

Modulazione dell'espressione endometriale del pathway di VEGF e Notch-1 nei difetti di impianto

F. CAPRIO, L. IZZO, A. NOCERINO, A. PANARIELLO, I. PISANI,
A. GRIMALDI, S. LEO, M. E. SALZILLO, L. COBELLIS

RIASSUNTO: Modulazione dell'espressione endometriale del pathway di VEGF e Notch-1 nei difetti di impianto.

F. CAPRIO, L. IZZO, A. NOCERINO, A. PANARIELLO, I. PISANI,
A. GRIMALDI, S. LEO, M. E. SALZILLO, L. COBELLIS

Introduzione. È stato ipotizzato che un'alterazione dell'angiogenesi possa essere responsabile dei difetti di impianto in alcune condizioni di sterilità primaria ed associata ad endometriosi. VEGF e Notch sono molecole che partecipano in maniera rilevante ai processi angiogenetici. Lo scopo dello studio è valutare l'espressione endometriale di Notch-1 e VEGF nelle varie fasi del ciclo endometriale di donne affette da endometriosi e da sterilità idiopatica in confronto a controlli sani.

Materiali e metodi. È stata esaminata, con metodica immunohistochimica, l'espressione di VEGF e Notch nell'endometrio prelevato in fase proliferativa e secretiva in tre gruppi di pazienti. Gruppo A: controlli sani. Gruppo B: donne sterili affette da endometriosi. Gruppo C: donne con sterilità primaria.

Risultati. Nel gruppo A l'espressione del VEGF è lieve nella fase proliferativa e moderata in quella secretiva, mentre l'espressione di Notch-1 si mantiene costantemente elevata nelle due fasi. Nel gruppo B il pattern di espressione del VEGF è invertito e l'espressione di Notch-1 è lieve nelle due fasi. Nel gruppo C l'espressione del VEGF e Notch-1 si mantiene bassa durante tutto il ciclo.

Conclusioni. VEGF e Notch hanno un ruolo potenzialmente rilevante nella modulazione del rimodellamento vascolare dell'endometrio nei difetti di impianto.

SUMMARY: VEGF and Notch-1 endometrial pathway in implantation failure.

F. CAPRIO, L. IZZO, A. NOCERINO, A. PANARIELLO, I. PISANI,
A. GRIMALDI, S. LEO, M. E. SALZILLO, L. COBELLIS

Background. It has been suggested that an impaired angiogenesis could be responsible for implantation failure in some patients affected by primary infertility or endometriosis. VEGF and Notch play a relevant role in angiogenesis. The aim of this study was to evaluate the expression of Notch and VEGF in both proliferative and secretive endometrium from women affected by endometriosis or primary infertility as compared to healthy controls.

Material and methods. Expression of VEGF and Notch were analyzed by means of histochemistry in proliferative and secretive endometrium from three groups of patients: healthy controls (group A), women affected by endometriosis (group B), women with primary infertility (group C).

Results. In group A the expression of VEGF was mild in proliferative phase and moderate in secretive phase, while the expression of Notch 1 was high in both phases. In group B the expression pattern of VEGF was reversed as compared to group A and the expression of Notch 1 was mild in both phases. In group C the expression of VEGF and Notch 1 was mild in both phases.

Conclusions. VEGF and Notch play a potentially critical role in the modulation of vascular remodeling of endometrium in implantation failures.

KEY WORDS: Impianto - Angiogenesi - VEGF - Notch - Endometriosi - Sterilità primaria.
Implantation - Angiogenesis - VEGF - Notch - Endometriosis - Primary infertility.

