



OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO DE INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSIS EN RATA

Di Paolo, Sebastián

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL) CONICET – UNL

Directora: Milesi, María Mercedes

Codirectora: Durando, Milena

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: endometriosis, trasplante autólogo, útero

INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una enfermedad ginecológica crónica que afecta aproximadamente al 10-15% de las mujeres en edad reproductiva (Janssen EB y col., 2013). Se caracteriza por la presencia de tejido endometrial funcionalmente activo fuera de la cavidad uterina (Kitawaki J & Giudice LC, 2010). Es una patología de naturaleza inflamatoria y dependiente de estrógenos, en la cual, los implantes endometriales ectópicos, estimulados por los cambios hormonales del ciclo menstrual, suelen localizarse principalmente en órganos pélvicos y en el peritoneo (Mori T y col. 2019). Si bien es una enfermedad benigna, su comportamiento clínico puede ser agresivo; con capacidad para crecer, infiltrar e incluso diseminarse, en una forma similar a como lo hace un tejido neoplásico (Anglesio MS y col., 2017). La endometriosis altera la calidad de vida de las mujeres que la padecen, afectando sus relaciones personales, actividades laborales y su capacidad reproductiva.

El uso de modelos animales representa una poderosa herramienta para ampliar el conocimiento acerca de la patogénesis y progresión de la enfermedad. Estos modelos hacen posible la investigación de los mecanismos mediante los cuales el endometrio se adhiere, invade y establece una vasculatura funcional para persistir en un sitio ectópico, así como el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para prevenir la progresión de la enfermedad.

OBJETIVOS

- ❖ Optimizar un modelo de inducción experimental de endometriosis en rata, mediante la inducción quirúrgica de la enfermedad consistente en el trasplante autólogo de fragmentos de tejido uterino sobre la superficie del mesotelio intestinal.
- ❖ Evaluar la regularidad del ciclo estral mediante extendidos vaginales.
- ❖ Determinar el número y el volumen de las lesiones endometrióticas en la cavidad peritoneal.
- ❖ Evaluar la proliferación celular y determinar la expresión de receptores de hormonas esteroideas que regulan dicho proceso en biopsias de tejido uterino eutópico y en las lesiones endometrióticas (tejido ectópico).

Título del proyecto: "Exposición a glifosato y riesgo de endometriosis: potenciales mecanismos implicados"

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Milesi, María Mercedes



Federación
Universitaria
del Litoral

100



UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas Wistar de nuestro bioterio mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperíodo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad. Los animales contaron con libre acceso a agua y comida (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina). Para el manejo de los animales se siguieron las normas establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Academia Nacional de Ciencias, EE UU). Además, todos los protocolos propuestos fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la FCB-UNL. A continuación, se describen los procedimientos y metodologías para llevar a cabo los objetivos propuestos:

Inducción quirúrgica de endometriosis; Evaluación de la regularidad del ciclo estral; Determinación del número y volumen de las lesiones endometriósicas en la cavidad peritoneal:

Se utilizaron ratas de 40 días de edad a las que se les indujo quirúrgicamente la endometriosis mediante trasplante autólogo de fragmentos de tejido uterino sobre la superficie del mesotelio intestinal (grupo Endometriosis)(Vernon MW & Wilson EA, 1985). Brevemente, el procedimiento consistió en exponer el útero a través de una incisión en la zona media del abdomen y proceder a ligar uno de los cuernos uterinos a ambos lados para luego removerlo. El otro cuerno uterino se preservó para llevar adelante las evaluaciones en el endometrio eutópico. En el cuerno uterino que fue removido se expuso el endometrio realizando una disección a través del eje antimesentérico en solución salina estéril a 37°C . Secciones de $5 \times 5 \text{mm}$ fueron auto-trasplantadas por sutura en distintos sitios del mesotelio intestinal. Se incorporaron al estudio un grupo experimental SHAM (hembras a las que se les extrajo un cuerno uterino y se emuló el procedimiento de autotrasplante realizando suturas simples en el mesotelio intestinal) para evaluar posibles efectos relacionados con la manipulación quirúrgica, y un grupo Control correspondiente a hembras a las que se les extrajo un cuerno uterino sin intervención en el mesotelio intestinal.

Transcurridos 15 días de recuperación post-cirugía, se evaluó la regularidad del ciclo estral mediante extendidos vaginales durante 30 días consecutivos. A partir de los datos obtenidos, determinamos para cada grupo experimental la proporción de días en que las hembras permanecieron en las etapas de estro/proestro y diestro del ciclo estral.

Las hembras fueron sacrificadas en la mañana del primer estro más cercano al día posnatal 85 (DPN 85) para determinar el número de lesiones endometriósicas en la cavidad peritoneal y las dimensiones con un calibre. Con los datos de longitud (L) y ancho (W) se determinó el volumen esférico de cada implante utilizando la fórmula ($\pi \text{LW}^2 / 6$) (Pontillo CA y col. 2013).

