

**Programa de Doctorado 290F. Obstetricia y Ginecología II.**

**Facultad de Medicina y Odontología**

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología.**



**“Efectos del tratamiento con agonistas dopaminérgicos  
sobre las lesiones endometriósicas”**

**Tesis doctoral presentada por:  
Silvia Tamarit Bordes, Licenciada en Medicina**

**Director de tesis:**

Profesor Antonio Pellicer Martínez

**Co-Directores:**

Dr José Bellver Pradas

Dr Raúl Gómez Gallego

**Valencia, 2014**



Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Jose Bellver Pradas, Doctor en Medicina y Profesor Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Raúl Gómez Gallego, Doctor por la Universidad de Valencia e Investigador Postdoctoral del Programa Miguel Servet en el instituto Universitario IVI/INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: *Efectos del tratamiento con agonistas dopaminérgicos sobre las lesiones endometriósicas* ha sido realizado íntegramente por Dña. Sílvia Tamarit Bordes bajo su supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 21 de Julio de 2014.

Fdo. Antonio Pellicer Martínez

Fdo José Bellver Pradas

Fdo Raúl Gómez Gallego



## **AGRADECIMIENTOS.**

Al profesor Pellicer, mi maestro desde el inicio en esta profesión, por idear este trabajo y permitirme trabajar en él. Por ser mi modelo a alcanzar, por sus conocimientos infinitos, por saber alentarme en los momentos de cansancio, por sus consejos, su mente incansable, la ilusión transmitida por la labor investigadora. Te estaré eternamente agradecida.

A Raúl Gómez. Por ser la persona más brillante que he conocido, la mente más clara, incansable en el trabajo. Mil gracias por tu ayuda, sin ti esta tesis no hubiese sido posible. Te admiro muchísimo.

A José Bellver, por su ayuda y apoyo en este trabajo. Por sus consejos y guía.

A Antonio Abad, por ser mis manos en este proyecto. Por su profesionalidad, su sencillez, su humildad. Por enseñarme en mis primeros pasos en quirófano, por inculcarme su serenidad y aplomo, por transmitirme la pasión por la cirugía. Por sus consejos fuera del quirófano. Porque este trabajo es también suyo.

A Francisco Delgado, por su colaboración inestimable en este proyecto. Por las mañanas de trasiego con tubos y muestras, con sus sustillos incluidos.

A todos mis compañeros de la UCSI, por su paciencia infinita. Por ayudarme en todo sin interponer un “pero”. Por llevar a cabo esa labor tan fantástica y hacer que todos, médicos y enfermos, nos sintamos tan bien en sus manos.

A mis compañeros del Peset, por ser mi segunda familia, mi segunda casa. Por toda la amistad que allí acumulo, todo lo que de allí he aprendido y sigo aprendiendo.

A Gemma, por ser mi avanzadilla en esta profesión. Por sus consejos, siempre prácticos y útiles, por estar siempre ahí para cualquier duda, problema. Mi apoyo en los casos difíciles, al otro lado de la mesa. Por ser el espejo en el que mirarme.

A Miguel, por sus consejos, su ayuda, su apoyo en los momentos difíciles. Por estar siempre ahí cuando se le necesita, sin condiciones. Por todo lo que me ha enseñado y me sigue enseñando.

A mi familia, mi hermano Nando por su practicidad e inteligencia, por su confianza en mi; y sobretodo a mis padres, por su capacidad de esfuerzo y entrega a sus hijos, por darnos todo a cambio de nada, por su afán en ofrecernos todas las oportunidades, por permitirme ser lo que soy. Por ser los mejores padres del mundo.

A Carlos, por su apoyo incondicional, por creer en mi más que yo misma, por su demostración de amor diario, por ser mi otra mitad, sin la que me sentiría perdida. Por compartir conmigo lo mejor que me podría haber dado la vida. T'estime molt.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
1.1.- Concepto.....	17
1.2.- Definición histórica de la endometriosis.....	17
1.3.- Epidemiología.....	17
1.3.1 Factores de riesgo asociados.	
1.3.2 Implicaciones sociales de la endometriosis.	
1.4.- Localización e histología de las lesiones.....	20
1.4.1 Localización de las lesiones.	
1.4.2 Características histológicas macroscópicas.	
1.4.2.1. Lesiones peritoneales.	
1.4.2.1.1 Lesiones rojas (lesiones atípicas).	
1.4.2.1.2 Lesiones negras (lesiones típicas).	
1.4.2.1.3 Lesiones blancas.	
1.4.2.2. Endometriosis ovárica.	
1.4.2.2.1 Focos superficiales.	
1.4.2.2.2 Endometriomas.	
1.4.2.3. Endometriosis infiltrante profunda.	
1.4.2.3.1. Compartimento anterior.	
1.4.2.3.2. Pared pélvica lateral.	
1.4.2.3.3. Compartimento posterior.	
1.4.3 Características histológicas microscópicas.	
1.4.3.1 Componente glandular.	
1.4.3.2 Componente estromal.	
1.5.- Clasificación de la endometriosis.....	23
1.6.- Etiopatogenia de la endometriosis.....	26
1.6.1 Hipótesis etiopatogénicas clásicas.	
1.6.1.1 Teoría de la implantación por menstruación retrógrada.	
1.6.1.2 Teoría de la metaplasia celómica.	
1.6.1.3 Teoría del trasplante mecánico.	
1.6.1.4 Teoría de la disfusión linfática y hematógena.	
1.6.1.5 Teoría de los restos embrionarios.	
1.6.2 Factores asociados al desarrollo de la enfermedad.	
1.6.2.1 Alteraciones del sistema inmunológico.	
1.6.2.2 Influencia endocrina.	
1.7.- Diagnóstico.....	32
1.7.1 Clínica.	
1.7.1.1 Dolor pélvico crónico.	
1.7.1.2 Hemorragia uterina disfuncional.	
1.7.1.3 Esterilidad.	
1.7.1.4 Otros síntomas dependientes de la localización de los implantes.	
1.7.1.4.1 Síntomas urinarios.	
1.7.1.4.2 Síntomas intestinales.	
1.7.1.4.3. Síntomas pleurales y pulmonares.	
1.7.1.4.4. Sintomatología de la pared abdominal.	
1.7.2 Exploración física ginecológica.	

1.7.3 Técnicas diagnósticas no invasivas	
1.7.3.1 Técnicas de imagen.	
1.7.3.1.1 Ecografía transvaginal.	
1.7.3.1.2 Ecografía transrectal.	
1.7.3.1.3 Ultrasonografía endoscópica rectal.	
1.7.3.1.4 Resonancia magnética.	
1.7.3.2 Marcadores bioquímicos.	
1.7.3.2.1 Marcadores tumorales y polipéptidos.	
1.7.3.2.1.1 Ca 125 en suero.	
1.7.3.2.1.2 Ca 19.9 en suero.	
1.7.3.2.1.3 sICAM en suero.	
1.7.3.2.1.4 Proteína placentaria 14 en suero.	
1.7.3.2.2 Marcadores inmunológicos.	
1.7.3.2.2.1 Citoquinas en suero.	
1.7.3.2.2.2 Anticuerpos antiendometriales en suero.	
1.7.3.2.2.3 Autoanticuerpos para marcadores de estrés oxidativo.	
1.7.3.2.3 Marcadores en tejido endometrial.	
1.7.3.2.3.1 Aromatasa P450.	
1.7.3.2.3.2 Receptores hormonales.	
1.7.3.2.3.3 Inmunohistoquímica de fibras nerviosas.	
1.7.4 Técnicas diagnósticas invasivas	
1.7.4.1 Laparoscopia.	
1.8.- Tratamiento de la endometriosis.....	44
1.8.1 Tratamiento expectante.	
1.8.2 Tratamiento quirúrgico.	
1.8.2.1 Cirugía conservadora laparoscópica o laparotómica.	
1.8.2.2 Cirugía agresiva o histerectomía.	
1.8.3 Tratamiento farmacológico.	
1.8.3.1 Tratamiento médico sintomático. Antiinflamatorios no esteroideos. (AINES).	
1.8.3.2 Tratamientos farmacológicos hormonales de uso clínico.	
1.8.3.2.1 Anticonceptivos orales combinados (ACO).	
1.8.3.2.2 Progestágenos.	
1.8.3.2.3 Danazol.	
1.8.3.2.4 Gestrinona.	
1.8.3.2.5 Análogos de la GnRH.	
1.8.3.3 Tratamientos farmacológicos hormonales experimentales.	
1.8.3.3.1 Antagonistas de la GnRH.	
1.8.3.3.2 Inhibidores de la aromatasa.	
1.8.3.3.3 Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs)	
1.8.3.3.4 Moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SPRMs)	
1.8.3.4 Tratamientos no hormonales.	
1.8.3.4.1 Fármacos hipolipemiantes.	
1.8.3.4.2 Bifosfonatos.	
1.8.3.4.3 Fármacos inmunomoduladores.	
1.8.3.4.4 Bloqueo del Factor Nuclear KappaB (FN-kB).	
1.8.3.4.5 Terapias antiangiogénicas.	
1.8.3.4.5.1 Inhibidores selectivos de la COX-2.	
1.8.3.4.5.2 Té verde.	
1.9.- Vasculogénesis y angiogénesis.....	62
1.9.1 Angiogénesis y endometriosis.	



1.9.2 Factores implicados en la angiogénesis.	
1.10.- Factor de crecimiento del endotelio vascular.....	65
1.10.1 Papel del VEGF y sus receptores en la angiogénesis.	
1.10.2 Endometriosis y VEGF.	
1.10.2.1 Expresión del VEGF en el endometrio eutópico.	
1.10.2.2 Expresión del VEGF en el endometrio ectópico.	
1.10.2.3 Expresión del VEGF en el líquido peritoneal.	
1.10.3 Inhibidores comerciales del sistema VEGF y sus limitaciones para el potencial uso terapéutico en endometriosis.	
1.10.4 Búsqueda de inhibidores no tóxicos del VEGF/VEGFR2 para el tratamiento de la endometriosis: El ejemplo del SHO.	
1.10.5 Evidencias sobre los efectos de la dopamina y sus análogos en la regulación del sistema VEGF/VEGFR2.	
1.10.6 Uso de agonistas dopaminérgicos en modelos animales de endometriosis.	
1.11.- Dopamina y análogos.....	77
1.11.1 Dopamina y sus receptores.	
1.11.2 Hiperprolactinemia y endometriosis. Posibilidades terapéuticas.	
1.11.3 Restricción en el uso de agonistas dopaminérgicos.	
1.11.4 Justificación del diseño experimental y del uso de la Quinagolida como agonista dopaminérgico en nuestro trabajo.	
<b>2.- HIPÓTESIS.....</b>	<b>85</b>
<b>3.- OBJETIVOS.....</b>	<b>89</b>
3.1.- Objetivo primario.....	91
3.2.- Objetivos secundarios.....	91
<b>4.- MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>93</b>
4.1.- Diseño del estudio.....	95
4.1.1 Criterios de inclusión.	
4.1.2 Criterios de exclusión.	
4.1.3 Etapas del estudio.	
4.2.- Diseño experimental del estudio.....	101
4.2.1 Obtención de muestras para control interno del estudio.	
4.2.1.1 Obtención y procesamiento del tejido endometrial.	
4.2.1.2 Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas.	
4.2.2 Determinación del tamaño de las lesiones mediante laparoscopia.	
4.2.3 Obtención y procesamiento de muestras de lesiones peritoneales.	
4.2.3.1 Procesado de las muestras obtenidas por laparoscopia.	
4.3.- Metodología empleada.....	106
4.3.1 Análisis serológico.	
4.3.2 Análisis macroscópico.	
4.3.3 Análisis microscópico.	
4.3.3.1 Preparación de las muestras.	
4.3.3.1.1 Fijación.	

4.3.3.1.2 Inclusión en parafina.	
4.3.3.1.2.1 Deshidratación	
4.3.3.1.2.2 Aclaramiento o diafanización.	
4.3.3.1.2.3 Impregnación en parafina y formación del bloque.	
4.3.3.1.3 Obtención de cortes histológicos.	
4.3.3.2 Análisis histológico.	
4.3.3.2.1 Tinción histológica con hematoxilina y eosina.	
4.3.3.3 Análisis inmunohistoquímico de los implantes endometriósicos.	
4.3.3.3.1 Procesos inmunohistoquímicos comunes.	
4.3.3.3.2 Uso de anticuerpos primarios para el análisis de los parámetros inmunohistoquímicos de interés.	
4.3.3.3.3 Protocolo de revelado de la señal inmunohistoquímica.	
4.3.3.3.4 Protocolo de revelado inmunofluorescente.	
4.3.3.3.5 Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico/inmunofluorescente.	
4.3.4 Análisis molecular.	
4.3.4.1 Extracción del ARN mensajero (ARNm).	
4.3.4.2 Retrotranscripción o transcripción reversa (RT).	
4.3.4.3 PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real (RT-QF-PCR).	
4.4.- Análisis estadístico.....	123
<b>5.- RESULTADOS.....</b>	<b>125</b>
5.1.- Proceso de reclutamiento, efectos secundarios del tratamiento y hallazgos laparoscópicos.....	127
5.1.1 Pacientes incluídas.	
5.1.2 Efectos secundarios.	
5.1.3 Hallazgos laparoscópicos.	
5.2.- Control interno y seguimiento.....	131
5.2.1 Biopsias endometriales.	
5.2.2 Determinación de prolactina: cumplimentación del tratamiento.	
5.3.- Cambios macroscópicos: efectos del tratamiento sobre el número, tamaño y morfología de las lesiones.....	134
5.4.- Cambios histológicos.....	139
5.4.1 Cambios histológicos.	
5.4.2 Cambios inmunohistoquímicos.	
5.4.2.1 Vascularización.	
5.4.2.2 Proliferación celular.	
5.4.2.3 Madurez de los vasos sanguíneos.	
5.4.2.4 Expresión del DrD2.	
5.4.2.5 Expresión y activación del VEGF/VEGFR2	
5.5.- Resultados del PCR Superarray de genes implicados en la inflamación y la vascularización en tejido procedente de las lesiones endometriósicas.....	152
<b>6.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>155</b>
<b>7.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>173</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>176</b>

## **LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS**

- ACO: Antoconceptivos Combinados Orales.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AEM: Agencia Estatal del Medicamento.
- AFS: American Fertility Society.
- AGGF1: Angiogenic factor with G patch and FHA domains.
- AINE: Aintinflamatorio No Esteroideo.
- AMP-c: Adenosín Mono-Fosfato Cícico.
- Ang 1: Angioeptina 1.
- ARN: Ácido Ribonucleico.
- ASRM: American Society of Reproductive Medicine.
- Alfa-SMA: alfa-actina del músculo liso.
- BHCG: Gonadotropina Coriónica Humana.
- BSA: Albúmina Sérica Bovina.
- Cb2: Cabergolina.
- CCL2: Quimioquina Ligando 2.
- CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica.
- CHMP: Committee for medical products for human use.
- COX-2: Ciclooxygenasa 2.
- CXCL10: C-X-C motif chemokine.
- DA: Dopamina.
- DOPA: Dihidroxifenilalanina.
- DrD2: Receptor tipo 2 de la Dopamina.
- E1: Estrona 1.
- EDO: Esterilidad de origen desconocido.
- EGCG: Epigallocatequina galato.
- EMA: European Medicines Agency.

EPA: Ácido Eicosapentaenoico.

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embriology.

FN-KB: Factor Nuclear KappaB.

FSH: Hormona folículo estimulante.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.

HMG-CoA: 3 hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A.

IL-6: Interleuquina 6.

LH: Hormona luteinizante.

MIF: Factor Inhibidor de la migración de macrófagos.

MIP-1 $\alpha$ : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha.

MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein 2.

MMP13, MMP10, MMP8: Metaloproteinasas de matriz 13, 10, 8.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDTC: Pirridolina Ditiocarbamato.

PFA: paraformaldehído.

PGE2: Prostaglandina E2.

PIF: Factor Inhibidor de la Prolactina.

PIGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PP14: Proteína placentaria 14.

PRL: Prolactina.

RM: Resonancia Magnética.

RT: Transcripción reversa.

RUNX1: Runt-related transcription factor 1.

SERMs: Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos.

SHO: Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.

sICAM: soluble Intercellular Adhesion Molecule 1.

SPRMs: Moduladores Selectivos de los Receptores de Progesterona.

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha.

UCSI: Unidad de Cirugía sin Ingreso.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento del endotelio Vascular).

VEGFR2: Receptor tipo 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular.