Introduzione

L'impianto è il processo in cui la blastocisti aderisce alla mucosa uterina e penetra nell'endometrio opportunamente preparato da una corretta sequenza di eventi, regolati da ormoni ovarici e da fattori embrionali e caratterizzati da un'intensa proliferazione cellulare, rimodellamento vascolare, angiogenesi. L'angiogenesi, processo caratterizzato dallo sviluppo di nuovi vasi, è indotta da

una serie di molecole tra le quali il VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ha sicuramente un ruolo rilevante: esso è, infatti, un fattore di crescita con spiccata attività mitotica sulle cellule endoteliali delle quali favorisce la migrazione ed agisce come vasodilatatore aumentando la permeabilità vascolare. Alcuni Autori hanno evidenziato che il VEGF partecipa in maniera significativa ai processi angiogenetici a livello endometriale ed in particolare alla preparazione dell'endometrio all'impianto e all'invasione del trofoblasto (1, 2).

Recentemente è stato evidenziato un nuovo recettore transmembrana, appartenente alla famiglia dei fattori di crescita endoteliali, che interviene nei processi di proliferazione, differenziazione cellulare e apoptosi, noto come *Notch*. Si riconoscono quattro isoforme (N1-4) funzionalmente correlate, ciascuna delle quali è una proteina transmembrana costituita da una porzione extracellulare con sequenze ripetute *EGF-like* che consentono il legame con due differenti tipi di ligando, *Delta* e *Jagged*, anch'essi proteine transmembrana con sequenze *EGF-like* ripetute. A seguito dell'interazione tra *Notch* con uno dei suoi ligandi si osserva il distacco, per clivaggio proteolitico, del dominio intracellulare (*Notch Intracellular Domain* - NID) che trasloca nel nucleo e modula la trascrizione di vari geni. Insieme ai suoi ligandi, *Notch* è espresso in diversi tessuti umani ed è coinvolto nella neurogenesi, nell'epitogenesi, cancerogenesi e nella vasculogenesi (3). Nostri studi preliminari hanno evidenziato, inoltre, che *Notch-1* è implicato in maniera significativa nel rimodellamento vascolare dell'endometrio fisiologico e patologico (4) mentre altri Autori hanno proposto un suo coinvolgimento nell'impianto (5).

Numerosi studi hanno dimostrato che un'alterazione dell'angiogenesi è responsabile dei difetti di impianto e della mancata progressione della gravidanza (6, 7) in numerose condizioni sia idiopatiche sia secondarie. In particolare nelle pazienti sterili affette da endometriosi è stata dimostrata un'alterazione dell'impianto embrionario che sarebbe responsabile, insieme ad altri fattori, della sterilità (8).

Lo scopo dello studio è quello di valutare l'espressione di *Notch-1* e del VEGF nelle varie fasi del ciclo endometriale (secretiva e proliferativa) di donne affette da endometriosi e da sterilità idiopatica in confronto a controlli sani.

Materiali e metodi

Il campione oggetto del nostro studio è composto di tre gruppi.

Gruppo A. Campioni di endometrio sono stati ottenuti da donne con fertilità confermata dalla presenza nell'anamnesi ostetrica di almeno due gravidanze insorte spontaneamente. Sono state reclutate pazienti con età

compresa tra i 25 e 40 anni che si sottoponevano ad interventi ginecologici per patologia non endometriale. Sono stati raccolti 10 campioni di endometrio in fase proliferativa e 10 campioni in fase secretiva.

Gruppo B. Campioni di endometrio eutopico di donne affette da endometriosi sono stati ottenuti da pazienti di età compresa tra i 25 e 40 anni che si sottoponevano ad interventi di laparoscopia operativa per cisti endometriosa. Sono stati raccolti 5 campioni di endometrio prelevato durante l'intervento eseguito in fase proliferativa e 5 campioni prelevati in fase secretiva durante isteroscopia precedente l'intervento.

Gruppo C. Campioni di endometrio di donne con infertilità inspiegata che si sottoponevano ad isteroscopia diagnostica prima di un ciclo di fecondazione *in vitro*. Abbiamo ottenuto 5 campioni di endometrio in fase proliferativa e 5 campioni di endometrio in fase secretiva per ogni paziente reclutata.

