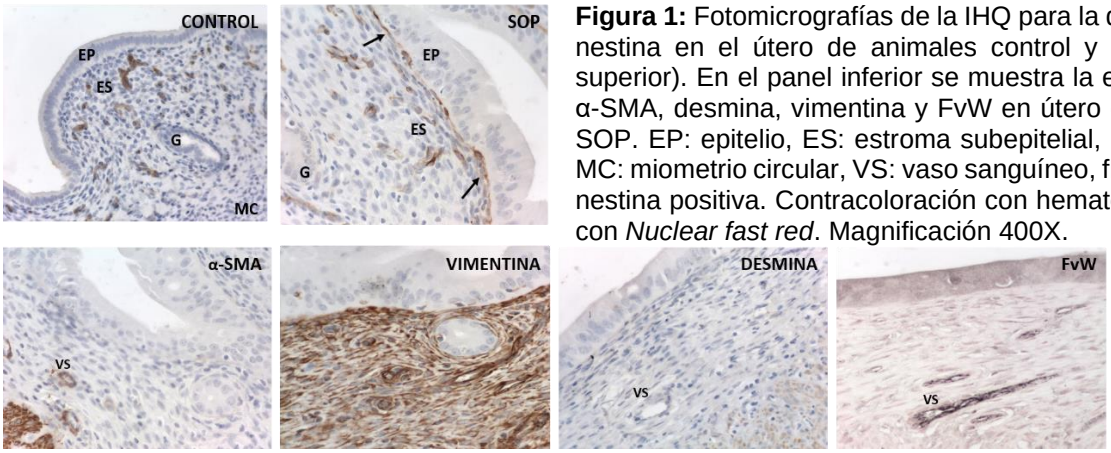

Figura 1: Fotomicrografías de la IHQ para la detección de nestina en el útero de animales control y SOP (panel superior). En el panel inferior se muestra la expresión de α-SMA, desmina, vimentina y FvW en útero de animales SOP. EP: epitelio, ES: estroma subepitelial, G: glándula, MC: miometrio circular, VS: vaso sanguíneo, flecha: célula nestina positiva. Contracoloración con hematoxilina, FvW con *Nuclear fast red*. Magnificación 400X.

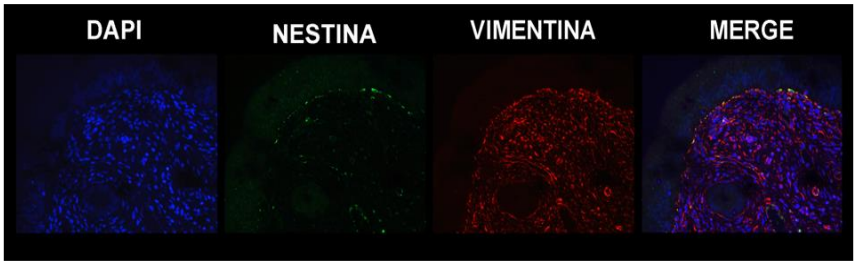

Figura 2: Fotomicrografías de la IF doble nestina/vimentina del útero de un animal con SOP. De color azul se visualizan los núcleos, verde la nestina y rojo la vimentina. La coexpresión se observa de color amarilla en la imagen "merge".

Proliferación de células endoteliales. No se observaron cambios en la proliferación de células endoteliales nestina positiva (Fig. 3).

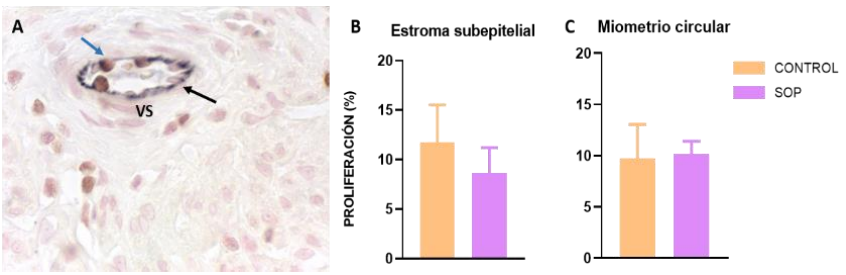

Figura 3: A: Fotomicrografía representativa de la doble IHQ ki67/nestina. Se observa un vaso (VS), con células endoteliales nestina positiva (flecha negra) y células endoteliales proliferando (Ki67+/nestina+) (flecha a zul). Magnificación 100X. B y C: Cuantificación de las células

endoteliales en proliferación en estroma subepitelial y miometrio circular expresado como porcentaje. Las barras representan valores promedio ± el error estándar.