VEGF-A: Factor de Crecimiento del endotelio vascular tipo A.

5HT2b: 5-hidroxitriptamina 2b.



## **1. INTRODUCCIÓN**





## **1.1. Concepto.**

La endometriosis se define como la presencia de glándulas y estroma endometrial funcionales fuera de la cavidad uterina. Se trata de un proceso invasivo, no neoplásico, caracterizado por la existencia de endometrio ectópico, que se halla fundamentalmente ubicado en el peritoneo, el ovario y en el septo recto-vaginal, y en raros casos en el diafragma, pleura, vejiga y pericardio (Speroff y Fritz, 2006).

## **1.2. Definición histórica de la endometriosis.**

La endometriosis fue descrita por primera vez por el anatomopatólogo austríaco Karl Freiherr von Rokitanski en el año 1860 (Rokitansky, 1860). Más tarde, en 1896, otros autores como Von Recklinghausen describieron la lesión aunque con diferente terminología en función de su localización y extensión (Speroff y cols, 1999).

En 1921, John Albertson Sampson, médico norteamericano, comenzó una serie de publicaciones sobre la enfermedad, acuñando el término “endometriosis” para describir las lesiones peritoneales que consideró al principio siembras procedentes de enfermedad en el ovario (Sampson, 1921). En los siguientes años, desarrolló la teoría de la “menstruación retrógrada”, como la causa más probable de la endometriosis (Sampson, 1927), y desde entonces muchos han sido los trabajos dirigidos a avanzar en el conocimiento de esta patología.

## **1.3. Epidemiología:**

El promedio de edad en el momento del diagnóstico de la endometriosis varía entre los 25 y los 30 años (Kuohung y cols, 2002).

La incidencia real de la endometriosis se desconoce, ya que la enfermedad se presenta en muchas mujeres de forma asintomática. Se calcula que afecta del 3 al 10% de las mujeres

en edad reproductiva (Cramer y Missmer, 2002). Se presenta en el 50 al 60% de mujeres y adolescentes con dolor pélvico, y en más del 50% de mujeres con infertilidad (Goldstein y cols, 1980; Eskenazi y cols, 1997), lo que la sitúa en el primer lugar de los problemas ginecológicos benignos (Gazvani y cols, 2002). También se puede presentar en forma de hemorragias uterinas disfuncionales y, cuando las lesiones se manifiestan en órganos o tejidos atípicos (por ejemplo vejiga, colon, piel, etc.), van acompañadas de síntomas propios asociados a dicha localización.

Como se ha mencionado anteriormente la endometriosis se desarrolla de forma asintomática en el 50% de los casos. Es por ello que a menudo se detecta en el curso de cirugías por motivos ajenos a la sospecha de esta patología. No es raro, por tanto, detectar la enfermedad en el 7 al 15% en mujeres que se realizan ligadura tubárica vía laparoscópica (Barbieri, 1990), por ejemplo. En este sentido un estudio del grupo de Matorras ha sugerido que la prevalencia de esta enfermedad podría llegar a ser incluso del 32% en mujeres asintomáticas y supuestamente sanas (Matorras y cols, 2001).

### **1.3.1. Factores de riesgo asociados.**

Algunos factores de riesgo que se han asociado a un aumento en la prevalencia de endometriosis son: la menarquia temprana, los ciclos menstruales cortos, la duración de la regla mayor a 5 días, así como un gran consumo de alcohol y cafeína (Cramer y Missmer, 2002).

En cambio, el ejercicio físico regular y el tabaquismo pueden disminuir el riesgo de padecer endometriosis (Cramer y Missmer, 2002). Asimismo, el riesgo de endometriosis está inversamente relacionado con el número de embarazos a término, pero el efecto protector de la gestación disminuye con el tiempo, y el riesgo aumenta con el número de años desde el último parto (Moen, 1991). En mujeres estériles, la prevalencia de la endometriosis se correlaciona con el índice de masa corporal (Bérubé y cols, 1998).

### **1.3.2. Implicaciones sociales de la endometriosis:**

La endometriosis ocasiona una alteración en la calidad de vida de las pacientes sintomáticas, disminuyéndola considerablemente e interfiriendo en el desarrollo de su

actividad habitual, principalmente como consecuencia del dolor asociado a la misma, dismenorrea o síntomas específicos derivados de la enfermedad. En ocasiones estos síntomas pueden llegar a ser tan profundos hasta el punto de resultar incapacitantes (D’Hooghe T y cols, 2006).

Incluso en pacientes no sintomáticas a priori, no debemos olvidar que la endometriosis constituye una causa importante de infertilidad en el grupo de mujeres en edad fértil (Goldstein y cols, 1980; Eskenazi y cols, 1997).

Por otra parte, esta enfermedad tiene implicaciones importantes en términos económicos. En los Estados Unidos, se estima que, en 2002, el coste derivado del diagnóstico de endometriosis y el tratamiento del dolor y la infertilidad asociados a ésta, ascendió a 22 billones de dólares (Simoens y cols, 2007). Por tanto los costes económicos que produce serían tanto en pérdida de productividad laboral de las pacientes como en el gasto que repercute sobre el sistema nacional de salud empleado en el diagnóstico de la enfermedad y manejo de sus síntomas.

En definitiva, la endometriosis es una patología que despierta un gran interés científico e investigador. Se trata de una entidad todavía llena de controversias, como el conocimiento de su verdadera incidencia, su etiopatogenia, o sus distintas formas anatomopatológicas que han hecho sugerir entidades diferentes por algunos autores. Asimismo, despierta un gran interés la búsqueda de un elemento diagnóstico no invasivo de la enfermedad que nos permita predecir y tratar precozmente a las pacientes. Siendo como es un enfermedad progresiva, es de suma importancia su conocimiento precoz con el fin de evitar un empeoramiento por el retraso en el diagnóstico. Por último, existe un eterno debate entre tratamiento médico y quirúrgico, el cual ha sido motivo de numerosos trabajos. Para los investigadores ha supuesto un objetivo fundamental hallar el abordaje farmacológico capaz de tratar la enfermedad y disminuir las recidivas, tratando de maximizar el uso de los tratamientos médicos y así evitar los tratamientos quirúrgicos de repetición fomentados por el carácter recidivante de esta patología.

## **1.4. Localización e histología de las lesiones.**

### **1.4.1. Localización de las lesiones:**

La endometriosis puede localizarse en cualquier parte del aparato genital y también en localizaciones extragenitales como ligamentos redondos, úterosacos, anchos, fondos de saco vesicouterinos, espacio de Douglas, septo rectovaginal (Dmowski y cols, 1984) y en lugares alejados de la pelvis como pericardio, intestino, vejiga y pleura (Jenkins y cols, 1986). La localización más frecuente es la ovárica, frecuentemente bilateral, y la peritoneal, sobretodo ligamentos uterosacos, fondo de saco de Douglas y plica vesicouterina (Calderay y cols, 2003).

### **1.4.2. Características histológicas macroscópicas:**

Existen tres tipos fundamentales de lesiones endometriósicas en función de la localización principal de sus focos como son lesiones peritoneales, ováricas e infiltrantes, que se diferencian tanto en su sintomatología como en su evolución y manejo. Así mismo dentro de cada localización podemos encontrar diferentes tipos de lesiones atendiendo a su localización, grado de actividad o extensión, tal y como se describe a continuación:

**1.4.2.1. Lesiones peritoneales:** se han descrito tres tipos de lesiones a este nivel que se clasifican atendiendo a su antigüedad y grado de actividad en:

**1.4.2.1.1. Lesiones rojas (lesiones atípicas):** lesiones “en llama”, recientes o activas. Se trata de lesiones glandulares, peritoneo petequiral y/o áreas de hipervascularización principalmente en peritoneo de ligamentos anchos y úterosacos

**1.4.2.1.2. Lesiones negras (lesiones típicas):** lesiones antiguas o poco activas, de color negro o azulado que aparecen como resultado de la retención de los pigmentos de la sangre, proporcionando un color oscuro a la parte interna del tejido (Nisolle y cols, 1990). Están formadas por glándulas,

estroma, tejido cicatrizal y derbis intraluminal.

**1.4.2.1.3. Lesiones blancas:** se trata de lesiones peritoneales gruesas, de aspecto blanco y opaco debido a la fibrosis que las constituyen, y que presentan un contorno irregular estelar impreciso. En estas fibrosis, los elementos glandulares son poco frecuentes y tienen una apariencia poco activa. Son lesiones que corresponden a zonas cicatriciales de lesiones activas anteriores (Donnez y cols, 1991).

**1.4.2.2. Endometriosis ovárica:**

**1.4.2.2.1. Focos superficiales:** al igual que las lesiones peritoneales, las lesiones situadas en la superficie del ovario pueden tener una apariencia macroscópica atípica con lesiones marrones, lesiones rojas, depósitos parduscos y adherencias en la superficie del ovario (Nisolle y cols, 1993).

**1.4.2.2.2. Endometriomas:** formaciones quísticas de tamaño variable, también llamados “quistes de chocolate”, que aparecen como resultado de la acumulación de material tras hemorragias repetidas (Donnez y cols, 1991).

**1.4.2.3. Endometriosis infiltrante profunda:**

**1.4.2.3.1. Compartimento anterior:** nódulos localizados en pared vesical (Kovoor y cols, 2010) o ligamentos redondos. (Crispi y cols, 2012)

**1.4.2.3.2. Pared pélvica lateral:** afectando uréteres (Chapron y cols, 2010), plexos nerviosos hipogástricos, espina ciática, ligamento sacroespinoso, y en ocasiones nervios profundos de la pelvis como el ciático o el pudendo (Ceccaroni y cols, 2011).

**1.4.2.3.3. Compartimento posterior:** ligamentos uterosacros (Bonte y cols, 2002; Chapron y cols, 2001), parametrios (Ceccaroni y cols,

2012), vagina (Dadlwal y cols, 2012), recto y tabique rectovaginal (Jalenc y cols, 2012; Ruffo y cols, 2012).

También puede encontrarse en localizaciones extrapélvicas como intestino delgado (Fernández-Rey y cols, 2009), sigma, ciego y apéndice (Abrao y cols, 2010; Cirillo y cols, 2008)

### **1.4.3. Características histológicas microscópicas:**

A nivel microscópico, la endometriosis se caracteriza por la presencia de endometrio con sus dos componentes tisulares: glándulas y estroma, en una localización ectópica (Speroff, 2006) y con unas características peculiares, que comentaremos a continuación.

**1.4.3.1. Componente glandular:** son frecuentemente irregulares y el aspecto funcional de éstas es variable. A veces sufren cambios cíclicos semejantes al endometrio normal y otras veces recuerdan a la capa basal del endometrio sin sufrir cambios secretores (Bergqvist y cols, 1984).

**1.4.3.2. Componente estromal:** el epitelio que recubre las glándulas puede sufrir cambios de tal manera que sea difícil su identificación, basando entonces el diagnóstico en la aparición de estroma de aspecto endometrial. La hemorragia intersticial es común en la endometriosis. La irritación química y mecánica en los tejidos provoca proliferación de fibroblastos, produciendo fibrosis alrededor de la lesión (Schweppe y cols, 1981).

Existe un tipo de lesiones que conocemos como **endometriosis estromal** que presentan una particularidad, y es que están formadas por pequeños nódulos o placas de estroma endometrial sin glándulas. Esta histología se acompaña la mayoría de ocasiones, aunque no siempre, por


tejido endometriósico típico formado por glándulas y estroma. Este tipo de tejido endometriósico se ha hallado en cérvix y ovario, y también en el peritoneo pélvico (endometriosis estromal micronodular) (Boyle and McCluggage, 2009).

### **1.5. Clasificación de la endometriosis.**

En el año 1985 la American Fertility Society (AFS) publicó un sistema de la clasificación de la endometriosis basado en a) la valoración intraoperatoria de la extensión peritoneal y ovárica, b) las adherencias tubáricas y ovárica, y c) el grado de obliteración del Espacio de Douglas. Esta clasificación diferenciaba las lesiones superficiales y las profundas, así como la laxitud de las mismas. A cada tipo de lesión se le asignaba una puntuación típica (score) atendiendo a cada uno de los criterios enunciados y la suma de las puntuaciones obtenidas en cada apartado generaba un total con el que se clasificaba a la endometriosis en diferentes estadios (American Fertility Society, 1985).

La AFS se convierte en 1995 en la American Society of Reproductive Medicine (ASRM) y un año después modifica la clasificación (ASRM, 1997), incluyendo las características macroscópicas morfológicas (rojo, blanco o negro) de las lesiones ováricas y peritoneales y su respectiva proporción. A partir de entonces se convierte la clasificación más utilizada y aceptada mundialmente .

Atendiendo a los criterios mencionados y sistema de puntuaciones la clasificación de la ASRM de la endometriosis incluye cuatro estadios posibles: I (mínimo, cuando se obtiene una puntuación total entre 1 y 5), II (leve, cuando la puntuación total asignada se encuentra entre 6 y 15), III (moderado, cuando la puntuación obtenida esta entre 16 y 40), IV (severo, cuando la puntuación es mayor de 40) (Fig 1).



**SOCIEDAD AMERICANA SOCIETY PARA MEDICINA REPRODUCTIVA  
CLASIFICACION REVISADA DE ENDOMETRIOSIS**

Nombre paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Grado I (Minimal) - 1-5      Laparoscopia \_\_\_\_\_ Laparotomia \_\_\_\_\_ Fotografia \_\_\_\_\_  
 Grado II (Hold) - 6-15      Tratamiento recomendado \_\_\_\_\_  
 Grado III (Moderate) - 16-40  
 Grado IV (Severe) - >40  
 Total \_\_\_\_\_ Pronóstico \_\_\_\_\_

PERITONEO	ENDOMETRIOSIS	< 1 cm	1-3 cm	>3 cm
		Superficial	1	2
	Profundo	2	4	6
OVARIO	D Superficial	1	2	4
	Profundo	4	16	20
	I Superficial	1	2	4
	Profundo	4	16	20
POSTERIOR SACO DE DOUGLAS OBLITERACION		< Parcial	Completo	
		4	40	
OVARIO	ADHESIONES	< 1/2 Cierre	1/2 - 3/4 Cierre	> 3/4 Cierre
	D Transparente	1	2	4
	Opaco	2	8	16
	I Transparente	1	2	4
	Opaco	4	8	16
	TROMPA	D Transparente	1	2
Opaco		4*	8*	16
I Transparente		1	2	4
Opaco		4*	8*	16


\*Si las fimbrias de las trompas de falopio están completamente adheridas, se cambia el punto asignado a 16.  
 Indicar la aparición de implantes superficiales tipo rojo[(R), rojo, rojo-rosa, tipo llama, gota vesicular, vesículas claras], blancas [(W), opacificaciones, defectos peritoneales, amarillo-marrón], o negros [(B) negras, depósitos de hemosiderinas, azul]. Indicar el porcentaje total descrito como R \_\_\_% B \_\_\_% and N \_\_\_%. El total debe ser igual al 100%.

Endometriosis Adicional: \_\_\_\_\_ Patología asociada: \_\_\_\_\_


\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Para ser usado con Trompas y Ovarios normales



Para ser usado con Trompas y/o Ovarios Anormales



**Figura 1.** Clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) para el estadiaje de la endometriosis. 1997.



No obstante, la clasificación de la ASRM presenta ciertas limitaciones. En general hay que reseñar que se trata de una clasificación subjetiva, de difícil evaluación, que permite un puntaje arbitrario según el observador y carente de correlación clínica y evolutiva. Además no se correlaciona con el pronóstico reproductivo de las pacientes. No incluye las lesiones microscópicas ni las subperitoneales, ni realiza una evaluación cuantitativa de la afectación de otras estructuras pélvicas o extrapélvicas (Koninckx y cols, 1992). Las lesiones profundas pueden infraestadiarse al considerarse sólo su superficie. Tampoco valora la adenomiosis. Por ello, desde la aparición de ésta han surgido muchos otros intentos de clasificar la endometriosis tratando de salvar sus limitaciones, de los cuales destacamos a continuación los más importantes.

Chapron y colaboradores, en el 2003 realizaron un estudio retrospectivo con 241 pacientes diagnosticadas de endometriosis profunda, observando una distribución predominante en el compartimento posterior: ligamentos úterosacros (58%), vagina (18%), intestino (16%) y en menor proporción en el compartimento anterior: vejiga (8%). Clasificaron la endometriosis profunda en función de su localización y la asocian al tipo de procedimiento quirúrgico que se puede utilizar para su resolución (Chapron y cols, 2003).