Subito dopo la raccolta, i campioni tissutali, della grandezza di circa 1 cm, sono stati lavati in soluzione fisiologica, per eliminare sangue e coaguli, e fissati in formalina. Per un'adeguata valutazione immunostochimica, le biopsie sono state disidratate attraverso passaggi in diluizioni decrescenti di etanolo e chiarificate in xilene. Così si è potuto procedere all'inclusione in paraffina.

Una volta solidificato il blocchetto, sono state tagliate sezioni di 5 µm, montate su vetrino porta oggetto e asciugate durante la notte a 37°C, in seguito sono state colorate con ematossilina-eosina.

Tutte le sezioni sono state sparaffinate in xilene, reidratate attraverso passaggi in diluizioni di alcool crescenti e successivamente lavate in soluzione salina tamponata con i fosfati (PBS). Le sezioni di tessuto, poste in una camera umida per evitare che andassero incontro ad essiccamento, sono state estinte in perossido di idrogeno per 15 minuti per bloccare le perossidasi endogene. In seguito le sezioni sono state trattate al microonde in tampone citrato (Citrato tribasico, Ac.Citrico, pH6,1) per effettuare lo smascheramento antigenico e successivamente incubate con il PBS-latte in polvere magro al 6% per 1 ora per bloccare i siti aspecifici di legame del tessuto. Sono state, poi, incubate durante la notte a 4°C con gli anticorpi diretti contro *Notch-1* (hamster monoclonale IgG, Upstate), e VEGF (rabbit policlonale IgG, Santa Cruz Biotechnology), usati tutti a diluizione 1:100. Dopo 24 ore le sezioni sono state più volte lavate in PBS per rimuovere l'eccesso di anticorpo e, poi, nuovamente incubate, per 1 ora e a temperatura ambiente, con gli anticorpi secondari (*anti-hamster*, *anti-rabbit*) diluiti 1:200. Di nuovo si sono effettuati più lavaggi in PBS. Tutti i vetrini sono stati processati con il metodo ABC (Vector Laboratories) per 30 minuti. Come cromogeno è stata usata la DAB e come contrastante nucleare l'ematossilina. Per ogni anticorpo usato è stato effettuato un controllo negativo, e un controllo positivo. Ai campioni è sta-

to attribuito un punteggio in base alla percentuale di cellule positive. È stata osservata una media di 25 campi per ogni campione. Tutti i valori sono stati espressi come media \pm errore medio standard (SEM) e le differenze sono state comparate usando il t-test di Student.

Risultati

Attraverso la tecnica immunostochimica abbiamo notato che nell'endometrio fisiologico l'espressione di *Notch-1* è molto marcata a livello delle ghiandole dello stroma e dei vasi sia in fase proliferativa che secretiva; l'espressione del VEGF nei campioni di endometrio fisiologico risulta lieve in fase proliferativa sia a livello stromale che ghiandolare, mentre in fase secretiva risulta moderata in tutte le componenti tissutali (Fig. 1).

Nell'endometrio eutopico di donne con endometriosi per *Notch-1* non si riscontra alcuna espressione né in fase proliferativa né in quella secretiva. In fase proliferativa l'espressione del VEGF risulta intensa a livello ghiandolare; in fase secretiva, invece, l'espressione del VEGF risulta lieve in entrambe le componenti (Fig. 2).

Nell'endometrio di donne con sterilità idiopatica, l'espressione di *Notch-1* è bassa sia in fase proliferativa che in fase secretiva, mostrando un pattern di espressione simile a quello riscontrato nell'endometrio di donne con endometriosi. Anche l'espressione del VEGF, durante la fase proliferativa, è lieve e l'espressione si mantiene bassa in fase secretiva (Fig. 3).