Expresión del VEGF. Se observó una disminución de la expresión del ARNm de VEGF en animales con SOP. La proteína se detectó en todos los compartimentos uterinos, siendo mayor su expresión en el miometrio de los animales con SOP (Fig 4).

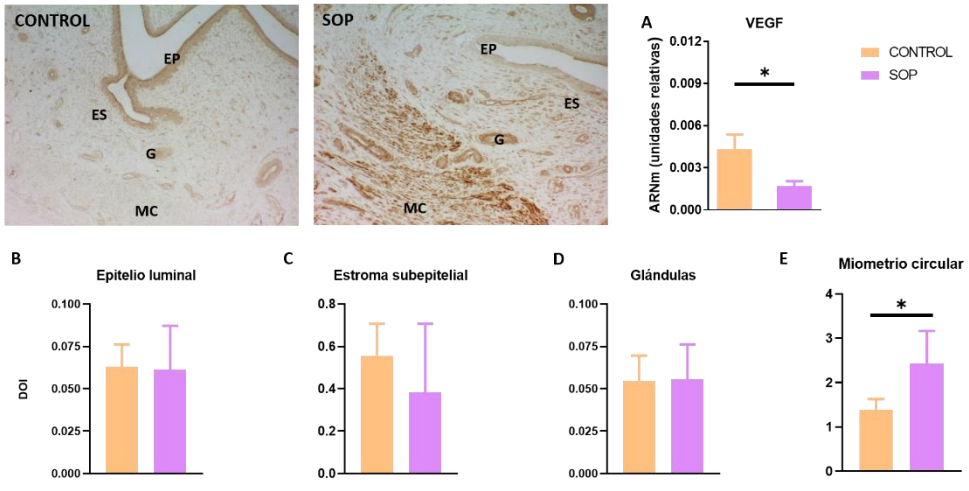

Figura 4: Imágenes representativas de la expresión de VEGF en el útero de animales control y con SOP. EP epitelio, ES (estroma subepitelial), G (glándula), MC (miometrio circular). Magnificación 200X. A: Cuantificación del ARNm del VEGF. B-E: Cuantificación de la expresión proteica de VEGF. Los resultados son expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan los valores promedios ± el error estándar. El asterisco indica $p < 0,05$.

CONCLUSIÓN

En el útero de los animales con SOP demostramos, debajo del epitelio luminal, un tipo de fibroblasto específico cuyo fenotipo expresa filamentos intermedios de nestina y vimentina. Esta modificación histológica podría inducir cambios en la interacción célula-célula o célula-matriz extracelular.

La disminución de la expresión del ARNm de VEGF no se observó a nivel proteico, lo que sugiere que el SOP induciría modificaciones post-transcripcionales de VEGF. Además, no se observaron cambios en la proliferación de células endoteliales lo que sugiere que el SOP no alteraría el proceso de angiogénesis uterina.

BIBLIOGRAFÍA

Bosquiazzo VL, Varayoud J, Muñoz de Toro M, Luque E, Ramos JG. (2010). Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus. Biol Reprod 82, 86–95.

Bracho GS, Acosta MV, Altamirano GA, Alcaraz MR, Montemurro M, Culzoni MJ, Rossetti MF, Kass L, Luque EH, Bosquiazzo VL. (2024). Uterine histopathology and steroid metabolism in a polycystic ovary syndrome rat model. Mol Cell Endocrinol. doi.org/10.1016/j.mce.2024.112198.

Gong H, Wu W, Xu J, Yu D, Qiao B, Liu H, Yang B, Li Y, Ling Y, Kuang H. (2019). Flutamide a Ymeliorates uterine decidualization and angiogenesis in the mouse hyperandrogenemia model during mid-pregnancy. PLoS ONE 14(5): e0217095.

Hoeger KM, Dokras A, Piltonen T. (2021). Update on PCOS: consequences, challenges, and guiding treatment. J Clin Endocrinol Metab. 106, 1071-1083.