En el 2005 se introduce la clasificación de ENZIAN, que divide la severidad de la endometriosis en 4 grados y 3 compartimentos: (a) vagina y fondo de saco, (b) ligamentos úterosacros y ligamento cardinal y, (c) intestino. Es muy útil y complementa la clasificación revisada de la AFS al permitir una mejor descripción de las lesiones y la participación de estructuras retroperitoneales.

Haas y colaboradores diseñaron un estudio retrospectivo que incluyó 219 pacientes con endometriosis y utilizaron para valorar el grado de afección la clasificación de la AFS y de ENZIAN. Observaron que 58 pacientes clasificadas por la AFS como endometriosis profunda, no cumplían los criterios de la clasificación de ENZIAN, así utilizando este nuevo sistema se podría reducir hasta un 36% los casos de endometriosis profunda (IC 95: 29% - 44%) (Haas, 2011).

En 2010, Adamson y Pasta publicaron un índice de fertilidad-endometriosis (IFE) basado en un estudio prospectivo con una muestra de 801 pacientes. El objetivo era valorar la tasa de predicción de embarazos, posterior a la cirugía de endometriosis. Incluyeron 275

variables de las que 4 se consideraron significativas según un análisis estadístico de regresión proporcional de Cox: duración de la infertilidad, antecedente de embarazo previo, menor puntuación funcional y malformaciones uterinas. Concluyeron que este índice es una herramienta clínica sencilla y de utilidad para predecir la tasa de embarazo en pacientes con infertilidad que han tenido una estadificación quirúrgica de la endometriosis (Adamson, 2010).

Aún así, la clasificación revisada de la ASRM, pese a sus imperfecciones, constituye en la actualidad el instrumento más adecuado para estandarizar y concretar criterios unánimes en el tratamiento y pronóstico evolutivo de esta enfermedad, siendo por ello la más utilizada.

## **1.6. Etiopatogenia de la endometriosis.**

La endometriosis es una enfermedad cuya etiología y patogenia son desconocidas. Existen varias teorías para explicar la génesis de la endometriosis, aunque ninguna de ellas logra dar una explicación global al origen de esta enfermedad. Parece ser que, independientemente de la localización, es probablemente un problema multifactorial (Fig 2). Entre las teorías más prevantes para explicar el origen de la enfermedad destacamos las siguientes

### **1.6.1. Hipótesis etiopatogénicas clásicas.**

#### **1.6.1.1. Teoría de la implantación por menstruación retrógrada.**

La teoría de la implantación fue descrita por Sampson en 1921, y postula el paso retrógrado de tejido endometrial durante la menstruación desde el útero a través de las trompas hasta su llegada a la cavidad peritoneal donde se depositaría en los órganos abdominopélvicos (Sampson, 1927).

Esta teoría es, en la actualidad, la de mayor aceptación, y está apoyada en varias observaciones: la distribución de las lesiones en la cavidad abdominal, sobretudo en aquellas localizaciones que reciben mayor cantidad de flujo menstrual retrógrado: ovarios, fondo de saco de Douglas y ligamentos

úterosacros (Jenkins y cols,1986); por la alta prevalencia de endometriosis en niñas con obstrucción congénita del tracto de salida al flujo menstrual (Sanfilippo y cols, 1986); por la comprobación de la viabilidad del endometrio del flujo menstrual en líquido peritoneal, con capacidad de implantación y crecimiento, demostrada en cultivos celulares (Keetel y Stein,1951; Koks y cols,1997) y por la inducción de endometriosis en experimentos animales mediante fístulas uteropélvicas artificiales (Te Linde y Scott, 1950) o forzando un flujo menstrual retrógrado al crear una obstrucción anterógrada (D’Hooghe y cols, 1994). Además, un estudio reciente demuestra la capacidad del endometrio de adherirse a la superficie mesotelial del peritoneo (Witz y cols, 1999).

Sin embargo, se ha demostrado que el flujo menstrual retrógrado existe en el 90% de las mujeres pero sólo de un 2% a 5% de estas mujeres desarrollan esta patología, por lo que quizás la cuestión principal a considerar no sería explicar el por qué existe menstruación retrógrada sino el porqué unas mujeres son capaces de eliminar los restos de endometrio y otras no permitiendo la implantación de los focos y desarrollo de la enfermedad.

#### **1.6.1.2. Teoría de la metaplasia celómica.**

Según esta teoría, el endometrio ectópico aparece como consecuencia de transformaciones patológicas en el epitelio germinativo y del peritoneo pélvico inducidos por estímulos inflamatorios o endocrinos. Esta teoría fue propuesta en 1898 por Iwanoff, elaborada por Meyer (1924) y sugerida por Dreifus (1940) y Kretschmer (1945). Está basada en el hecho que casi la totalidad del epitelio genital representa distintos grados de diferenciación del epitelio celómico, razón por la cual su poder de diferenciación frente a estímulos externos es enorme.

Explicaría la aparición de endometriosis en cualquier lugar de la cavidad abdominal y de la pleura (Foster y cols, 1981; Elliot y cols, 1985; Honore, 1999), casos de endometriosis en la etapa prepuberal (Clark, 1948),

endometriosis en mujeres que jamás han menstruado (El Mahgoub y cols, 1980), y aparición de endometriosis en hombres (Honore, 1999).

Sin embargo, aunque esta teoría es útil para explicar las localizaciones infrecuentes de la endometriosis y no existe una evidencia sólida para descartarla, es deficiente. Ni la teoría de la metaplasia celómica ni la teoría de la implantación consiguen dar una explicación a la aparición de tejido endometrial a nivel umbilical (Blumenthal, 1981; Michowitz y cols, 1983), pleural o pulmonar (Balasingham y cols, 1986; Suginami y cols, 1985; Wilkins y cols, 1985).

#### **1.6.1.3. Teoría del trasplante mecánico.**

El trasplante directo inadvertido de tejido endometrial en el momento de una cesárea, intervención quirúrgica pélvica y reparación de una episiotomía constituyen la causa más probable de la endometriosis observada en cicatrices quirúrgicas y periné (Taff y cols, 2002).

#### **1.6.1.4. Teoría de la difusión linfática y hematógena.**

La teoría de la difusión linfática es la más aceptada para explicar endometriosis en localizaciones lejos del peritoneo.

El hallazgo de endometriosis retroperitoneales y en localizaciones extraperitoneales (Halban, 1924) ha permitido plantear la posibilidad de que la difusión linfática junto con la hematógena de las células endometriósicas puede representar otra vía por medio de la cual se produce la diseminación e implantación de los focos a distancia. Más tarde, Sampson describía la aparición de tejido endometriósico en pacientes con adenomiosis (Sampson, 1925).

La comunicación linfática entre todos los órganos de la pelvis es extensa y la diseminación hematógena fue demostrada experimentalmente en 1940 inyectando intravenosamente endometrio en conejos y obteniendo como resultado una endometriosis pulmonar (Hobbs y Bortnick, 1940).

#### **1.5.1.5 Teoría de los restos embrionarios.**

La teoría de los restos celulares embrionarios propuesta por Von Recklinghausen en 1896 propone que el sistema del conducto de Wolff en desarrollo puede dejar tras de sí pequeños grupos o restos de células que tienen la capacidad de desarrollar tejido endometrial funcionante. Esta hipótesis no ha podido ser documentada.

### **1.6.2. Factores asociados al desarrollo de la enfermedad.**

Ninguna de las teorías anteriormente expuestas explica todos los tipos de endometriosis, ni todos los casos. Los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares asociados a la endometriosis ha mejorado el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad que hasta ahora teníamos gracias a las teorías clásicas, dando nuevas explicaciones a su génesis y posterior desarrollo. A continuación veremos los factores más importantes que pueden asociarse a la aparición de endometriosis.

#### **1.6.2.1. Alteraciones del sistema inmunológico.**

Varios estudios sugieren una asociación entre la presencia de endometriosis y alteraciones del sistema inmunológico tanto a nivel celular como humoral. Esta idea partió de estudios realizados sobre monos Rhesus a quien se suprimió el sistema inmune, apareciendo más frecuentemente endometriosis que en el grupo control (Wood y cols, 1983).

En las pacientes con endometriosis se ha visto un aumento en la actividad y número de macrófagos en el líquido peritoneal y como consecuencia un aumento de citoquinas, las cuales participan activamente en la génesis y progresión de esta enfermedad (Tasuku, 2001). Se ha demostrado una elevación de los linfocitos T totales (CD 3+), T cooperadores (CD 4+), *Natural Killer* (CD 16+) y de los monocitos/macrófagos (CD 14+) en los estadios I y II de endometriosis (Hill y cols, 1988). También se ha identificado la presencia del componente C3 del complemento, así como autoanticuerpos IgG e IgA

frente al tejido ovárico y endometrial en suero y secreciones vaginales y cervicales de mujeres con endometriosis (Mathur y cols, 1982). Además, se ha comprobado una disminución de la citotoxicidad frente a las células endometriales atribuible a un defecto de las células “natural Killer” (NK). (Oosterlynck y cols, 1991).

Neutrófilos y macrófagos promueven la angiogénesis en etapas iniciales de endometriosis, y las quimoquinas y citoquinas liberados por éstos (“Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha” (MIP-1 $\alpha$ ), “Macrophage Inflammatory Protein 2” (MIP-2), interleuquina 6 (IL-6), “Tumor Necrosis Factor alpha” (TNF $\alpha$ ), y “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF)) amplifican el estímulo angiogénico para el crecimiento del tejido endometriósico (Yiu-Jiuan Lin, 2006). Se ha demostrado que las concentraciones de IL-6 son más altas en las células estromáticas endometriales de las pacientes afectadas que en las mujeres sanas (Tseng, 1996; Martinez y cols, 2007). Asimismo, existe un aumento de la actividad de la ciclooxigenasa-2, con el consiguiente aumento en la actividad aromatasa.

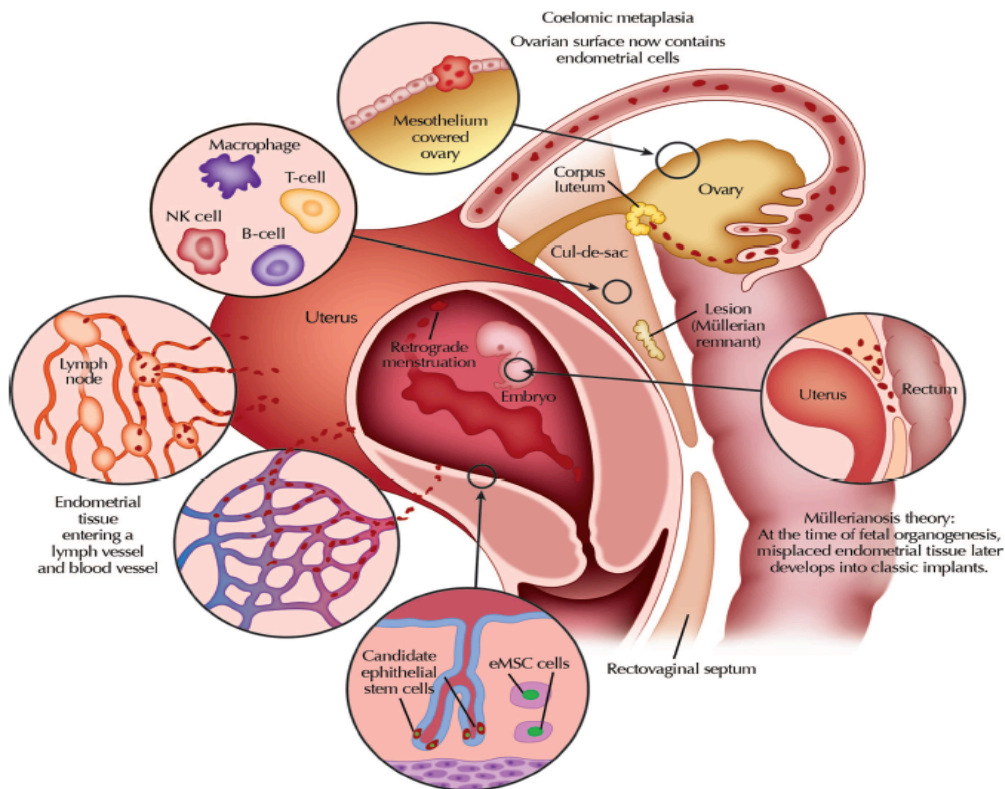
Por tanto, a pesar de que el 90% de las mujeres en general presentan menstruación retrógrada, sólo un 6-10% desarrollan endometriosis. Éstas serían las que tienen alguna disfunción inmunitaria que impide su aclaramiento normal y promueve su adhesión e invasión, la neoangiogénesis y la inervación sensorial, simpática y parasimpática. Finalmente esto conllevaría a la progresión de la enfermedad (Falcone y Lebovic, 2011) (Fig 3).

#### **1.6.2.2. Influencia endocrina.**

El estrógeno constituye un factor determinante para el desarrollo de endometriosis. En la mujer, la síntesis de estrógenos corre a cargo, principalmente, de los ovarios; no obstante, se sabe que muchos tejidos periféricos producen estrógenos por medio de la aromatización de los andrógenos ováricos y adrenales. Se ha mostrado que los implantes endometriósicos expresan aromatasa y 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

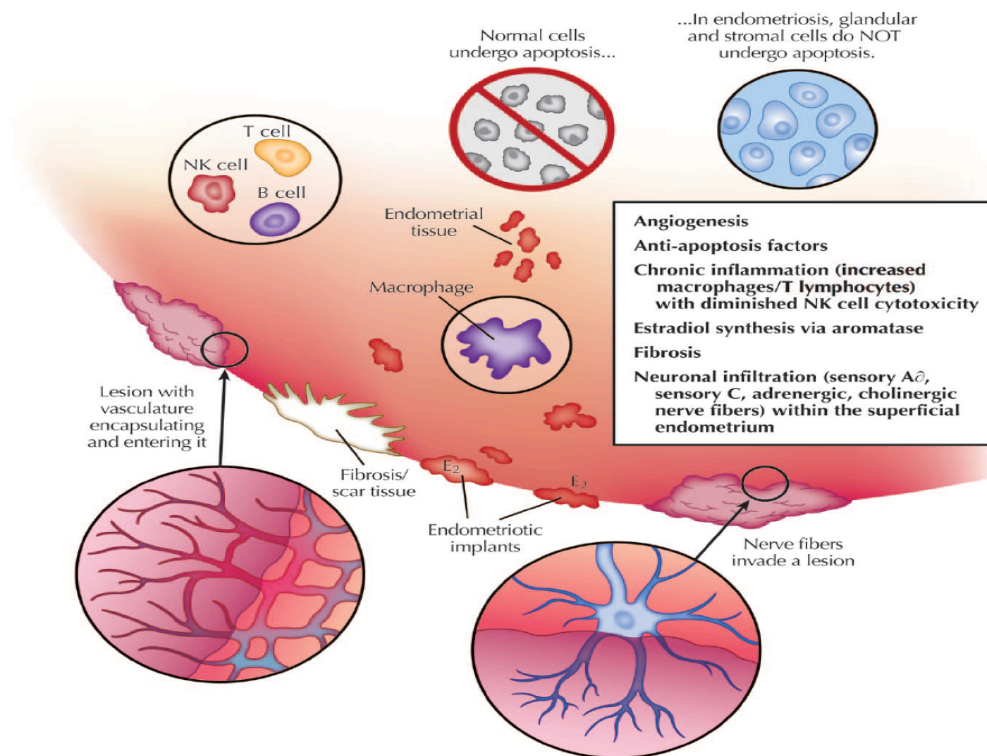
de tipo 1 (HSD17B1), enzimas implicadas en la conversión de androstendiona en estrona (E1) y E1 en estradiol, respectivamente. No obstante, carecen de 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 (HSD17B2), la cual inactiva los estrógenos (Bulun, 2000). Esta combinación enzimática garantiza la exposición de los implantes a un ambiente estrogénico ( Serafini, 2011).

Así, podría considerarse que la endometriosis es un proceso multifactorial (Olive y cols, 1993), en el que además podrían intervenir factores genéticos (Treloar, 2005; Daftary, 2004; Bischoff, 2000), el estrés oxidativo (Kajihara, 2011, Ngo, 2009) y la exposición a tóxicos ambientales (Rier, 2003). Sin embargo, a pesar de conocer sus diferentes mecanismos patogénicos, seguimos sin conocer cuál sería el mecanismo desencadenante inicial.