Discussione e conclusioni

L'endometrio va incontro ad una serie di trasformazioni cicliche che lo preparano ad accogliere la blastocisti tra le quali l'angiogenesi è sicuramente un fenomeno cruciale. È ormai noto che il VEGF ha un ruolo importante nell'angiogenesi a livello endometriale per la sua capacità di regolare la crescita vascolare e la permeabilità nella mucosa uterina e della placenta (9). Negli ultimi anni molti Autori hanno evidenziato il ruolo del pathway di *Notch* nel processo angiogenico, in particolare nel rimodellamento vascolare endometriale, dimostrando che esso è espresso ciclicamente nell'endometrio ed è coinvolto nella differenziazione delle cellule endometriali e nell'impianto della blastocisti (5-10). Nostri precedenti studi confermano l'importanza di *Notch* nei processi di proliferazione, differenziazione e apoptosi nella placenta e del suo contributo nell'angiogenesi al fine di garantire l'evoluzione della gravidanza (11). La nostra precedente osservazione di una ridotta espressione di VEGF e di *Notch* in placente di donne con preeclampsia ci suggerisce un ruolo nelle alterazioni della decidualizzazione (12). Da recenti studi è emerso che un'alterazione della vasculogenesi potrebbe essere la causa dei difetti di impianto e di una ridotta *pregnancy rate* (13) sia in condizioni idiopatiche che secondarie ad alcune patologie tra cui l'endometriosi. Secondo alcuni Autori, casi di sterilità inspiegate potrebbero essere causate da alterazioni della funzione endometriale dovute a difetti nell'espressione di fattori angiogenici nella finestra d'impianto

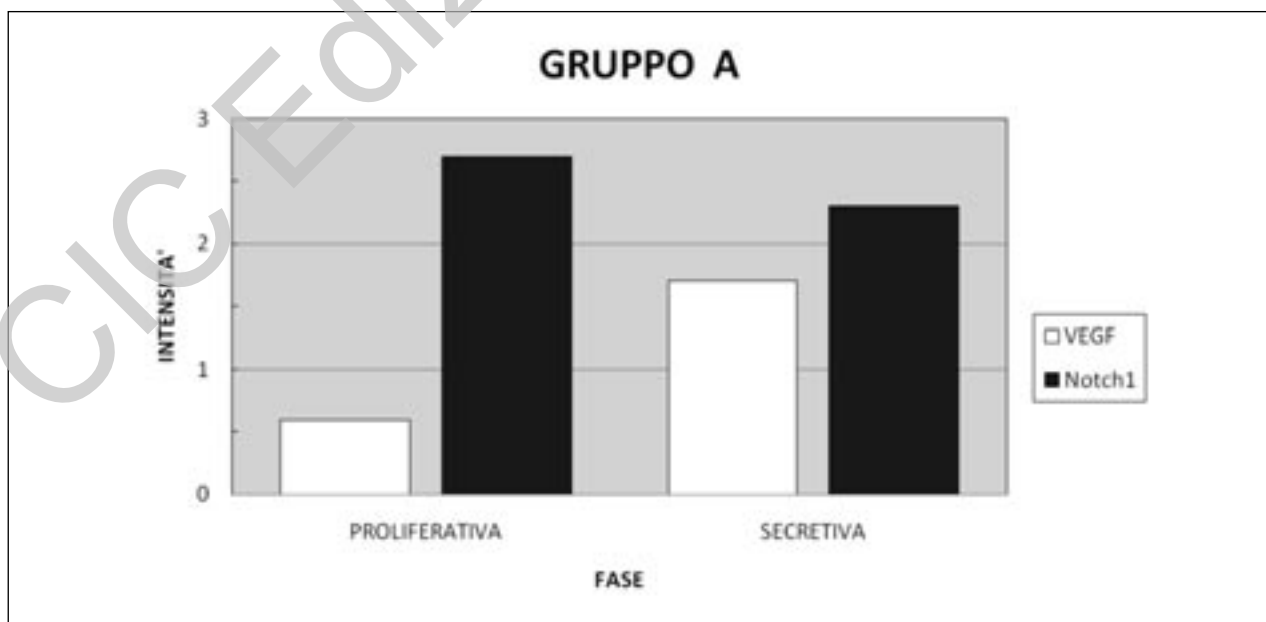


Fig. 1 - Espressione di VEGF e Notch1 nell'endometrio dei controlli sani.

