

# ANOMALÍAS UTERINAS EN RATAS CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Iñiguez, Inri

*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: SOP, anomalías uterinas, rata.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es la endocrinopatía más común entre las mujeres en edad reproductiva. El SOP se asocia con ciclos anovulatorios, ovarios poliquísticos y/o hiperandrogenismo. Este síndrome es un factor de riesgo para el desarrollo de patologías uterinas como hiperplasia y cáncer endometrial (Li y col. 2019, Hardiman y col. 2010). A nivel celular, existen numerosos mecanismos potenciales que podrían promover efectos adversos en el útero de las mujeres con SOP, incluyendo el estado anovulatorio crónico que conlleva a que la progesterona (P4) producida sea insuficiente y no pueda oponerse a los efectos de los estrógenos (Eg), y el estado de hiperandrogenismo que puede asociarse con una exposición constante y/o elevada a Eg (Giudice 2006). Estudios previos han demostrado que la histoarquitectura uterina se modifica en animales con SOP. Específicamente, se observó un aumento en el peso uterino, la altura del epitelio luminal, la densidad de glándulas y el espesor de las paredes uterinas. El aumento del espesor se asoció con una disminución de la densidad de células estromales, lo que podría deberse a cambios en el número de células y/o en el espacio extracelular (Bracho y col. 2019, Simitsidellis y col. 2016). Estos efectos podrían estar regulados por cambios en los niveles séricos de hormonas esteroides como así también por modificaciones en la esteroidogénesis tisular. En este sentido, en endometrios obtenidos de mujeres con SOP y en modelos animales se demostraron cambios en la expresión y actividad de enzimas esteroidogénicas en el útero que sugiere una mayor concentración *in situ* de Eg (Shang y col. 2012, Zhao y col. 2014). Por lo tanto, el desbalance hormonal observado en el SOP podría favorecer el mayor riesgo de desarrollar alteraciones uterinas.

## OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo postula que el estado endócrino asociado al SOP predispone a un mayor riesgo de desarrollar patologías uterinas. Para poner a prueba esta hipótesis, nos propusimos estudiar los efectos del SOP a largo plazo, utilizando un modelo animal. Específicamente se evaluó: 1) el estado endócrino a nivel sistémico mediante la determinación de 17 $\beta$ -estradiol (E2), P4 y testosterona (T), y 2) la incidencia y multiplicidad de anomalías uterinas.

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

## METODOLOGÍA

**Animales.** El protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética y seguridad de la investigación de la FBCB, Universidad Nacional del Litoral. 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).

**Diseño experimental.** Se utilizó un modelo de rata expuestas experimentalmente a dehidroepiandrosterona (DHEA) para inducir el SOP. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para estudiar el desarrollo y efectos del SOP en roedores (Giudice, 2006; Lee y col., 2016; Maliqueo y col., 2014). Para ello se utilizaron ratas que fueron tratadas por vía subcutánea (sc) con DHEA, 60 mg/kg de peso corporal/día (grupo SOP) o 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 aproximadamente), momento en el que fueron sacrificados en la etapa de diestro determinado por citología vaginal. Al momento del sacrificio se obtuvieron muestras de sangre y se diseccionaron los cuernos uterinos que se procesaron para estudios histológicos.

**Evaluación del estado endócrino de los animales a nivel sistémico.** A partir de las muestras de suero se determinaron los niveles séricos de E2, P4 y T por ensayos de quimioluminiscencia utilizando un sistema de diagnóstico *in vitro* Immulite®2000 (Siemens Healthcare SA, Argentina), siguiendo las especificaciones del fabricante. El coeficiente de variación intraensayo fue de 6.7% para E2, 9.7% para P4 y 10.1% para T.

**Evaluación de anormalidades uterinas.** Las muestras de útero incluidas en parafina fueron seccionadas longitudinalmente en cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor y coloreadas con Hematoxilina — Eosina (H-E) o Ácido periódico de Schiff (PAS). Se analizó exhaustivamente la histología y se evaluó la presencia de anormalidades uterinas previamente descritas (Bosquiazzo y col., 2013). La incidencia de cada alteración se cuantificó determinando el porcentaje de animales que presentaban al menos una alteración histológica (Bosquiazzo y col., 2013). La multiplicidad de las anormalidades se cuantificó determinado el porcentaje de cada anomalía por animal. Para la identificación de las glándulas con metaplasia escamosa se utilizó la inmunomarcación 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.