**Fig 2.** Mecanismos fisiopatológicos de la endometriosis. Empezando desde abajo, en el sentido de las agujas del reloj: 1) Las células del epitelio endometrial, las células mesenquimales del estroma o las “stem-like cells” evitan los mecanismos de aclaramiento, y atacan e invaden localizaciones ectópicas; 2) y 3): Extensión metastásica de tejido endometrial via linfática y vascular; 4) Alteraciones en la inmunidad celular y humoral; 5) Diferenciación metaplásica del epitelio celómico del ovario; 6) Tejido endometrial retrógrado que coloniza un cuerpo lúteo; 7) Remanente Mülleriano en septo recto-vaginal; 8) Hipotesis Mülleriana del tejido endometrial fetal, migrado durante la organogénesis.

(Tomado de Falcone, 2011).



**Fig 3.** Mecanismos moleculares que predisponen al desarrollo de la endometriosis. Tomado de Falcone, 2011.

## 1.7. Diagnóstico.

### 1.7.1. Criterios Clínicos.

La sospecha diagnóstica nos llega de la clínica de la paciente, aunque la endometriosis es a menudo un hallazgo en mujeres asintomáticas que se someten a cirugía por otros motivos sin sospechar la existencia de nódulos endometriósicos (Barbieri, 1990).

Los síntomas más frecuentes son la esterilidad y la dismenorrea (Goldstein y cols, 1980; Eskenazi y cols, 1997). Otras manifestaciones clínicas frecuentes son las hemorragias fuertes e irregulares, y dependiendo de la zona afectada se presentan trastornos intestinales, dolor abdominal, dispareunia ( dolor con las relaciones sexuales) , disquecia (dolor al defecar) y disuria (dolor al orinar) .



#### **1.7.1.1. Dolor pélvico crónico.**

La endometriosis se trata de un estado hiperalgésico resultado del aumento de la percepción del dolor que es originada vía médula espinal y cerebral a partir de la información sensorial procedente de las lesiones y otras áreas. Las fibras nerviosas periféricas que inervan las lesiones pueden sensibilizar las neuronas del segmento espinal y, en algunas ocasiones, del sistema nervioso central, dando lugar a una respuesta dolorosa central exagerada, independientemente de la exéresis de las lesiones (Bajaj y cols, 2003; Asante y Taylor, 2011; Stratton y Berkley, 2011).

Cursa como dismenorrea (dolor durante la menstruación) (50-90% de las pacientes con endometriosis), y/o dolor crónico acíclico (57-68%), así como dispareunia (25-40%) (Speroff y Fritz, 2006). Se describe como un dolor difuso y profundo en la pelvis, central, que puede referirse a la zona de la espalda, muslos o acompañarse así mismo de presión rectal, náuseas, disquécia y diarrea episódica (Davis y cols, 1993).

Como se ha mencionado, no se ha observado una relación constante entre el grado y la intensidad del dolor y el estadio y la localización de la endometriosis (Vercellini, 1996; Fedele, 1992; Chapron y cols, 2003).

#### **1.7.1.2. Hemorragia uterina disfuncional.**

Se puede presentar como *spotting* premenstrual, aunque se han descrito todos los tipos de patrones menstruales, encontrando desde ciclos menstruales normales hasta alteraciones por exceso en cualquiera de sus variantes, o por defecto. Su origen parece residir en la disfunción ovulatoria que se asocia a la endometriosis.

#### **1.7.1.3. Esterilidad.**

La asociación entre endometriosis y esterilidad viene avalada por la prevalencia de esta patología en pacientes con esterilidad primaria, entre un

26-45% y esterilidad secundaria entre un 12-25%, frente al 3-10% de la población general.

La enfermedad severa tiene un efecto negativo, de índole mecánico, cuando compromete a ovarios y produce adherencias que bloquean la movilidad tubárica o provocan su oclusión. Además, estas mujeres pueden tener una reserva ovárica disminuida independientemente de la edad, como han demostrado algunos estudios (Hock y cols, 2001; Azem y cols, 1999; Lemos y cols, 2008).

Sin embargo, la relación entre endometriosis mínima y leve y esterilidad es todavía incierta. Entre los posibles mecanismos causantes de la esterilidad aún en estadios precoces de la enfermedad, se encuentra una respuesta inmunitaria exagerada o un ambiente peritoneal hostil que produce daños en el ADN espermático (Mansour y cols, 2009) o en el citoesqueleto del ovocito (Mansour y cols, 2010). También se ha propuesto como causa de infertilidad en casos leves la alteración de los marcadores de la implantación endometrial (Kao y cols, 2002; Wei y cols, 2009; Matsuzaki y cols, 2010).

La fecundación *in vitro* nos ha permitido observar una calidad disminuida en los embriones obtenidos en las pacientes con endometriosis (Pellicer y cols, 1995; Brizek y cols, 1995) y esto sería responsable en gran parte de la baja tasa de implantación asociada a estas pacientes (Simón y cols, 1994; Pellicer y cols, 1994; Sung y cols, 1997). La calidad embrionaria viene determinada por alteraciones en el ovocito secundarias a alteraciones en la foliculogénesis y del medio ambiente paracrino y autocrino intrafolicular que sufren las pacientes con endometriosis (Pellicer y cols, 1998; Garrido y cols, 2000).

#### **1.7.1.4. Otros síntomas dependientes de la localización de los implantes.**

**1.7.1.4.1. Síntomas urinarios:** La endometriosis en la vejiga o del uréter puede ser causa de disuria, hematuria y obstrucción ureteral (Donnez y cols, 2000).

- 1.7.1.4.2. Síntomas intestinales:** La afectación del colon, del intestino delgado o del apéndice puede explicar la existencia de síntomas semejantes a los del colon irritable, tenesmo perimenstrual, disquecia, hematoquecia, síntomas obstructivos o incluso apendicitis (Yantiss y cols, 2001).
- 1.7.1.4.3. Síntomas pleurales y pulmonares:** La endometriosis pleural y pulmonar es rara y puede manifestarse en forma de dolor torácico pleural o hemoptisis durante la menstruación y menos frecuentemente como derrame pleural o neumotórax postmenstruales (Rychlik y Bieber, 2001).
- 1.7.1.4.4. Sintomatología de la pared abdominal:** El canal inguinal y el tejido subumbilical pueden ser dolorosos y presentar tumefacción e incluso sangrado como consecuencia de endometriosis. Los implantes endometriósicos en las cicatrices de cesáres y episiotomías pueden dar lugar a nódulos dolorosos (Brenner y Wohlgemuth, 1990).

## **1.7.2. Exploración física ginecológica**

La exploración ginecológica va encaminada a detectar la presencia de nódulos o implantes en el aparato genital. Se recomienda realizar el examen durante la menstruación, cuando tiene su máxima sensibilidad diagnóstica, pero incluso entonces una exploración normal no excluye el diagnóstico (Koninckx y cols, 1996).

Dentro de los hallazgos exploratorios que nos van a sugerir la presencia de endometriosis destacamos:

- Dolor a la movilización uterina y ovárica
- Sensibilidad aumentada en los ligamentos úterosacros
- Nódulos palpables en ligamentos úterosacros y/o masas anexiales
- Movilidad disminuida de útero y/o anejos.

Existen pocos trabajos que evalúen la capacidad predictiva de la exploración pélvica. En ellos se recoge una sensibilidad del 76% y especificidad del 73% para una exploración positiva considerada como dolor o nodularidad en ligamento úterosacro y/o fondo de saco de Douglas, lesiones vaginales endometriósicas, masas ováricas fijas o dolorosas, útero fijo y dolor a la movilización uterina (Eskenazi y cols, 2001).

### **1.7.3. Técnicas diagnósticas no invasivas:**

#### **1.7.3.1. Técnicas de imagen**

##### **1.7.3.1.1. Ecografía transvaginal**

La ecografía transvaginal posee un alto grado de exactitud en el diagnóstico de los endometriomas, con una sensibilidad del 75-84% y una especificidad del 99% (Mais y cols, 1993; Guerreiro y cols, 1995; Bazot y cols, 2003). En cambio es, insuficiente para el diagnóstico de los implantes peritoneales. Tiene una capacidad de diagnóstico similar a la resonancia magnética en los casos de endometriosis profunda (Somigliana y cols, 2010), y es la prueba de imagen de elección cuando tenemos sospecha de su existencia. También se demuestra útil en el diagnóstico de la endometriosis vesical si el tamaño de las lesiones es suficiente (Fedele y cols, 1997), ya que con un tamaño menor de 5-10 mm resulta ineficaz (Bazot y cols, 2003).

El uso del Doppler pulsado no mejora los resultados de la ecografía transvaginal (Alcázar y cols, 1997).

##### **1.7.3.1.2. Ecografía transrectal**

Utilizada sobretodo en el diagnóstico de la endometriosis profunda en el área de los utero-sacos, tabique recto-vaginal o recto.

La endometriosis profunda es definida por la presencia de nódulos hipoecogénicos con o sin contorno regular. En condiciones normales, la

muscularis intestinal es hipoecogénica, mientras que se distingue de la mucosa y de la submucosa por que estas son hiperecogénica; la presencia de nódulos hipoecogénicos sugerentes de endometriosis nos informará sobre la profundidad de la enfermedad. Del mismo modo, nos ayudará a determinar la longitud de la extensión de los implantes, y la relación de estos con el margen anal, dato fundamental para plantear cirugía.

La limitación de la ecografía rectal en el diagnóstico de la endometriosis profunda es conocida. Los ligamentos úterosacos en condiciones normales no son visibles, para detectarlos por ecografía rectal es necesario que se encuentren aumentados de tamaño, teniendo una sensibilidad de 70.6% - 80% (Banerjee y cols, 2008)

#### **1.7.3.1.3. Ultrasonografía endoscópica rectal**

Se trata de una prueba de imagen que combina dos de las técnicas más utilizadas para el estudio del aparato digestivo: la ecografía y la endoscopia. Los transductores de los ecoendoscopios permiten visualizar la pared intestinal y estructuras adyacentes. Está recomendada por algunos autores (Chapron y Dubuisson, 2001) para identificar lesiones en tabique rectovaginal y ligamento úterosacro. La ventaja que presenta sobre la ecografía transvaginal es que nos permite determinar con exactitud la distancia entre la lesión y el margen anal, así como su profundidad en la pared rectal. No es válida para el diagnóstico de endometriomas ni lesiones en la pelvis anterior. (Bazot y cols, 2003).

#### **1.7.3.1.4. Resonancia magnética**

La resonancia magnética (RM) tiene una sensibilidad y especificidad comparable a la ecografía transvaginal para el diagnóstico de los endometriomas (Guerreiro y cols, 1995), como antes se ha comentado. Estudios más recientes sugieren que puede diagnosticar endometriosis profunda que afecte a los ligamentos úterosacos, la vejiga, y el saco de

Douglas pero carece de sensibilidad para detectar endometriosis rectal sin distensión del recto (Kinkel y cols, 1999).

### **1.7.3.2. Marcadores biológicos.**

Debido a que las técnicas de diagnóstico no invasivo no son concluyentes en el diagnóstico de la endometriosis (sobre todo en los estadios tempranos de la enfermedad), y a que la técnica por excelencia en dicho diagnóstico, y que describiremos posteriormente una técnica quirúrgica de alto coste y riesgos asociados, en los últimos años se está realizando un gran esfuerzo en la búsqueda de biomarcadores que permitan el desarrollo de pruebas no invasivas para la detección precoz. En este sentido, las nuevas tecnologías de cribado molecular, como la citogenética, genómica, proteómica y microarrays de genes/proteínas están siendo ampliamente utilizadas para la identificación de biomarcadores candidatos, tal y como se detalla a continuación .

#### **1.7.3.2.1. Marcadores tumorales y polipéptidos.**

##### **1.7.3.2.1.1. CA-125 en suero**

CA-125 es un antígeno de la superficie celular hallado en tejidos derivados del epitelio celómico embrionario, entre los que está el endometrio, y es un marcador útil para controlar el carcinoma ovárico epitelial (Schutter y cols, 2002; Bast y cols, 1983).

Desde mediados de los años 80 se conoce la asociación entre niveles elevados en suero de CA-125 y la presencia de endometriosis moderada y severa (Barbieri y cols, 1986), pero su baja sensibilidad ha sido comprobada en sucesivos estudios (Bianchi y cols, 2003).

La principal variable de confusión en la determinación de la sensibilidad y especificidad del CA 125 en suero es el propio estadiaje de la enfermedad, siendo menor en estadios más precoces (Mol y cols, 1998;

Gagné y cols, 2003). Como marcador aislado no está indicado para la detección de pacientes con endometriosis mínima y leve. La baja sensibilidad impide usarlo como prueba diagnóstica al disminuir dramáticamente su valor predictivo positivo. Por lo tanto, el CA 125 no puede ser defendido como arma diagnóstica de endometriosis en pacientes con dolor pélvico crónico o infertilidad.

El *cut-off* usado en la mayor parte de los estudios es de 35 U/mL, el utilizado en la detección del cáncer de ovario epitelial.

Sin embargo, la monitorización de los niveles de CA-125 desde el momento del diagnóstico, cuando se hallen elevados, puede ser útil para el seguimiento de la enfermedad y la aparición de recidivas, ya que se ha observado la disminución de dichos niveles tras el tratamiento médico y quirúrgico (Pittaway, 1997; Chen y cols, 1998). No obstante, los niveles suprimidos durante el tratamiento médico con frecuencia retornan a las concentraciones anteriores inmediatamente después de interrumpido el tratamiento, lo que limita su utilidad clínica (Franssen y cols, 1992).

Es importante destacar que los niveles de CA 125 pueden estar aumentados en el principio del embarazo, en la enfermedad inflamatoria pélvica aguda, neoplasia ovárica, miomas y menstruación, por lo que se recomienda hacer la extracción fuera del periodo menstrual (Pittaway y Fayez, 1987; Hornstein y cols, 1992).

#### **1.7.3.2.1.2. CA 19.9 en suero**

El CA 19.9 es una glicoproteína de alto peso molecular que se halla elevada en pacientes con tumores ováricos malignos y benignos (Ye y cols, 1994), incluidos los endometriomas (Imai y cols, 1998). Los niveles de CA19.9 en mujeres con endometriosis disminuyen significativamente tras el tratamiento cuando se comparan con los niveles basales previos

(Matalliotakis y cols, 1998), pero la utilidad clínica del CA 19.9 no es superior a la del CA 125.

**1.7.3.2.1.3. sICAM-1 (Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1) en suero.**

La forma soluble de ICAM-1 es secretada por el endometrio y los implantes endometriósicos (Viganó y cols, 2000). Además, el endometrio de mujeres con endometriosis secreta mayor cantidad de esta molécula que el de mujeres sin la enfermedad. Consecuentemente, existe una fuerte relación entre los niveles de sICAM-1 vertidos por el endometrio y el número de implantes endometriósicos en la pelvis, pudiendo suponer entonces que el sICAM-1 es útil en el diagnóstico de la endometriosis.

La sensibilidad y especificidad del sICAM-1 para el diagnóstico de la endometriosis profunda es del 19% y 97% respectivamente, superior a la presentada por el CA 125 (14% y 92%, respectivamente) según un estudio realizado por Somigliana (Somigliana y cols 2002). Cuando los dos marcadores eran usados concomitantemente, la sensibilidad y especificidad era del 28% y 92%, respectivamente, concluyendo que la medida de CA125 y sICAM-1 puede ser de utilidad para identificar a mujeres con endometriosis profunda infiltrante.

**1.7.3.2.1.4. Proteína placentaria 14 en suero (PP-14)**

La proteína placentaria 14 en suero (PP14) ha sido encontrada en pacientes con endometriosis significativamente más elevada que en las pacientes control sanas (Telimaa y cols, 1989). Los niveles bajaron significativamente tras la cirugía o el tratamiento médico con danazol y medroxiprogesterona. Su habilidad para el diagnóstico de endometriosis está limitada por su baja sensibilidad (59%).

**1.7.3.2.2. Marcadores inmunológicos**



**1.7.3.2.2.1. Citoquinas en suero.**

Bedaiwy y cols en 2002 midieron la concentración en sangre y líquido peritoneal de 6 IL distintas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-13 y TNF- $\alpha$ ) en un grupo mujeres que fueron sometidas a una laparoscopia por dolor, infertilidad, o esterilización tubárica voluntaria. Sólo la IL-6 en sangre y el TNF- $\alpha$  en líquido peritoneal resultaron discriminativos entre pacientes con o sin endometriosis.