Evaluación de la proliferación celular y determinación de la expresión de receptores de hormonas esteroideas

En el DPN 85, se obtuvieron biopsias de tejido uterino eutópico y ectópico. Ciertas porciones se fijaron en formaldehído 4% (durante 6 hs) y fueron procesadas hasta su inclusión en parafina para realizar técnicas histológicas y de inmunohistoquímica (IHQ). Se utilizaron cortes de $5 \mu\text{m}$ de tejido uterino eutópico y ectópico que fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) para evaluar la histología y verificar la naturaleza uterina de las lesiones. En otros cortes se analizó la proliferación celular mediante la inmunomarcación de Ki-67, y se determinó la expresión del receptor de progesterona (PR) y del receptor de estrógeno alfa ($\text{ER}\alpha$) mediante IHQ (Guerrero Schimpf M y col. 2018).

Para la determinación de la expresión de proteínas mediante IHQ se aplicaron protocolos previamente descritos (Milesi MM y col. 2015). Se emplearon anticuerpos primarios

comerciales y anticuerpos secundarios biotinilados. La reacción de inmunomarcación se desarrolló utilizando extravidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich) como sistema de revelado y diaminobencidina (Sigma-Aldrich) como sustrato cromogénico. En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad, sustituyendo el anticuerpo primario por un suero no inmune.

RESULTADOS

Aplicamos el procedimiento quirúrgico de inducción de endometriosis en ratas y se optimizó el modelo con éxito. Los animales presentaron buena recuperación post-cirugía, no se evidenciaron casos de infección ni efectos adversos. La sobrevivencia de las ratas fue del 100%. En cuanto al ciclo estral, se evidenció una ligera tendencia de las ratas con endometriosis a permanecer más tiempo en estro/proestro (Figura 1), lo que podría sugerir una desregulación del ciclo y un posible desbalance hormonal.

En las hembras del grupo Endometriosis, los implantes de fragmentos uterinos se desarrollaron y evolucionaron hasta formar lesiones o quistes viables con presencia de irrigación sanguínea (Figura 2). Se evidenciaron nuevos quistes desarrollados a partir de la migración celular de los implantes originales, indicando establecimiento y progresión de la patología. Los fragmentos uterinos implantados presentaban originalmente un volumen esférico de $2,6 \times 10^{-2} \text{ cm}^3$, y transcurridos 45 días posteriores a la inducción de la patología, se obtuvieron lesiones con un volumen esférico promedio de $2,4 \times 10^{-2} \pm 8,6 \times 10^{-3} \text{ cm}^3$.

Es importante mencionar que no se observaron quistes, adherencias o abscesos en las hembras del grupo Sham, por lo que el procedimiento quirúrgico no tiene implicancia en el desarrollo de quistes relacionados con la patología.

El análisis histológico e inmunohistoquímico de las lesiones endometriósicas permitió confirmar la naturaleza uterina de las mismas, al evidenciarse los compartimentos característicos del tejido uterino (epitelio, estroma, y miometrio), cuyas células presentaron marcación positiva para proliferación celular (Ki-67), receptor de progesterona (RP) y receptor de estrógeno alfa ($\text{RE}\alpha$). Se trata de tejido uterino encapsulado, con gran vascularización y gran cantidad de infiltrado inflamatorio en su interior, y un alto índice de proliferación celular, principalmente en el estroma (Figura 3).

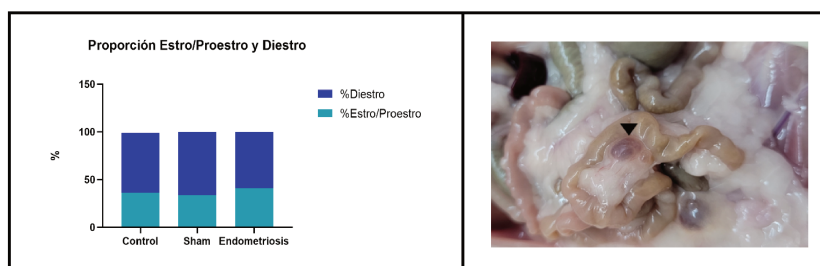


FIGURA 1. Gráfico de barras que representa el porcentaje de días en estro/proestro y el porcentaje de días en Diestro de un total de 100% para cada grupo experimental.



FIGURA 2. Lesión endometriósica (punta de flecha) en mesotelio intestinal.

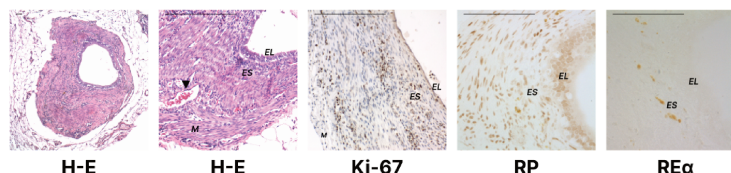


FIGURA 3. Cortes histológicos de tejido uterino ectópico. Tinción de hematoxilina-eosina (H-E), proliferación celular (Ki-67), expresión de receptor de progesterona (RP) y de receptor de estrógeno alfa ($\text{RE}\alpha$). EL: epitelio luminal; ES: estroma subepitelial; M: miometrio. La punta de flecha indica vasos sanguíneos. La barra de escala representa 50 micras.