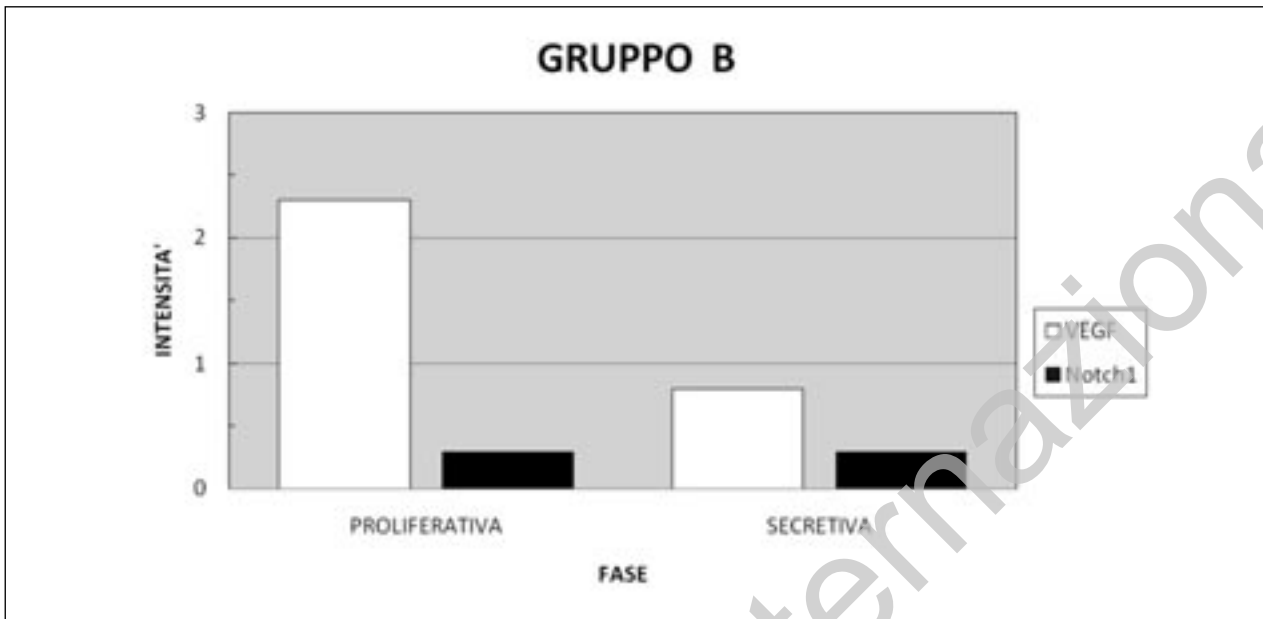


Fig. 2 - Espressione di VEGF e Notch-1 nell'endometrio in donne con endometriosi.