En un estudio realizado por Martinez (Martinez y cols 2007), se demostró que los niveles en suero de IL-6 estaban aumentados en pacientes con endometriosis mínima y leve. Además, estos valores no se ven afectados por otras posibles patologías ginecológicas tales como miomas y patología ovárica benigna. El punto de corte para la IL-6 en suero se estableció en 25,75 pg/ml con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 83,3%. El uso combinado de dos puntos de corte, 20 y 35 pg/ml, permitía conseguir mejores resultados predictivos para endometriosis mínima y leve. A la luz de estos resultados, la IL-6 podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de la endometriosis mínima y leve. Así, pacientes con esterilidad de origen desconocido con niveles aumentados de IL-6 en suero podrían beneficiarse de una laparoscopia temprana para confirmar la existencia de endometriosis y tratarla.

**1.7.3.2.2.2. Anticuerpos antiendometriales en suero.**

Algunos investigadores han postulado que los anticuerpos antiendometriales son una probable causa de infertilidad en pacientes con endometriosis (Weed y cols, 1980; Badawy y cols, 1984), mientras que otros están en desacuerdo con esta hipótesis (Dunselman y cols, 1988b).

**1.7.3.2.2.3. Marcadores de estrés oxidativo.**

Se ha visto que los niveles de marcadores de estrés oxidativo se encuentran aumentados significativamente en las mujeres con

endometriosis sin correlación con estadio, síntomas o morfología de las lesiones (Murphy y cols, 1998).

### **1.7.3.2.3. Marcadores en tejido endometrial.**

#### **1.7.3.2.3.1. Aromatasa P 450**

Esta enzima puede ser expresada tanto en endometrio eutópico como en el ectópico de las pacientes con endometriosis pero no en el endometrio eutópico de las mujeres sanas. Sin embargo, el potencial uso de la aromatasa P 450 como herramienta diagnóstica de enfermedad pélvica está limitado por la observación de un importante número de mujeres con endometriosis que no expresan la aromatasa P 450 en su endometrio eutópico (Kitawaki y cols, 1997; 1999).

#### **1.7.3.2.4. Receptores hormonales**

El estudio de los receptores de estradiol y progesterona en sus distintas isoformas en el endometrio ectópico puede usarse como marcador de actividad de las lesiones endometriósicas (Evers y cols, 1993), aunque su determinación en endometrio eutópico para el diagnóstico de endometriosis no parece tener valor.

#### **1.7.3.2.5. Inmunohistoquímica de fibras nerviosas**

Recientemente se ha demostrado la existencia de pequeñas fibras nerviosas sensoriales desmielinizadas tipo C en la capa funcional del endometrio eutópico de mujeres con endometriosis, que, en cambio, no se encuentran en el endometrio de mujeres sanas (Tokushige y cols, 2006). Además, se ha visto que las mujeres con endometriosis tienen una mayor densidad de fibras nerviosas en la capa basal del endometrio y en el miometrio que las mujeres sin endometriosis (Tokushige y cols, 2006). Estas fibras nerviosas también se han encontrado en las lesiones

endometriósicas peritoneales, así como en las lesiones profundas (Wang y cols, 2009), y expresan una gran cantidad de marcadores neuronales: péptido vasointestinal, neuropéptido Y, sustancia P y péptidos relacionados con el gen de la calcitonina (Tokushige y cols, 2006). En 2009, Fraser y colaboradores llevaron a cabo un estudio a doble ciego en el que quedó demostrada la existencia de fibras nerviosas tipo C en la capa funcional del endometrio de mujeres con endometriosis, así como la ausencia de éstas en mujeres sanas, en tejido obtenido por biopsia endometrial, y determinado por técnicas de inmunohistoquímica, con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 83% (Al-Jefout y cols, 2009).

En la siguiente tabla se resumen los biomarcadores descritos hasta este punto.

<b>Marcadores tumorales y polipéptidos</b>	<b>Marcadores en tejido endometrial</b>	<b>Marcadores inmunológicos</b>
1. Ca 125, Ca 19.9	1. Aromatasa P-450	1. Citoquinas: IL-6
2. sICAM	2. Receptores hormonales	2. Anticuerpos antiendometriales
3. PP-14	Inmunohistoquímica de fibras nerviosas	3. Marcadores de estrés oxidativo

**Tabla 1:** *Marcadores de endometriosis.*

#### **1.7.4. Técnicas diagnósticas invasivas.**

##### **1.7.4.1 Laparoscopia**

Dado que las herramientas diagnósticas mencionadas hasta el momento presentan limitaciones para el diagnóstico de la endometriosis mínima y leve, y además no permiten la valoración del verdadero alcance de la enfermedad en las pacientes con endometriomas, el diagnóstico de la enfermedad requiere la

confirmación mediante la visualización directa y/o la biopsia de las lesiones. Por ello, para el diagnóstico definitivo de la endometriosis, la inspección visual de la pelvis por laparoscopia es el “gold standard” de las pruebas diagnósticas (ESHRE, 2005). La laparoscopia nos permite visualizar y magnificar toda la pelvis, así como estadificar la enfermedad según la localización, tipo, y extensión de las lesiones.

Actualmente, el diagnóstico de endometriosis se lleva a cabo, la mayoría de las veces, por la visualización directa de las lesiones sin biopsiarlas, como se describe en algunos estudios (Gagné y cols, 2003; Marcoux y cols, 1997), lo que puede llevar a errores por la gran variedad de lesiones, profundidad y localización. Errores que nos pueden llevar a un sobrediagnóstico de la enfermedad, ya que sólo del 62% al 87% de los casos diagnosticados por cirugía fueron confirmados por las biopsias tomadas en diferentes estudios (Walter y cols, 2001; Stratton y cols, 2003), o bien a una estimación de la extensión de la endometriosis equivocada, asignándoles por diagnóstico visual estadios superiores a los que realmente padecen (Walter y cols, 2001). Si estamos delante de una endometriosis únicamente peritoneal la obtención de una biopsia está todavía en debate: la inspección visual es habitualmente adecuada pero la confirmación histológica de al menos una lesión sería lo ideal (Kennedy y cols, 2005).

## **1.8. Tratamiento de la endometriosis:**

El tratamiento de la endometriosis comprende desde la conducta expectante con control periódico de la paciente, hasta el tratamiento quirúrgico de las lesiones, pasando por el tratamiento médico o farmacológico con múltiples finalidades que comentaremos a continuación. La elección de uno u otro debe ser individualizada en función de la edad, extensión de la enfermedad, duración de la infertilidad, deseo reproductivo de la pareja y severidad de los síntomas.

### **1.8.1 Tratamiento expectante:**

El tratamiento expectante consiste en el seguimiento periódico ambulatorio de la paciente con endometriosis. Aunque no se encuentra consensuado, generalmente se realiza control de la sintomatología, ecografía y determinación analítica de marcadores tumorales a intervalos de 6-12 meses. Se realiza en mujeres asintomáticas con endometriosis leve y aquéllas en las que el diagnóstico se ha realizado de forma casual y no presentan ninguna manifestación de la enfermedad.

### **1.8.2 Tratamiento quirúrgico.**

Los objetivos del tratamiento quirúrgico de la endometriosis son reestablecer las relaciones anatómicas, extirpar o destruir toda la enfermedad visible en la medida de lo posible o evitar o retrasar la reaparición de la enfermedad (Adamson, 1994; Jacobson, 2002).

Cuando la enfermedad es leve o moderada, el tratamiento médico puede controlar con eficacia el dolor en la gran mayoría de las pacientes, pero no tiene efecto en la fertilidad; la cirugía es al menos tan eficaz como el tratamiento médico para aliviar el dolor y además también puede mejorar la fertilidad (Prentice, 2007).

En las mujeres que esperan reestablecer o preservar la fertilidad y que padecen una endometriosis moderada o grave que distorsiona la anatomía del aparato reproductor, la cirugía es el tratamiento de elección (Speroff y Fritz, 2006).

Atendiendo a la gravedad de la sintomatología, deseos genésicos de la paciente y fracaso de otras terapias previas, podemos dividir la técnica quirúrgica en dos grandes grupos: cirugía conservadora y cirugía radical, las cuales veremos a continuación:

#### **1.8.2.1 Cirugía conservadora laparoscópica o laparotómica**

En general, con este tipo de cirugía se intenta conservar la anatomía pélvica al máximo posible conservando total o parcialmente el útero, las trompas y los ovarios.

En ella se extirpan el mayor número de focos endometriósicos que sea posible. Si se requiere se extirpan en cuña los posibles focos ováricos y se electrocoagulan o fulguran los pequeños focos peritoneales (procurando no lesionar el uréter, ni estructuras arteriales). Asimismo, se extirpan las adherencias asociadas a la endometriosis que distorsionan la anatomía, preferible a la lisis de éstas, ya que las adherencias suelen contener enfermedad (Operative Laparoscopy Study Group, 1991). **El abordaje quirúrgico de elección es la laparoscopia**, ofreciendo ventajas de mejor visualización, menor traumatismo y desecación de los tejidos, y una recuperación postoperatoria más rápida, así como menor tasa de adherencias y complicaciones postoperatorias (Bruhat, 1991). Los resultados logrados con la laparoscopia son equivalentes o mejores que los observados con la laparotomía (Adamson 1994).

Por otro lado, el riesgo de que el tratamiento sea insuficiente es mayor cuando se realiza la ablación de la enfermedad que cuando ésta se extirpa. Las tasas de reintervenciones son menores después de la quistectomía que tras el drenaje aislado (Hemmings y cols, 1998; Saleh y Tulandi, 1999).

#### **1.8.2.2 Cirugía agresiva o histerectomía**

Útil en caso de estadios de endometriosis avanzados y mujeres sin deseos genésicos en los que ha fracasado el tratamiento médico y quirúrgico conservador. La histerectomía total con salpingo-ooforectomía bilateral puede aliviar el dolor y tener menor posibilidad de una futura cirugía (Namnoum y cols, 1995). La cirugía puede resultar complicada por el cuadro adherencial asociado, favoreciéndose las lesiones yatrógenas intestinales, urológicas, vasculares, etc. Se puede prescribir terapia de reemplazo hormonal después de la extracción de los ovarios y debe ser ajustada a las necesidades individuales de la mujer.

Aunque la cirugía es el único método totalmente eficaz para erradicar la endometriosis, esto no garantiza la ausencia de recidivas. Este hecho supone

que las enfermas de endometriosis muchas veces deben someterse a múltiples intervenciones quirúrgicas para intentar eliminar los nuevos implantes con el riesgo que para su salud e integridad física supone, además de favorecer la aparición de adherencias derivadas del acto quirúrgico. Finalmente, nos encontramos, en muchas ocasiones, delante de mujeres jóvenes, sometidas a múltiples intervenciones que no han podido erradicar su problema, a quienes sus antecedentes de múltiples cirugías desaconsejan nuevas intervenciones, y a las que debemos poder dar una solución, que pasaría por un tratamiento médico no invasivo. Éste, dado la naturaleza crónica de la endometriosis, debería ser un tratamiento a largo plazo.

### **1.8.3. Tratamiento farmacológico:**

La endometriosis tiene su origen, muy probablemente, en la menstruación retrógrada hormono-dependiente, lo que la convierte en una patología recidivante y crónica. Debido en las características hormono-dependientes de la endometriosis, se han ensayado muchas estrategias terapéuticas antiestrogénicas basadas en la interferencia sobre la acción de los estrógenos, aunque actualmente ninguna de ellas es completamente satisfactoria. Además, estos tratamientos tienen efectos secundarios derivados de su acción hormonal, induciendo muchos de ellos una menopausia artificial durante su uso. Por otro lado, interfieren claramente en la capacidad reproductiva de las pacientes. Esto ha dado paso al estudio de nuevas moléculas, que sin actuar directamente a través de la modulación estrogénica, sean capaces de destruir las lesiones y prevenir o minimizar la aparición de recidivas sin los efectos indeseados de las terapias antiestrogénicas .

En cuanto a si el tratamiento médico hay que pautarlo antes o después de la cirugía, hay que tener en cuenta las siguientes cuestiones:

El **tratamiento médico preoperatorio** a día de hoy carece de utilidad demostrada en cuanto a la mejoría del dolor y la fertilidad, salvo en las mujeres con

enfermedad profunda que afecta al fondo de saco de Douglas o al tabique recto-vaginal, en las cuales puede mejorar los resultados (Adamson 2003; Donnez y cols, 2003).

El **tratamiento médico postoperatorio** puede retrasar la recidiva de la enfermedad y de los síntomas, y debe considerarse en las mujeres con enfermedad extensa o residual, pero generalmente no tiene utilidad adicional en las mujeres estériles (Bussaca y cols, 2001).

Todos los datos disponibles indican que son igual de eficaces y que ningún tratamiento es superior a otro; el alivio del dolor, las tasas de embarazo posteriores y las tasas de recidiva son similares en todas las formas de tratamiento médico. Por tanto, la elección del tratamiento será individualizada y seguirá criterios de coste-beneficio y efectos secundarios (Speroff y Fritz, 2006).

Finalmente, el tratamiento médico no tiene efecto sobre la fertilidad, ni antes, ni después del tratamiento quirúrgico (Huges y cols, 2003).

A continuación describiremos los diferentes tratamientos farmacológicos empleados en la endometriosis. Los podemos dividir en: tratamientos sintomáticos, dirigidos a paliar el dolor ocasionado por la endometriosis; tratamientos hormonales, entre los que podemos diferenciar aquellos de eficacia probada y de uso habitual en la clínica, y los tratamientos hormonales experimentales, cuya eficacia no se encuentra aún demostrada. Finalmente analizaremos los tratamientos no hormonales, que se están ensayando para su uso en el tratamiento de la endometriosis y que por tanto, no son de uso clínico habitual a día de hoy.

#### **1.8.3.1 Tratamiento médico sintomático: Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**

Las mujeres que padecen endometriosis producen una mayor cantidad de prostaglandinas en la zona pélvica (Ylikorkala y cols, 1985). Estos fármacos actúan sobre las prostaglandinas, las cuales aumentan la intensidad de la contracción intestinal y la contracción muscular uterina, causando dolor y



calambres musculares típicos de la dismenorrea. A su vez, el efecto antiinflamatorio de los AINEs hace que el dolor sea menor porque actúan sobre el tejido endometrial inflamado durante la menstruación (Moghissi, 1999). Estos fármacos pueden ser utilizados como primera línea de tratamiento médico para el dolor asociado a la endometriosis, aunque este tratamiento es insuficiente cuando se trata de endometriosis severa o de larga evolución. No obstante, hay que tener en cuenta que una reciente revisión Cochrane (2005) no encontró pruebas suficientes para demostrar que los AINEs fueran efectivos para el tratamiento del dolor causado por la endometriosis.

#### **1.8.3.2 Tratamientos farmacológicos hormonales de uso clínico:**

Tienen como objetivo reducir el ambiente estrogénico con el fin de disminuir el crecimiento y la actividad de las lesiones endometriósicas, limitando el sangrado cíclico, mejorando la sintomatología y frenando de forma transitoria la progresión de la enfermedad (Speroff y Fritz, 2006).

Los implantes endometriósicos, en comparación con el endometrio eutópico, se caracterizan por una superproducción local de estrógenos, prostaglandinas, TNF y otras citoquinas. En este ambiente proinflamatorio peritoneal, la elevada concentración de citoquinas induce la transcripción de la enzima COX-2. A su vez, dicha enzima cataliza la síntesis de prostaglandinas con potente actividad angiogénica y proinflamatoria. Además, la COX-2 participa en la retroalimentación positiva, lo que potencia la actividad aromatasa y la producción local de estradiol en las lesiones endometriósicas, promoviendo la proliferación y crecimiento del implante y provocando el dolor asociado a la endometriosis (Sánchez-Fernández y Cristobal-García, 2011).

Con el objetivo de frenar este proceso, los tratamientos hormonales se centran en la disminución de la producción de estrógenos por el ovario, dando

lugar a una decidualización y posterior atrofia del tejido endometrial eutópico y ectópico (Sánchez-Fernández, 2011). Dentro de los tratamientos hormonales podemos distinguir entre:

#### **1.8.3.2.1 Anticonceptivos orales combinados (ACO)**

Los anticonceptivos inhiben la ovulación e inducen una pseudo-decidualización y posterior atrofia del tejido endometrial eutópico y ectópico. Han sido utilizados con éxito en el manejo de la dismenorrea, y son una buena elección en las mujeres con dolor leve o moderado, que además no deseen gestación (Harada y cols, 2008). Una ventaja de los ACO frente al resto de tratamientos hormonales para la endometriosis es que se pueden tomar de una manera indefinida.