**Análisis estadístico.** Se utilizó el test de la probabilidad exacta de Fisher para evaluar la incidencia de cada anormalidad uterina. Cuando los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (Error Estándar de la Media) se analizaron con el test de Mann-Whitney (SPSS-PASW Statistics v. 20.).  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

**Perfil hormonal de rata hembra.** El 100% de los animales con SOP presentaron niveles detectables de E2 comparado con el 77.8% de las ratas del grupo CONTROL, siendo a su vez, el valor medio mayor en los animales con SOP (Tabla 1). La P4 fue detectable en todos los animales sin mostrar diferencia entre los grupos experimentales (Tabla 1). En cuanto a

los niveles séricos de T, el 33,3 y 11,1% de los animales del grupo CONTROL y SOP respectivamente presentaron valores detectables y similares en su valor medio (Tabla1).

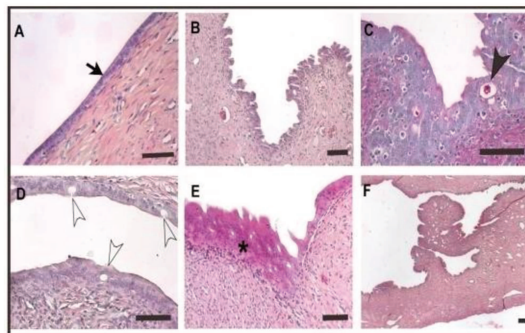
**Tabla 1.** Hormonas esteroideas séricas en animales CONTROL y con SOP.

HORMONA	LD	nº de muestras detectables / nº total de muestras (%)		Media ± SEM	
		CONTROL	SOP	CONTROL	SOP
E2 (pg/mL)	5 pg/mL	7/9 (77,8%)	9/9 (100%)	10,7 ± 2,7	17,6 ± 1,9 *
P4 (ng/mL)	0,03 ng/mL	9/9 (100%)	9/9 (100%)	33,1 ± 9,2	29,4 ± 9,5
T (ng/mL)	0,025 ng/mL	3/9 (33,3%)	1/9(11,1%)	0,04 ± 0,01	0,03

LD: Límite de detección

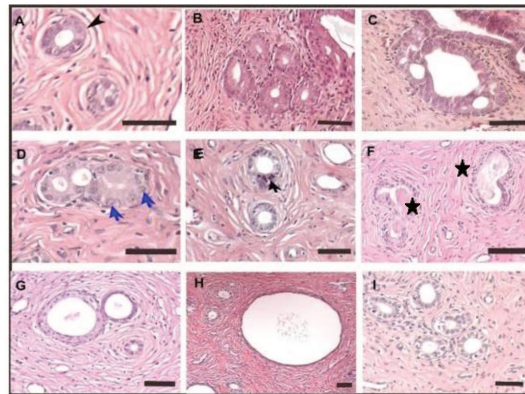
**Evaluación histológica del útero.** En la figura 1 y 2 se muestran las anomalías observadas en el epitelio luminal y en el compartimento glandular respectivamente de animales CONTROL y con SOP.

**EPITELIO LUMINAL**



**Figura 1.** Anormalidades encontradas en el epitelio luminal uterino de ratas de los grupos **CONTROL** y **SOP**. **A)** Epitelio normal en etapa diestro. **B)** Epitelio papilar. **C)** Lúmen intraepitelial con marcación PAS positiva (punta de flecha negra). **D)** Glándula intraepitelial (punta de flecha blanca). **E)** Epitelio luminal estratificado (asterisco). **F)** Pólipo que aparecen como una protuberancia del tejido estromal. A, B, D-F tinción con H-E; C tinción con PAS. Barra de escala: 50 µm.

**COMPARTIMENTO GLANDULAR**



**Figura 2.** Anormalidades encontradas en el compartimento glandular uterino de ratas de los grupos **CONTROL** y **SOP**. **A)** Glándula normal que presenta un epitelio simple cúbico (punta de flecha negra). **B)** Conglomerados de glándulas. **C)** Glándulas con glándulas hijas, presentan glándulas dentro del epitelio glandular de la glándula madre. **D-F)** Glándulas con atipias celulares: núcleos hipocrómicos (flechas azules), núcleo hiperocrómico (flechas negras), disposición anómala de las células (estrellas negras). **G)** Glándula con metaplasia, caracterizadas por poseer dos o más capas de células. **H)** Glándulas quísticas, usualmente de gran tamaño, amplia luz y epitelio simple plano. **I)** Glándulas con vacuolas intracitoplasmática. Tinción con H-E. Barra de escala: 50 µm.