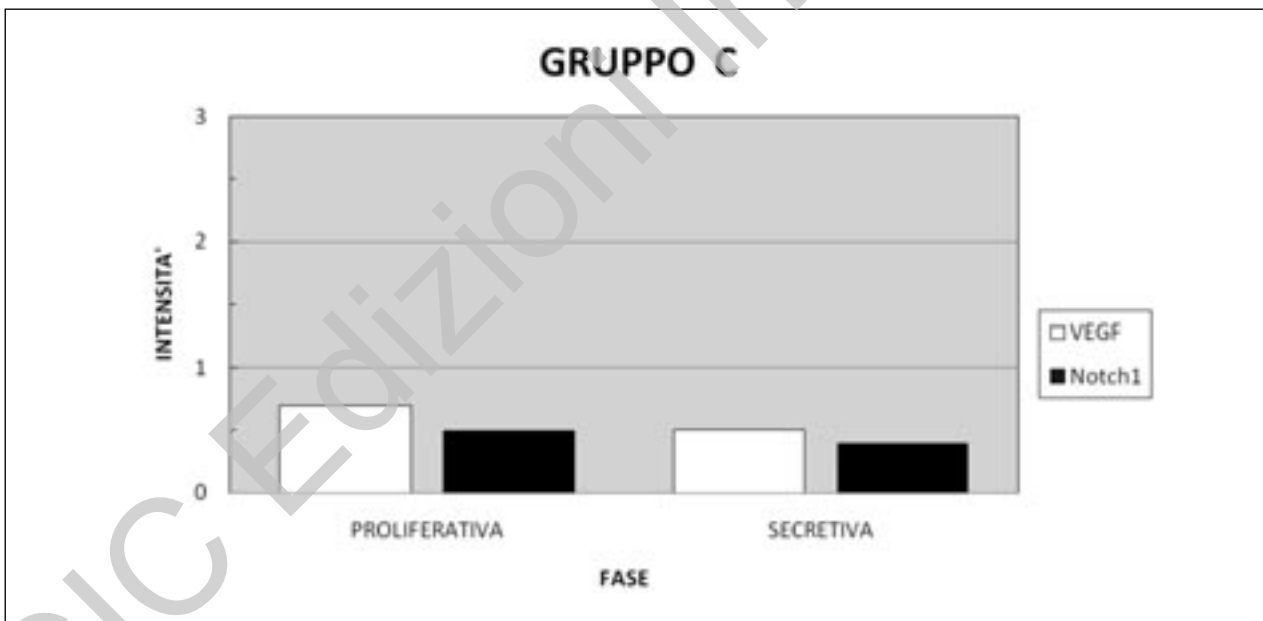


Fig. 3 - Espressione di VEGF e Notch-1 nell'endometrio di donne con sterilità primaria.

(14). Infatti è stato osservato in pazienti affette da endometriosi un'alterata espressione nell'endometrio eutopico delle integrine (15) e di fattori angiogenici tra cui il VEGF (16), a dimostrazione dell'ipotesi di un difetto dell'impianto nella patogenesi della sterilità.

L'importanza dell'angiogenesi e del VEGF nell'impianto è confermata dall'osservazione che un polimorfismo del gene per il VEGF sarebbe un fattore di suscettibilità per difetti di impianto e abortività ricorren-

te (17) e da studi su animali che dimostrano che l'impiego di anticorpi anti-VEGF nel periodo peri-impianto inducono un fallimento dell'impianto e della gravidanza (18).

I dati del nostro studio offrono un nuovo contributo nella comprensione dei meccanismi endometriali potenzialmente coinvolti nella patogenesi della sterilità idiopatica e da endometriosi. L'intensa espressione nell'endometrio fisiologico di *Notch-1*, soprattutto in fase pro-

liferativa, offre la possibilità di confermare i dati di letteratura che ipotizzavano un ruolo per il recettore *Notch-1* nei processi di proliferazione e differenziamento implicati nella decidualizzazione e nell'impianto. I bassi livelli di espressione nell'endometrio eutopico di donne con endometriosi e nell'endometrio di donne con sterilità idiopatica può far ipotizzare che l'alterazione del pathway di *Notch-1* sia implicato nel determinismo di un basso tasso di fertilità che caratterizza queste pazienti, proprio a causa di una deregolazione dei processi di decidualizzazione ed impianto.