No existe consenso sobre qué posología es la más efectiva (tratamiento cíclico, tricíclico o continuo), aunque parece ser que si el dolor no responde a una terapia cíclica, hay estudios que sugieren que podría ser más efectivo pasar a una terapia continua (Vercellini y cols, 2003).

En cambio, en la actualidad sí que existe consenso sobre la utilidad del tratamiento posquirúrgico con anticonceptivos para minimizar el riesgo de recurrencia y aumentar el intervalo libre de síntomas. Un meta-análisis reciente reciente demostró una reducción del 47% en la tasa de recurrencia frente al placebo, y en la que esta reducción era proporcional al tiempo de utilización de los ACO (Vercellini y cols, 2008).

#### **1.8.3.2.2 Progestágenos**

Los progestágenos actúan inhibiendo la función de las hormonas gonadotropas, produciendo una supresión de la ovulación e induciendo una atrofia del endometrio. En dosis altas, los progestágenos también pueden inhibir la función ovulatoria y causar amenorrea. El efecto supresor de los progestágenos sobre la metaloproteinasas de la matriz endometrial podría ser otra acción útil (Bruner y cols, 1999). Se dispone de una gran variedad de

fármacos distintos, entre ellos los derivados de la progesterona como el acetato de medroxiprogesterona, que se ha empleado tanto por vía oral (20-100 mg/día) como parenteral (150 mg por vía intramuscular cada 3 meses); así como otros derivados de la 19-nortestosterona, como el acetato de noretindrona (5-20 mg/día por vía oral) o el acetato de megestrol (40 mg/día vía oral) (Muneyyirci-Delale y cols, 1998; Schalaff y cols, 1990). Recientemente se ha empleado un dispositivo intrauterino con levonorgestrel para el tratamiento de la endometriosis rectovaginal (Fedele y cols, 2001). Este dispositivo produce una liberación a nivel local del fármaco a dosis bajas. Esto genera una inhibición en el crecimiento de tejido endometrial, produciendo primero decidualización, y después atrofia. Además, el paso de este gestágeno a la circulación general parece actuar sobre los implantes endometriósicos en otras localizaciones peritoneales. En uso postoperatorio reduce la recurrencia de los períodos dolorosos en las mujeres que han sido sometidas a cirugía por la endometriosis (Abou-Setta AM y cols, 2006).

Este grupo de fármacos constituyen una buena alternativa si otros tratamientos no son posibles o como terapia de mantenimiento. No obstante, tienen el inconveniente de que, una vez finalizado el tratamiento, hay un retardo de varios meses del inicio de la ovulación, por lo que no está indicado en mujeres que deseen una gestación a corto plazo. Los efectos secundarios dependen del tipo, la dosis, la duración del tratamiento y la vía de administración, siendo el más común de todos ellos las alteraciones menstruales (40-70%) seguido de náuseas y vómitos, aumento de peso, tensión mamaria, retención de líquidos, depresión y disminución de la libido (Surrey, 2006).

#### **1.8.3.2.3 Danazol**

El danazol es un agente androgénico derivado de la 19 nortestosterona con capacidad para producir, a dosis elevadas, una supresión del ciclo menstrual. Sus mecanismos de acción incluyen inhibición de la secreción de gonadotropinas a nivel hipofisario y de la producción de hormonas por el

ovario, originando una supresión de la ovulación, menstruación y una atrofia del endometrio. Además, aumenta las concentraciones de testosterona libre (Barbieri y cols, 1981). De esta manera, los numerosos efectos del danazol se combinan para crear un medio rico en andrógenos y pobre en estrógenos que inhibe el crecimiento de la endometriosis (Barbieri, 1987). El inconveniente del danazol en el tratamiento de la endometriosis es que hasta un 85% de las pacientes presentan algún efecto secundario siendo el más característico el efecto masculinizante que en algunos casos, según la intensidad dependiendo de la paciente y de la dosis, obligan a la interrupción de la medicación. Es útil para controlar la clínica cuando el diagnóstico orientativo es de endometriosis leve (Fedele y Berlanda, 2004; Luciano, 2006; Stockwell, 2006).

#### **1.8.3.2.4 Gestrinona**

Es un derivado 19-noresteroideo con acción antiestrogénica que induce una reducción de receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio aumentando la testosterona libre que se traduce en una atrofia del endometrio y de las lesiones endometriósicas. Al igual que el danazol, es efectiva en mejorar la dismenorrea, la dispareunia y el dolor pélvico ocasionados por la endometriosis, aunque las investigaciones con control de placebo no han mostrado un real beneficio en el tratamiento de la infertilidad (Lindsay, 1995). Este fármaco presenta una serie de efectos secundarios como atrofia mamaria, alteraciones menstruales, la caída del cabello y el cloasma "pseudogravídico" entre otros. Es embriotóxico, por lo que debe evitarse su uso durante el embarazo (Crosignani y cols, 2006; Fedele y Berlanda, 2004).

#### **1.8.3.2.5 Análogos de la GnRH**

Los análogos de la GnRh realizan una acción continua no pulsátil sobre los receptores hipofisarios de la GnRH disminuyendo la actividad gonadotrófica (*down-regulation* hipofisaria), e induciendo una supresión de la esteroidogénesis ovárica de forma reversible (hipogonadismo hipogonadotropo). El estado hipoestrogénico que producen conlleva una

reducción del volumen y de la actividad de las lesiones endometriósicas y, con ello, un control del dolor. Además, como consecuencia de este efecto, pueden facilitar una posterior cirugía. Su efecto es reversible al suprimir su utilización (Bergqvist y cols, 1995). Diversos análogos se ha utilizado en endometriosis: leuprolerina, buserelina, nafarelina, histrelina, goserelina y triptorelina, tanto por vía intramuscular, subcutánea o intranasal, y se emplean durante 3-6 meses. Los agonistas de GnRH se asocian con sofocos y pérdida de la densidad mineral ósea cuando se utilizan por periodos mayores a 6 meses, por lo que el gran problema que presenta este tipo de tratamiento es el riesgo de osteoporosis asociado al tratamiento crónico. También son comunes otros efectos secundarios como sequedad vaginal y atrofia, insomnio, irritabilidad, depresión, dolor de cabeza, dolor mamario, sudoración y reducción del impulso sexual. Estos efectos suelen mejorarse o incluso resolverse con el empleo de la terapia “*add-back*” (López y cols, 2009), consistente en el uso de progestágenos a dosis altas o progestágenos en combinación con dosis bajas de estrógenos, consiguiendo las mismas tasas de desaparición del dolor que con los agonistas solos, pero con menos efectos secundarios.

### **1.8.3.3 Tratamientos farmacológicos hormonales experimentales:**

Existen otros tratamientos hormonales en fase de experimentación, cuyo uso no se encuentra a día de hoy acreditado para el tratamiento de la endometriosis. Son los siguientes:

#### **1.8.3.3.1 Antagonistas de la GnRH:**

Los antagonistas de la GnRH producen una supresión rápida de la secreción de gonadotropinas mediante un mecanismo de competición selectiva con el receptor de la GnRH endógena. De esta forma, la supresión es más rápida y eficaz, evitando el efecto *flare up* de los agonistas. Parecen ser fármacos prometedores a la hora de conseguir una menopausia temporal y constituir una herramienta terapéutica eficaz para tratar la endometriosis, sin

embargo, la información clínica es aún insuficiente (Kupker y cols, 2002). Por otra parte, comparado con los agonistas de la GnRH, tienen un coste más elevado y la posología presenta un perfil de menor comodidad para la paciente.

#### **1.8.3.3.2 Inhibidores de la aromatasa**

La aromatasa es una enzima que cataliza el paso de andrógenos a estrógenos (estrona y estradiol) y, por lo tanto, es una enzima fundamental en la síntesis de estrógenos. Además, juega un papel importante en el proceso inflamatorio, y se ha demostrado la existencia de un aumento de su expresión en los implantes endometriósicos y en el endometrio de las pacientes con endometriosis.

Debido a que la endometriosis es un problema estrógeno dependiente, los inhibidores de la aromatasa provocan una disminución de la producción de estrógenos en al menos 4 lugares críticos: el cerebro, ovario, endometriosis y periferia (tejido adiposo, piel,...) (Sebastian y Bulun, 2001). El anastrozol y letrozol han sido utilizados con éxito en el tratamiento de la endometriosis (Amsterdam y cols, 2005; Ailawadi y cols, 2004; Soysal y cols, 2004; Shippen y West, 2004; Takayama y cols, 1998; Razzi y cols, 2004) pero el gran problema del tratamiento prolongado con inhibidores de la aromatasa es el alto riesgo de desarrollar osteoporosis y osteopenia (Buzdar, 2004). Recientemente, se ha probado que la administración de anastrozol vaginal (0,25 mg/día) durante 6 meses en mujeres con endometriosis rectovaginal puede mejorar la dismenorrea (Hefler y cols, 2005), abriendo nuevas opciones a la utilización del fármaco a menor dosis y por una vía tópica, con menor efectos secundarios, para casos con afectación profunda retroperitoneal.

#### **1.8.3.3.3 Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs).**

Los SERMs son un ligando sintético del receptor de estrógenos que

pueden ser útiles en el tratamiento de los fibromas uterinos y la endometriosis. Modulan el receptor estrogénico y pueden tener efectos antiestrogénicos o proestrogénicos en función del tejido diana (Speroff y Fritz, 2006).

Raloxifeno, un SERM, actúa como antagonista de los estrógenos en el endometrio, atenuando su crecimiento, y como agonista en el hueso, preservando la densidad mineral ósea, pero sus síntomas vasomotores limitan su utilidad. Estudios de Raloxifeno en animales han demostrado una reducción del volumen de tejido ectópico hasta en un 70%, pero un reciente estudio en pacientes encontró una disminución del periodo libre de dolor en las pacientes tratadas con Raloxifeno con respecto a las pacientes con placebo, y la necesidad de adelantar la cirugía en las primeras (Stratton y cols, 2008).

#### **1.8.3.3.4 Moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SPRMs).**

Al igual que los SPRMs, tienen efecto agonista/antagonista sobre los receptores de progesterona en dependencia del tejido sobre el que actúen. Los SPRMs suprimen la producción local de prostaglandinas a nivel endometrial, lo que puede frenar la inflamación y mejorar los síntomas de la enfermedad. Además, tienen un efecto directo sobre la proliferación endometrial y la formación de vasos en el endometrio (Chwalisz y cols, 2005). Una de las ventajas con respecto al tratamiento con agonistas es que se mantienen los niveles de estrógenos circulantes, lo que mejora su tolerabilidad. Sin embargo, se ha observado un aumento en el riesgo de hiperplasia endometrial que podría limitar su uso (Chwalisz y cols, 2004).

#### **1.8.3.4 Tratamientos no hormonales:**

Los tratamientos hormonales que acabamos de describir tienen algunas limitaciones. Entre ellas, es importante resaltar que interfieren

directamente con la ovulación o con la receptividad endometrial, por lo que limitan su uso en las pacientes con deseo gestacional. Además, estos fármacos no están exentos de efectos secundarios, más aún si consideramos que nos referimos a una enfermedad crónica que necesita de tratamientos a largo plazo (Rice, 2002; Valle y Sciarra, 2003).

A todo esto debemos unir el hecho que ningún tratamiento hormonal se ha demostrado totalmente eficaz en la supresión de los síntomas o en la eliminación de la progresión de la enfermedad y aparición de recidivas (Mihalyi y cols, 2006); así como los múltiples avances realizados en los últimos años en el conocimiento de la fisiología de la enfermedad.

Todo ello ha dado lugar a la aparición de tratamientos no hormonales que pretenden integrar nuevos conocimientos con la finalidad de obtener la estrategia terapéutica capaz de controlar la sintomatología a la vez que se ofrezcan opciones reproductivas para las pacientes con endometriosis (Olivares y cols, 2008).

Estas sustancias, que se presentan a continuación, son, en su mayoría, tratamientos en fase experimental, y por tanto, no empleados en clínica aún en la actualidad.

#### **1.8.3.4.1 Fármacos hipolipemiantes.**

Algunos estudios experimentales con modelo animal sugieren que las estatinas pueden inhibir el crecimiento de células endometriales por un doble mecanismo de acción: suprimiendo los genes que codifican proteínas implicadas en la inflamación y la angiogénesis, y reduciendo la HMG-CoA reductasa (Bruner-Tran y cols, 2009; Cakmak y cols, 2012).

Otros autores han investigado el efecto antiinflamatorio de otros fármacos hipolipemiantes, como el ácido eicosapentaenoico (EPA), un ácido graso poliinsaturado esencial de la serie omega 3 (Nieto y cols, 2002; Kubes y cols, 1991). Basándose en la hipótesis que el desbalance en la ingesta de lípidos puede aumentar el estado proinflamatorio asociado a la



endometriosis, favoreciendo su desarrollo, se han llevado a cabo sus estudios en ratas en los que obtuvieron resultados favorables acerca de la suplementación con EPA . Ésta se asoció a una reducción del grosor del tejido endometriósico intersticial, en el que se desarrolla el proceso inflamatorio crónico relacionado con la progresión de la endometriosis. Además, el EPA se asoció a una supresión de algunos de los genes implicados en la patogenia de la endometriosis (IL-1 $\beta$ , MMP13, MMP10 y MMP8), así como la disminución de la proliferación de fibroblastos o del MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos) (Sachiho y cols, 2008).

#### **1.8.3.4.2 Bifosfonatos.**

Los macrófagos activados perpetúan la disfunción inmunológica que se produce en la endometriosis, secretando factores activadores de los linfocitos, citoquinas y factores angiogénicos, los cuales favorecen la activación de nuevos macrófagos, la proliferación del estroma endometrial y la neovascularización (Lebovic y cols, 2004, Lin y cols, 2006). Se ha visto que se puede reducir el número de macrófagos y monocitos circulantes *in vivo* mediante partículas liposomales que permiten la entrada en la célula de los bifosfonatos, que fagocitan e inactivan a los macrófagos, pero que no son tóxicas para células no fagocitarias (van Rooijen y Sanders, 1994; Danenberg y cols, 2002; Epstein y cols 2007). Haber y cols demostraron una reducción en el tamaño de los implantes peritoneales después de la administración de 10mg/kg de alendronato liposomal, así como una reducción en el número de monocitos y la disminución de la respuesta inflamatoria en un modelo animal con roedores (Haber y cols, 2009).

#### **1.8.3.4.3 Fármacos Inmunomoduladores.**

La endometriosis puede considerarse una enfermedad inflamatoria, por lo que para su tratamiento se ha sugerido el empleo de dos tipos de inmunomoduladores: los agentes que aumentan la respuesta inmune y los

que reducen el componente inflamatorio (Sánchez-Fernández, 2011). Una de las moléculas más estudiada ha sido la **pentoxifilina**, que ha demostrado inhibir la fagocitosis por macrófagos, aumentar la liberación de enzimas proteolíticas y reprimir la producción de TNF-alfa. (Nothnick, 2001; Olive y cols, 2004). Además, la pentoxifilina ha demostrado inducir la regresión de las lesiones endometriósicas sin inducir un estado hipoestrogénico en modelo animal (Nothnick, 2001). Por tanto, puede jugar un papel importante en el futuro, utilizada de forma aislada o tras la cirugía laparoscópica, para mejorar la fertilidad en mujeres con endometriosis en estadios precoces (I-II) (Balash y cols, 1997; Creus y cols, 2008).

#### **1.8.3.4.4 Bloqueantes del Factor Nuclear KappaB (FN-kB)**

El FN-kB es un factor de transcripción que induce la expresión de muchos de los genes que participan en la respuesta inflamatoria (McKay y cols 1999), y algunos estudios han demostrado un papel importante en el proceso inflamatorio de las células del estroma endometrial en las mujeres con endometriosis (Lebovic y cols, 2001; Yamuchi y cols, 2004, Guo, 2007). Para bloquear su acción, se han utilizado con éxito, en estudios con células cancerosas, dos tipos de moléculas: los inhibidores del FN-kB, o los inhibidores de los proteosomas, que impedirían la liberación de los precursores del FN-kB (Orlowski y cols, 2002). Un reciente estudio ha demostrado que la pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), un potente inhibidor del FN-kB; y el bortezomib, un inhibidor reversible del proteasoma, utilizadas en ratas a las que se les ha implantado tejido endometriósico, han demostrado reducir el tamaño de los implantes e impedir la progresión de las lesiones (Celik y cols, 2008).