El análisis histológico del tejido uterino eutópico teñido con H-E, reveló mayor cantidad de infiltrado en glándulas y un alto grado de células en apoptosis en las hembras del grupo Endometriosis. Asimismo, estas hembras presentaron un alto índice de proliferación celular en epitelio y estroma, en comparación con los grupos Control y Sham. En el grupo Endometriosis se observó una menor expresión del RE α en el epitelio, estroma y glándulas, mientras que no se evidenciaron cambios en la expresión del RP entre los distintos grupos experimentales (Figura 4).

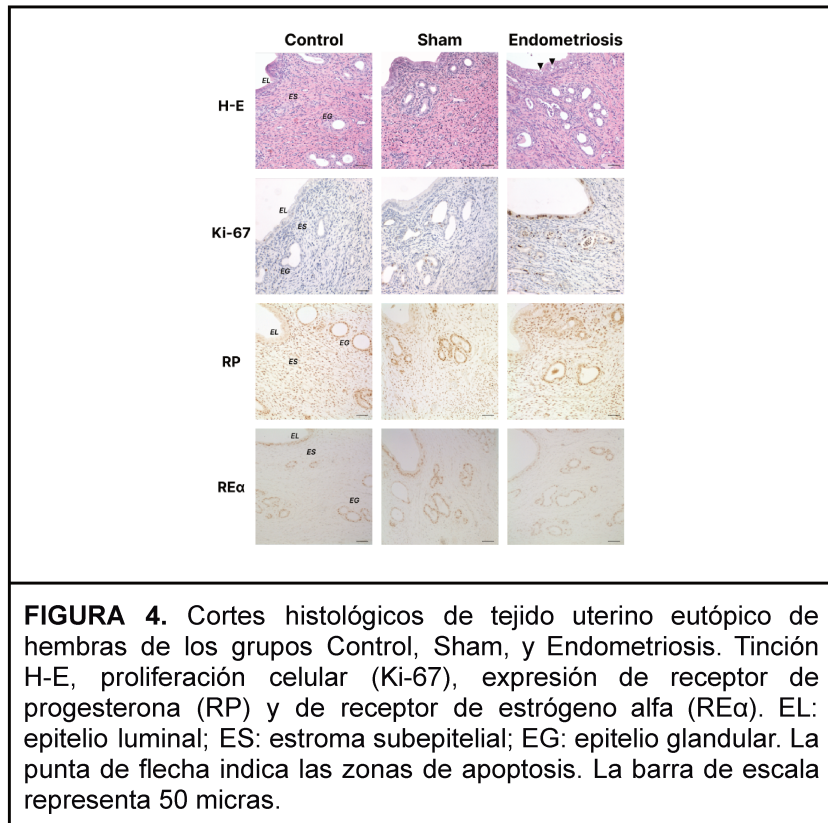


FIGURA 4. Cortes histológicas de tejido uterino eutópico de hembras de los grupos Control, Sham, y Endometriosis. Tinción H-E, proliferación celular (Ki-67), expresión de receptor de progesterona (RP) y de receptor de estrógeno alfa (RE α). EL: epitelio luminal; ES: estroma subepitelial; EG: epitelio glandular. La punta de flecha indica las zonas de apoptosis. La barra de escala representa 50 micras.

CONCLUSIONES

Se logró optimizar el modelo de inducción experimental de endometriosis en rata y garantizar la sobrevivencia de los animales sin que presenten efectos indeseados por el procedimiento. La viabilidad de los implantes y los cambios en eventos celulares hormonodependientes observados en el tejido uterino eutópico y ectópico, sugieren que la enfermedad se estableció y progresó en el tiempo de estudio, y, que a su vez, generó modificaciones tanto a nivel hormonal como tisular. El modelo es eficaz para utilizarse en futuras investigaciones relacionadas con la patología.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Janssen EB y col.**, 2013. Human Reproduction Update. 19:570-582.
Kitawaki J & Giudice LC, 2010. New England Journal of Medicine. 362:2389-2398.
Mori T y col., 2019. Reproductive Medicine and Biology. 18:305-311.
Anglesio MS y col., 2017. New England Journal of Medicine. 376:1835-1848.
Vernon MW & Wilson EA, 1985. Fertility and Sterility. 44:684-694.
Pontillo CA y col., 2013 Toxicology and Applied Pharmacology. 268:331-342.
Guerrero Schimpf M, Milesi MM, Luque EH, Varayoud J, 2018. Glyphosate-based herbicide enhances the uterine sensitivity to estradiol in rats. Journal of Endocrinology. 239: 197-213.
Milesi MM, Alarcón R, Ramos JG, Muñoz-de-Toro M, Luque EH, Varayoud J, 2015. Neonatal exposure to low doses of endosulfan induces implantation failure and disrupts uterine functional differentiation at the pre-implantation period in rats. Molecular and Cellular Endocrinology. 401:248-259.