La tabla 2 muestra la incidencia de las anomalías anteriormente descripta.

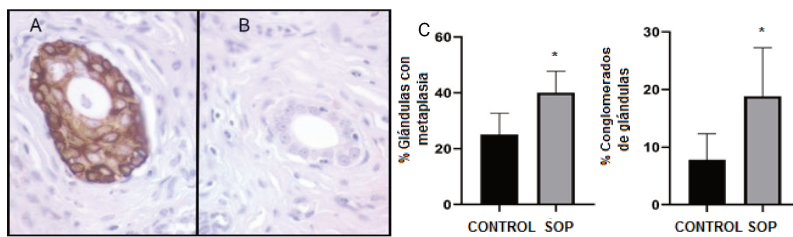
**Tabla 2.** Incidencia de alteraciones en animales CONTROL y con SOP.

ALTERACIONES EN 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	0/13 (0 %)	4/15 (26,6 %) *
Glándulas intraepiteliales	2/13 (15,4 %)	10/15 (66,7 %) *
Epitelio luminal estratificado	1/13 (7,7 %)	8/15 (53,3 %) *
ALTERACIONES EN COMPARTIMENTO GLANDULAR		
Metaplasia	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 atíпия y/o otras alteraciones	11/12 (91,7 %)	13/15 (86,7 %)
Glándulas con vacuolas intracitoplasmática	12/13 (92,3 %)	6/15 (40 %) *

Los resultados son expresados como número de ratas afectadas con una determinada alteración relativizado con el total 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 de conglomerados de glándulas se estudió la multiplicidad de estas lesiones por animal. Se demostró que los animales con SOP presentaron un aumento en el porcentaje de glándulas con metaplasia y de conglomerados de glándulas con respecto al grupo CONTROL (Figura 3).



**Figura 3.** Multiplicidad de anomalías uterinas. Fotomicrografía de la inmunomarcación para CK 14. En **A)** se muestra una glándula con metaplasia escamosa positiva para la inmunotinción y

en **B)** una 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). Asteriscos indican diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

El SOP, a largo plazo, modificó el ambiente endocrino lo cual fue evidenciado por mayores niveles séricos de E2 y aumentó la incidencia y multiplicidad de anomalías uterinas pre-neoplásicas.

Los resultados aportan evidencias que contribuyen a entender el mayor riesgo de padecer cáncer endometrial observado en las mujeres con SOP.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- 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.
- Giudice L.C.,** 2006. Endometrium in PCOS: implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 20(2): 235-244.
- Hardiman P., Pillay O.C., Atiomo W.,** 2003. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet.* 361:1810-1812.
- Lee M.J., Jang M., Bae C.S., Park K.S., Kim H.J., Lee S., Cho I.H.,** 2016. Effects of Oriental Medicine Kyung-Ok-Ko on Uterine Abnormality in Hyperandrogenized Rats. *Rejuvenation Res.* 19(6): 456-466.
- Li Y., Zheng Q., Sun D., Cui X., Chen S., Bulbul A., Liu S., Yan Q.,** 2019. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome. *J Cell Physiol.* 234:7435-7447.
- Maliqueo M., Benrick A., Stener-Victorin E.,** 2014. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. *Semin Reprod Med.* 32(3): 183-193.
- Shang K., Jia X., Qiao J., Kang J., Guan Y.,** 2012. Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci.* 19, 674-683.
- Simitsidellis I., Gibson D.A., Cousins F.L., Esnal-Zufiaurre A., Saunders P.T.,** 2016. A Role for Androgens in Epithelial Proliferation and Formation of Glands in the Mouse Uterus. *Endocrinology.* 157(5): 2116-2128.
- Zhao P.L., Zhang Q.F., Yan L.Y., Huang S., Chen Y., Qiao J.,** 2014. Functional investigation on aromatase in endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome cases. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15:8975-9.