#### **1.8.3.4.5 Terapias antiangiogénicas:**

En los últimos años se ha observado un interés creciente por los fármacos antiangiogénicos en la endometriosis, debido a que se ha

demostrado que el endometrio presenta un poder angiogénico, y que las lesiones endometriósicas crecen en áreas con abundante riego sanguíneo (Nisolle y cols, 1993), así como un aumento de la vascularización a nivel de los implantes endometriósicos (Maas y cols, 2001; Nisolle y cols, 1993), sugiriendo que la neo-angiogénesis es un pre-requisito fundamental para el mantenimiento y desarrollo de la endometriosis una vez que los nódulos de tejido endometrial han quedado implantados (Nap y cols, 2004). Además, en las mujeres con endometriosis se observa un aumento de los factores pro-angiogénicos y una disminución de los factores inhibidores de la angiogénesis en el fluido peritoneal (Lasche y Menger, 2007).

Hay una extensa lista de factores que promueven e inhiben la angiogénesis en el endometrio, pero de entre ellos destaca la familia del **Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)**, una glicoproteína cuya actividad se considera esencial en el proceso de angiogénesis, tanto fisiológica como patológica (Gargett y cols, 2002). Se ha visto que es liberado por los macrófagos presentes en mayores cantidades en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis frente a mujeres normales (McLaren y cols, 1996). Además, existe una correlación positiva entre la severidad de la enfermedad y la liberación de VEGF en el líquido peritoneal (Shifren y cols, 1996; Bourlev y cols, 2006), y su expresión está aumentada en las lesiones endometriósicas rojas (Donnez y cols, 1998), activas, y en las mujeres con endometriosis profunda (Machado y cols, 2008). Finalmente, como veremos después con más detenimiento, la unión del VEGF a su receptor tipo 2 (VEGFR2) parece ser el proceso principal por el cual este factor regula el mecanismo de angiogénesis, vasculogénesis y permeabilidad vascular (Shalaby y cols, 1995; Watkins y cols, 1999; Verheul y cols, 2000).

Varios han sido los fármacos que se han ensayado en modelos animales, entre ellos el **Avastin**, un inhibidor específico del VEGF-A; así como otros inhibidores de la angiogénesis (**TNP-A, Endostatina, Anginex**), y todos ellos han demostrado disminuir de forma significativa las lesiones

endometriósicas y los vasos sanguíneos (Nap y cols, 2004). Pero estos fármacos presentan un inconveniente, y son los efectos secundarios que se derivan de su acción, como flebitis, anorexia o astenia, inasumibles en pacientes con endometriosis y , por lo demás, sanas (Via y cols, 2000).

Otras sustancias y fármacos, utilizados inicialmente para tratar otras entidades, y por tanto, avaladas en cuanto a sus potenciales efectos secundarios, han demostrado su efecto antiangiogénico en diversos estudios, presentándose como opciones futuras para el tratamiento de la endometriosis. Entre ellas, podemos nombrar las siguientes:

#### ***1.8.3.4.5.1 Inhibidores selectivos de la COX-2.***

La ciclooxygenasa (COX) tipo 1 y 2 son isoenzimas que catalizan la síntesis de prostaglandinas. La expresión de la COX-1 es constitutiva, en cambio la COX-2 se encuentra aumentada en los procesos del dolor y la inflamación.

Varios estudios han demostrado una sobreexpresión de la enzima COX-2 en el endometrio eutópico y ectópico de las pacientes con endometriosis (Ota y cols, 2001; Matsukaki y cols, 2004). Además, las Prostaglandinas E2, que se encuentran aumentadas en el fluido peritoneal de las pacientes con endometriosis, aumentan la producción de VEGF (Gately y Li, 2004) y de estradiol. Éstos, junto con las citoquinas, inducen la sobreexpresión de la COX-2 en las células endoteliales (Tamura y cols, 2006), dando lugar a un *feed-back positivo* y aumentando la concentración de estrógenos, PGE2 y VEGF en el tejido endometriósico (Bulun y cols, 2002).

Varios estudios con modelo animal han demostrado que la administración de inhibidores selectivos de la COX-2 (celecoxib) se asocia a un bloqueo en el proceso de crecimiento celular e induce la apoptosis en varias líneas de células tumorales (Kundu y cols, 2002; Basu y cols, 2005). Se ha visto, además, que es un potente inhibidor de la angiogénesis *in vivo* e *in vitro* (Gately y Li, 2004; Basu y cols, 2005). Recientemente, se ha visto que la administración de inhibidores de la COX-2 previene la implantación de tejido

endometrial ectópico, así como el crecimiento de las lesiones ya existentes (Matsuzaki y cols, 2004), e induce la regresión de los explantes endometriales en ratas (Dogan y cols, 2004) y ratones (Ozawa y cols, 2006). En humanos, únicamente un estudio realizado *in vitro* ha demostrado que la administración de celecoxib reduce la proliferación celular e induce la apoptosis de las células epiteliales del endometrio en las mujeres con endometriosis y en los controles, además de disminuir la actividad de la COX-2 y reducir la secreción de PGE2 y los niveles de VEGF en el fluido peritoneal de las mujeres tratadas (Olivares y cols, 2008).

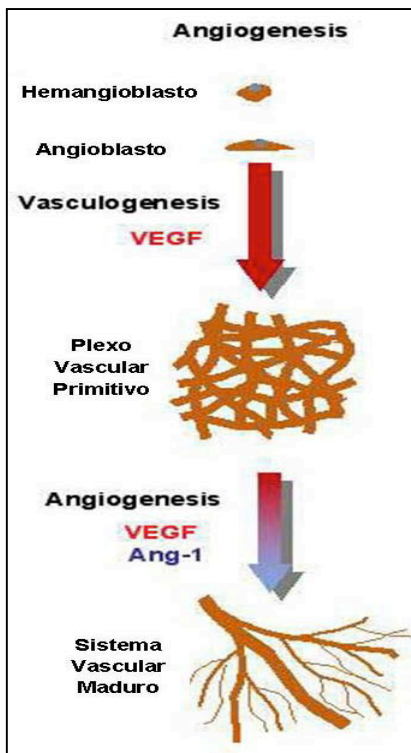
#### **1.8.3.4.5.2 Té verde.**

La epigallocatequina galato (EGCG), un flavonoide del tipo galato que constituye uno de los principios activos del té verde, presenta una potente actividad antioxidante, anticancerígena y de inhibición del crecimiento del endotelio vascular *in vivo* e *in vitro* (Cao y cols, 1999; Tang y cols, 2001). Asimismo, varios estudios experimentales han demostrado que la EGCG presenta un potente efecto anti-angiogénico en diversos tipos tumorales (Adhami y cols, 2004; Fassina y cols, 2004), que parecen asociados a un efecto inhibitor sobre la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y sobre la actividad del receptor del VEGF (Jung y cols, 2001; Basini y cols, 2005). Posteriormente, y partiendo de estos hallazgos, se ha ensayado las propiedades de la EGCG en la endometriosis experimental. En estos estudios se ha visto que la EGCG inhibe la angiogénesis, la adhesión y la invasión de las lesiones endometrióticas y reduce el tamaño de éstas en ratones (Rogers y cols, 2009).

Para entender mejor estos acercamientos terapéuticos es necesario comprender el proceso de la angiogénesis, que se detalla a continuación.

## 1.9 Vasculogénesis y angiogénesis.

El término **angiogénesis** se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de los existentes. Éste término no debe confundirse con la vasculogénesis, que es la generación de vasos sanguíneos *de novo*. En concreto:



**1. Vasculogénesis:** implica la formación de vasos sanguíneos a partir de células madre endoteliales o primordiales diferenciadas. La vasculogénesis se da preferentemente durante la vida embrionaria en la que se forma el nuevo ser. El proceso se inicia con la formación de los islotes sanguíneos en el mesodermo extraembrionario del saco vitelino, corion y pedículo de fijación, durante la tercera semana de desarrollo (Larsen, 1993). Este fenómeno se observa en menor medida casi testimonial tras el nacimiento y durante la fase de crecimiento del individuo para desaparecer completamente durante la fase adulta.

**2. Angiogénesis:** Se define como la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes y es un mecanismo que puede ocurrir durante toda la vida del individuo.

Debemos distinguir en este caso entre angiogénesis fisiológica y patológica:

La angiogénesis fisiológica: generalmente se asocia a los procesos de reparación y generación de nuevos vasos para irrigar tejido neoformado durante los procesos de regeneración tisular y de cicatrización. Se obvia sin embargo el hecho que la angiogénesis ocurre también de manera cíclica en los órganos reproductores durante el ciclo reproductivo de la mujer fértil. En ese sentido se dan fenómenos de angiogénesis en el endometrio durante el ciclo menstrual. Así mismo la angiogénesis es necesaria para abastecer de una adecuada red vascular al folículo maduro durante las últimas etapas de maduración y al cuerpo lúteo durante su formación. Aunque no de forma cíclica, la angiogénesis se da también durante la formación de la placenta (Larsen, 1993). En estas

situaciones, el proceso de angiogénesis está fuertemente regulado por factores activadores o moléculas angiogénicas, que estimulan este proceso, y factores inhibidores de la angiogénesis (Folkman y Shing, 1992).

La angiogénesis patológica: La angiogénesis es imprescindible para el desarrollo de procesos patológicos como el crecimiento de los tumores, la artritis, psoriasis, la retinopatía diabética, la aterosclerosis, inflamación crónica y en la endometriosis (Griffioen y cols, 2000). En estas enfermedades hay un componente de tipo angiogénico persistente que escapa a los mecanismos de regulación, y que da lugar a un crecimiento descontrolado de estructuras vasculares fuera de su entorno habitual y fisiológico (Folkman y Shing, 1992). Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en el cáncer (Folkman, 2002), hasta el punto de que se desarrollan a día de hoy numerosas terapias basadas en el uso de drogas antiangiogénicas. En los últimos años el estudio del papel de la angiogénesis se ha extendido a la endometriosis.

### **1.9.1. Angiogénesis y endometriosis.**

De las múltiples teorías que intentan explicar la etiopatogenia de la endometriosis, la más aceptada es la de la menstruación retrógrada, propuesta por Sampson en 1927 (Sampson, 1927). Actualmente se entiende que la patogenia de la enfermedad comporta, en parte, la implantación de tejido endometrial desprendido, el cual se encuentra en la menstruación retrógrada (Thomas y Prentice, 1992). Pero lo que realmente determina la aparición y desarrollo de la endometriosis es la supervivencia y crecimiento del tejido adherido (McLaren J, 2000). Para que se produzcan estos acontecimientos es imprescindible el establecimiento de un aporte sanguíneo efectivo que nutra al tejido de los componentes que permiten su crecimiento. Para que este aporte sea efectivo es imprescindible la generación de nuevos vasos sanguíneos alrededor del tejido patológico mediante angiogénesis. Apoyando esta afirmación, se ha visto que el ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis es altamente pro-angiogénico, presentando una actividad angiogénica aumentada en el líquido peritoneal (Oosterlynck y cols, 1993), con un aumento de los

factores pro-angiogénicos y una disminución de los factores inhibidores de la angiogénesis (Lasche y Menger, 2007). Además, el examen laparoscópico de las mujeres con endometriosis ha demostrado que este aporte sanguíneo deriva del tejido circundante (Shaw, 1993), observando en éste un aumento de la presencia de vasos sanguíneos (Healy y cols, 1998). Finalmente, se ha visto que la endometriosis crece sobretodo en áreas con abundante riego sanguíneo (Vernon y Wilson, 1985; Nissole y cols, 1993), y que las lesiones más vascularizadas son más activas (Vernon y Wilson, 1985).

Por tanto, considerando que la neo-angiogénesis es un requisito esencial para la implantación y adhesión del tejido endometrial retrógrado y desarrollo de la endometriosis (Nap y cols, 2004), parecería esta una diana adecuada sobre la que dirigir todos nuestros esfuerzos a la hora de encontrar un tratamiento eficaz para esta enfermedad. Se hipotetiza que mediante la interrupción del proceso angiogénico se podría suprimir la fuente de suministro para el crecimiento e incluso supervivencia del tejido endometriósico, reduciendo o eliminando de esta forma la enfermedad. Es este sentido, es importante conocer los principales factores implicados en la angiogénesis pues sobre ellos actuaríamos para tratar la endometriosis.

### **1.9.2. Factores implicados en la angiogénesis.**

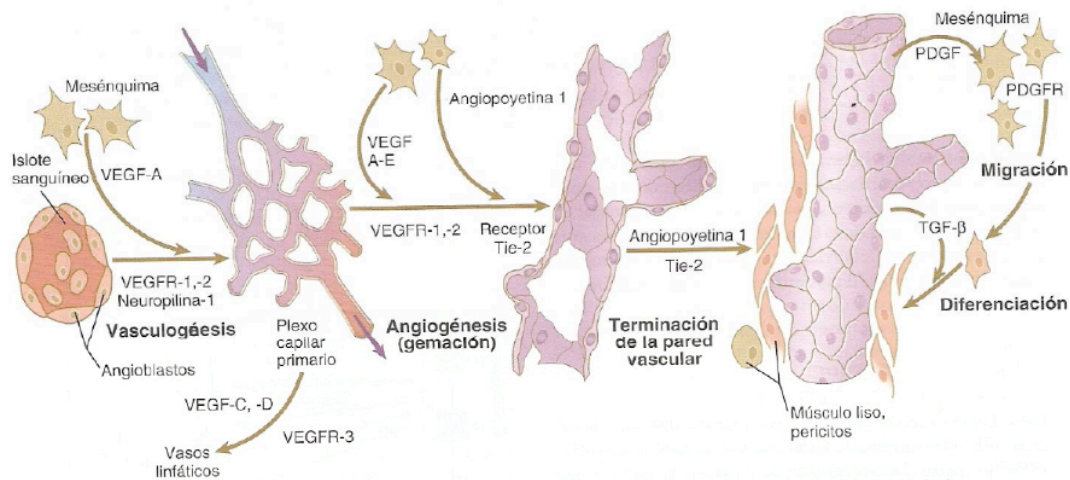
En condiciones normales existe un balance entre la activación y el bloqueo de la angiogénesis gracias al carácter proangiogénico o antiangiogénico de las múltiples moléculas o factores que intervienen en este proceso (Folkman y Shing, 1992).

De entre todos los factores implicados en la angiogénesis destaca la familia del **Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF)** (Gargett y cols, 2002). Este factor es el angiógeno más potente conocido (Barbeito y Laude, 2005). Dentro del complejo proceso angiogénico, el VEGF es el responsable del inicio del mismo y juega un papel clave en la modulación de la expresión del resto de componentes que lo regulan.

La hipoxia es uno de los principales inductores de la expresión del VEGF en la vida postnatal, y su acción determina la formación de vasos inmaduros y altamente permeables. El **VEGF** estimula la remodelación vascular favoreciendo la formación de



brotes angiogénicos a partir de los cuales proliferan las células endoteliales promoviendo el crecimiento de los nuevos vasos. Así mismo, estimula la supervivencia de las células endoteliales evitando la apoptosis celular y la regresión de los vasos. Durante los últimos estadios de la neovascularización, el VEGF modula la expresión de genes implicados en la maduración y reestabilización de los vasos formados (Hicklin y Ellis, 2005; Carmeliet, 2000) culminando el proceso (Fig 4).



**Fig 4.** Esquema que ilustra la vasculogénesis, angiogénesis y el ensamblaje de la pared vascular. Los angioblastos, que al principio expresan el VEGFR-2 son estimulados por el VEGF-A secretado por el mesénquima circundante para formar un plexo capilar primario mediante el proceso de vasculogénesis. Bajo la estimulación adicional por parte de factores de crecimiento, las células endoteliales competentes del plexo capilar primario forman yemas vasculares en los estadios más precoces de la angiogénesis. Después se produce el reclutamiento de las células mesenquimales circundantes para constituir los elementos celulares de la pared vascular. En la primeras fases de la vasculogénesis, las células endoteliales que expresan VEGFR-3 responden a la estimulación por VEGF diferenciándose en los pecursos de los vasos linfáticos

Por la gran importancia del VEGF en el proceso de angiogénesis, dedicaremos un capítulo extra para hablar de éste con más detenimiento.