L'espressione del VEGF nell'endometrio eutopico di donne con endometriosi è invertita in confronto all'endometrio fisiologico, cioè maggiore in fase proliferativa rispetto alla fase secretiva; dal momento che que-

sta fase è caratterizzata dai processi di differenziamento culminanti nella decidualizzazione, possiamo ipotizzare che la riduzione dell'espressione del VEGF giochi un ruolo rilevante nell'alterazione della fase di preparazione all'impianto. Nelle donne con sterilità idiopatica, l'espressione del VEGF è lieve sia in fase proliferativa che in quella secretiva, dimostrando una potenziale inadeguatezza dell'endometrio di queste donne a sostenere una gravidanza sia in fase di preparazione che in quella d'impianto.

In conclusione i dati del nostro studio suggeriscono un ruolo significativo del pathway di *Notch* nella modulazione del rimodellamento endometriale nei difetti di impianto ed aprono nuove prospettive nello studio della sterilità primaria ed associata ad endometriosi.

Bibliografia

1. Nardo LG. Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005 Aug;17(4):419-23. Review
2. Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simón C. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S2-9. Review.
3. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. *Science*. 1999 Apr 30;284(5415):770-6.
4. Cobellis L, Caprio F, Trabucco E, Mastrogiacomo A, Coppola G, Manente L, Colacurci N, De Falco M, De Luca A. *The pattern of expression of Notch protein members in normal and pathological endometrium*. *J Anat*. 2008 Oct;213(4):464-72. Epub 2008 Aug 4.
5. J. Mazella, S. Liang, L. Tseng. *Expression of Delta-Like Protein 4 in the Human Endometrium*. *Endocrinology*. 2008 January; 149(1): 15-19.
6. Plaisier M, Dennert I, Röst E, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, Helmerhorst FM. *Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions*. *Hum Reprod*. 2009 Jan;24(1):185-97. Epub 2008 Oct 14.
7. Smith SK. *Regulation of angiogenesis in the endometrium*. *Trends Endocrinol Metab*. 2001 May-Jun;12(4):147-51. Review.
8. Giudice LC, Telles TL, Lobo S, Kao L. *The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to discovery*. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Mar;955:252-64; discussion 293-5, 396-406. Review.
9. Torry DS, Torry RJ. *Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta*. *Am J Reprod Immunol*. 1997 Jan;37(1):21-9.
10. Mikhailik A, Mazella J, Liang S, Tseng L. *Notch ligand-dependent gene expression in human endometrial stromal cells*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 23;388(3):479-82. Epub 2009 Jul 14.
11. De Falco M, Cobellis L, Giraldi D, Mastrogiacomo A, Perna A, Colacurci N, Miele L, De Luca A. *Expression and distribution of notch protein members in human placenta throughout pregnancy*. *Placenta*. 2007 Feb-Mar;28(2-3):118-26.
12. Cobellis L, Mastrogiacomo A, Federico E, Schettino MT, De Falco M, Manente L, Coppola G, Torella M, Colacurci N, De Luca A. *Distribution of Notch protein members in normal and pre-clampsia-complicated placentas*. *Cell Tissue Res*. 2007 Dec;330(3):527-34. Epub 2007 Oct 23.
13. Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, Torry RJ. *Angiogenesis in implantation*. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Jul;24(7):303-15.
14. Achache H, Revel A. *Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation*. *Hum Reprod Update*. 2006 Nov-Dec;12(6):731-46. Epub 2006 Sep 18.
15. Lessey BA. *Implantation defects in infertile women with endometriosis*. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Mar;955:265-80; discussion 293-5, 396-406. Review.
16. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. *Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility*. *Endocrinology*. 2003 Jul;144(7):2870-81.
17. Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB. *Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and implantation failure*. *Reprod Biomed Online*. 2008 May;16(5):720-3.
18. Douglas NC, Tang H, Gomez R, Pytowski B, Hicklin DJ, Sauer CM, Kitajewski J, Sauer MV, Zimmermann RC. *Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse*. *Endocrinology*. 2009 Aug;150(8):3845-54. Epub 2009 Apr 30.