## 1.10 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

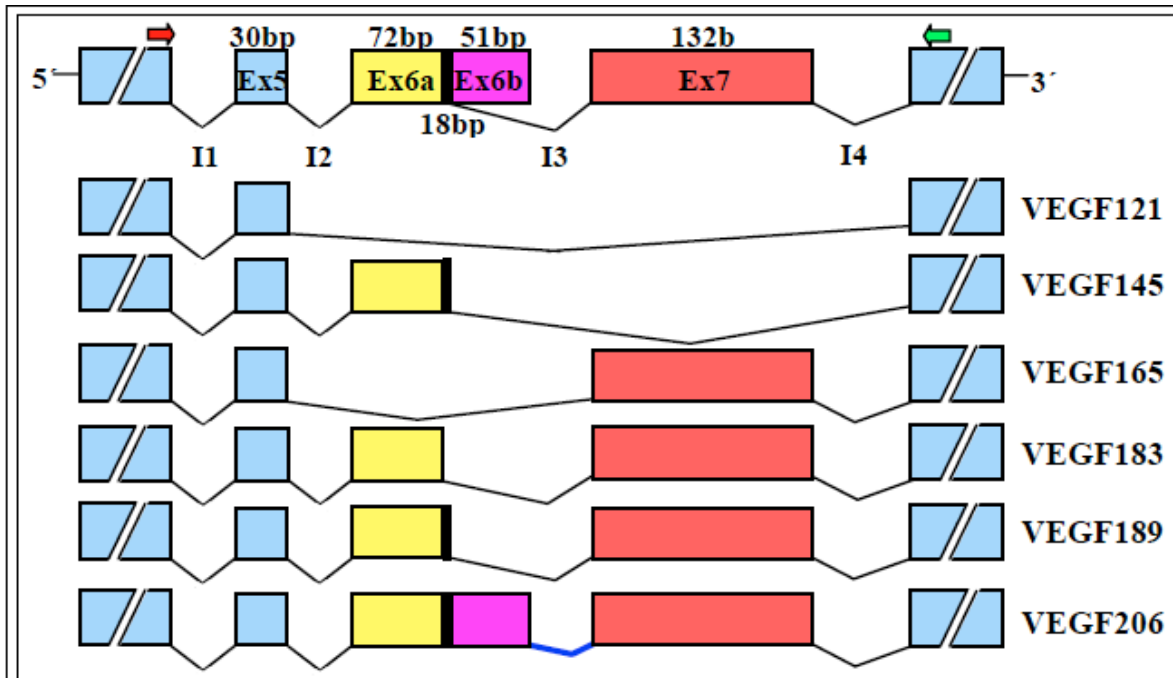
La familia del VEGF está formada, por una serie de ligandos emparentados y receptores. En el caso de los ligandos encontramos al VEGF-A (conocido comúnmente como VEGF y principal sujeto de estudio) y sus homólogos VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el

factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PlGF). En cuanto a los receptores encontramos el VEGFR-1 (también flt-1), el VEGFR-2 (también Flk-2/KDR) y el VEGFR-3 (también flt-4) (Waltenberger y cols, 1994; Shalaby y cols, 1995).

El VEGF-A, VEGF-B y VEGF-E están principalmente implicados en la angiogénesis, mientras que el VEGF-C y VEGF-D se encuentran sobretodo involucrados en los procesos de linfangiogénesis (Plate, 2001).

El VEGF-A, comúnmente conocido como VEGF o factor de permeabilidad vascular (Ferrara y Henzel, 1989; Senger y Dvorak, 1983), es una glicoproteína dimérica de 34 a 46 KDa, una citoquina multifuncional (Senger y cols, 1993) aislada a partir de las proteínas secretadas en las pequeñas venas hiperpermeables a macromoléculas que rodean los tumores (Senger y cols, 1983), capaz de ligar heparina, y formada por polipéptidos con extremo N-terminal idénticos unidos por puentes disulfuro. Esta glicoproteína es capaz de unirse a uno de los múltiples receptores de la tirosina kinasa lo que provoca su autofosforilación, consiguiendo la activación de proteínas kinasas con acción mitogénica (Keck y cols, 1989).

El gen del VEGF-A humano, a partir de ahora referido como VEGF, está localizado en el cromosoma 6 (6p21.3) (Vincenti y cols, 1996) y está formado por 8 exones separados por 7 intrones. Mientras los exones 1 a 5 y 8 están siempre presentes en el ARNm del VEGF, la expresión de los exones 6 y 7 se regula por “splicing” (corte y empalme) alternativo. Como consecuencia de este splicing alternativo del los exones 6 y 7 el VEGF puede presentarse bajo seis isoformas que varían entre 121 y 206 aminoácidos: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 y VEGF206 (Tisher y cols, 1991; Houck y cols, 1991) (Fig 5).



**Fig. 5.** Modelo de corte alternativo para el ARNm de VEGF y que genera 6 isoformas de VEGF. Los exones se representan por los cuadros azules, los intrones por líneas discontinuas. Los exones 1-5 y el exón 8 son comunes, por lo que las distintas longitudes de las isoformas de VEGF vienen en función de cómo se corten y empalmen los exones 6 y 7. La cifra que acompaña a las distintas isoformas VEGF es indicativo del número de aminoácidos que contienen tras los cortes selectivos. Representación realizada de acuerdo a las secuencias depositadas en el GenBank por Houck y cols., 1991.

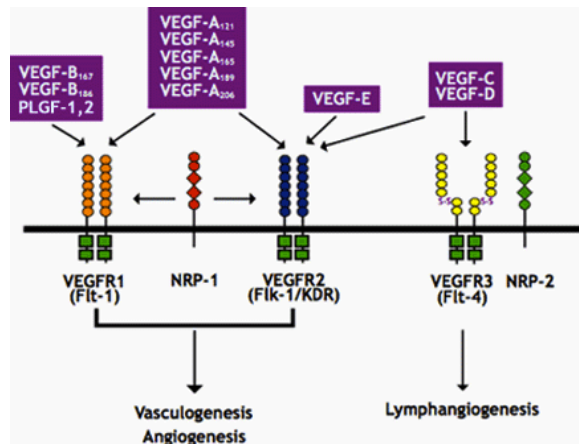
Una diferencia importante entre estas isoformas es su afinidad por la heparina, lo que afecta a su unión celular y a la matriz extracelular (Ferrara, 1999). El dominio de unión a heparina está codificado por el exón 6 y 7, y es determinante para la unión a la matriz extracelular, por lo que las isoformas que contienen este dominio (VEGF-A189 y VGF-A206) se encuentran fuertemente unidas a ésta (Houck y cols, 1992; Park y cols, 1993, Houck y cols, 1991). La isoforma VEGF-A165, que es la forma molecular predominante, posee solamente un dominio de unión a heparina, codificado por el exón 7, por lo que su afinidad es reducida, de forma que una proporción significativa se mantiene unida mientras que la otra parte es soluble (Houck y cols, 1992). El VEGF-A121, que no posee los dominios codificados por los exones 6 y 7, no tiene la capacidad de unión a la heparina y por lo tanto es una proteína que se encuentra de forma libre y soluble. Por todo ello, se ha sugerido que las isoformas más cortas o solubles serían las encargadas de desplazarse hacia los focos de

lesión tisular, donde es necesaria la neoformación de vasos para la reparación del tejido (Watkins y cols, 1999), mientras que las isoformas más largas quedarían pegadas a la matriz extracelular y cabría esperar que sus efectos se limitaran a acciones locales.

También es sabido que el VEGF aumenta de forma considerable la permeabilidad vascular (Dvorak y cols, 1995), la cual es una vía indirecta de estimulación de la angiogénesis que precede o se produce de forma simultánea a su acción sobre las células endoteliales y ha demostrado ser un paso clave en el proceso de angiogénesis.

### **1.10.1 Papel del VEGF y sus receptores en la angiogénesis.**

El VEGF dispone de receptores específicos presentes en las membranas de las células endoteliales y que pertenecen a la familia de la Tirosin-quinasa (De Vries y cols, 1992). El VEGF muestra alta afinidad por tres receptores específicos de membrana (Fig 6) a través de los cuales desarrollan sus acciones como son el VEGFR-1 (también flt-1), el VEGFR-2 (también Flk-2/KDR) y el VEGFR-3 (también flt-4) (Waltenberger y cols, 1994; Shalaby y cols, 1995). El VEGFR-1, el cual tiene una mayor afinidad por el VEGF que VEGFR-2, desempeña principalmente funciones de morfogénesis y estructuración de las células endoteliales (Fong y cols, 1995), interviniendo en los procesos de ensamblaje, supervivencia y maduración del vaso. En cambio, VEGFR-2 está implicado principalmente en la mitogénesis (Shalaby y cols, 1995). Una vez activado promueve la proliferación y migración de células endoteliales, desempeñando las acciones angiogénicas propiamente dichas del VEGF (Gille y cols, 2001), .



**Figura 6.** Receptores del VEGF. Adaptado de Berne y Levy, 1998.

El VEGF actúa fundamentalmente a nivel de las células endoteliales (Senger y cols, 1993) induciendo cambios en la expresión génica de la célula (Pepper y cols, 1992), en su forma (Senger y cols, 1993), estimulando su migración y división, y aumentando los niveles de calcio intracelulares (Connolly y cols, 1989).

## 1.10.2 Endometriosis y VEGF.

### 1.10.2.1 Expresión del VEGF en el endometrio eutópico:

La presencia de VEGF-A en el endometrio humano ha sido demostrada en varios trabajos (Charnock-Jones y cols, 1993; Shifren y cols, 1996; Donnez y cols, 1998), y juega un papel importante en la formación de vasos sanguíneos en el endometrio durante el ciclo menstrual (Donnez y cols, 1998). Se ha visto que los niveles de ARNm del VEGF-A aumentan su expresión en la fase secretora y en la fase menstrual del ciclo (Charnock-Jones y cols, 1993), y que estos cambios están en relación a variaciones en los niveles de esteroides ováricos (Shifren y cols, 1996). Este fenómeno indica que el VEGF se trata de un factor de crecimiento estrógeno dependiente, con efecto angiogénico en el endometrio humano (Shifren y cols, 1996).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha localizado la presencia de VEGF

tanto en el epitelio como en el estroma del endometrio eutópico en la fase proliferativa, manteniéndose sólo en el epitelio en la fase secretora (Shifren y cols, 1996; Oosterlynck y cols, 1993). Estos datos sugieren que el endometrio que migra durante la menstruación retrógrada expresa el VEGF, lo cual nos hace sospechar que el tejido que alcanza la cavidad pélvica puede proliferar bajo el fenómeno de la angiogénesis (García Manero y cols, 2009). Además, Donnez y cols demostraron que los niveles de VEGF eran significativamente más elevados en el epitelio glandular eutópico de las pacientes con endometriosis (Donnez y cols, 1998), por lo que la sobreexpresión del VEGF en respuesta al estímulo estrogénico en este tejido migrado durante la menstruación retrógrada confiere mayor capacidad de proliferación, favoreciendo el crecimiento de las lesiones endometriósicas.

#### **1.10.2.2 Expresión del VEGF en el endometrio ectópico:**

El VEGF, más concretamente el ligando VEGF165 se expresa en el endometrio humano ectópico (Tan y cols, 2002; Kressin y cols, 2001), principalmente en las estructuras glandulares y células estromales pero también en macrófagos activos presentes en el tejido ectópico (McLaren y cols, 1996; Shifren y cols, 1996; Donnez y cols, 1998).-Se ha comprobado que las concentraciones de VEGF varían en función del tipo de lesiones endometriósicas y el grado de enfermedad, siendo mayor en las lesiones más vascularizadas y activas, y en pacientes con endometriosis grave (McLaren y cols, 1996; Donnez y cols, 1998). La expresión de este factor de crecimiento en el tejido endometrial ectópico, sobretodo en las lesiones más activas, sugiere la importancia de la angiogénesis en el mantenimiento de las lesiones (McLaren, 2000).

#### **1.10.2.3 Expresión del VEGF en el líquido peritoneal.**

El líquido peritoneal desempeña un papel fundamental en la implantación, supervivencia y propagación del tejido endometrial ectópico (Ramey y cols, 1993; Koninckx y cols, 1998). Se ha demostrado la presencia de VEGF en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (McLaren y cols, 1996), siendo

mayores los niveles en mujeres con enfermedad severa (Shifren y cols, 1996).

### **1.10.3 Inhibidores comerciales del sistema VEGF y sus limitaciones para el potencial uso terapéutico en endometriosis**

Los agentes angiostáticos, inhibidores de la angiogénesis, se empezaron a emplear en oncología médica como terapia experimental desde que Judah Folkman (Folkman, 2002) identificara el imprescindible papel de la angiogénesis en el crecimiento y mantenimiento de estos tumores. Estas terapias fueron impulsadas más si cabe con el descubrimiento del VEGF en 1989 por Ferrara et al (Ferrara y Henzel, 1989) y con el inmediatamente posterior nacimiento de compuestos diseñados para inhibir el VEGF (Ferrara, 2002). Estas sustancias, ya sean anticuerpos bloqueantes del propio ligando VEGF (Hull y cols, 2003) o del VEGFR-2 (Nap y cols, 2004), en definitiva persiguen impedir la unión ligando-receptor o la transducción de la señal, entorpeciendo la angiogénesis (Nap y cols, 2004; Molema y cols, 1998).

En humanos, estos agentes, y específicamente el Avastin, un anticuerpo humanizado anti-VEGF, ha sido probado con relativo éxito en disminuir la angiogénesis en pacientes oncológicas (Ferrara, 2002; McCarthy, 2003). Estos agentes, administrados de forma sistémica, inhiben otros procesos fisiológicos relevantes, por lo que tienen efectos secundarios que difícilmente serían tolerables éticamente en mujeres con patologías angiogénico-dependientes no tumorales como la endometriosis o el síndrome de hiperestimulación ovárica, esta última la mencionaremos posteriormente, máxime si estos agentes afectan a la implantación y desarrollo embrionario en mujeres fértiles.

Esta circunstancia sin embargo no ha sido obstáculo para que el uso de estos inhibidores, ya fuera anticuerpos bloqueantes del propio ligando VEGF o del VEGFR-2, se haya ensayado en modelos animales de endometriosis (Hull y cols, 2003) (Nap y cols, 2004) u otras enfermedades angiogénico dependientes en aras de confirmar el papel de dicho sistema en el desarrollo de estas patologías. De modo que estos hallazgos servirían como motivación para el futuro ensayo/diseño de nuevas drogas

menos tóxicas pero igualmente efectivas sobre las dianas a estudio, de modo que permitieran su uso terapéutico en humanos.

En cuanto a la primera parte; confirmar el papel del sistema VEGF en la endometriosis, existen varios trabajos al respecto empleando ratones inmunodeprimidos con implantes de endometrio humano como modelos animales de experimentación en endometriosis. Son referencia fundamentalmente los trabajos de (Hull y cols, 2003) que emplearon dos aproximaciones terapéuticas anti-VEGFR; en primer lugar administraron el receptor soluble del VEGF (sVEGFR1) que consiste en una variante truncada del receptor 1 que carece de dominio transmembrana y que por lo tanto no transduce señal. El sVEGFR21 actuaría como un secuestrador natural del VEGF inhibiendo su actividad, y en segundo lugar administraron un anticuerpo anti-VEGF A que de igual modo bloquea la actividad de VEGF impidiendo su unión a receptores de membrana. En ambos casos, obtuvieron un resultado similar, esto es una disminución significativa en el tamaño y número de los explantes endometriósicos, a la vez que se evidenciaba destrucción vascular (Hull y cols, 2003). De forma similar, Nap y colaboradores, emplearon diversos componentes antiangiogénicos para inhibir lesiones endometriósicas tras el trasplante de endometrio humano en un modelo animal murino (Nap y cols, 2004). A las 2 semanas del tratamiento, tanto un inhibidor específico del VEGF A (**avastin**), como otros potentes inhibidores generales de la angiogénesis (**TPN-470**, **endostatina**, **anginex**) habían disminuido de forma significativa la incidencia de lesiones endometriósicas y la presencia de vasos sanguíneos en estas lesiones respecto a los animales controles cuyos implantes fueron tratados con placebo. No obstante, como hemos comentado anteriormente, estos compuestos tenían efectos indeseables que podían involucrar a muchos procesos fisiológicos, incluyendo la gestación temprana, induciendo la luteólisis a través del bloqueo sobre la angiogénesis ovárica, interfiriendo en la implantación (Wulff y cols, 2001; Zimmermann y cols, 2001, 2003; Pauli y cols, 2005), así como en la angiogénesis a nivel uterino (Rockwell y cols, 2002; Heryanto y cols, 2003).

En cuanto a la segunda parte, la de obtener nuevas terapias menos tóxicas e



igual de efectivas, hasta el momento nadie había dado con el compuesto antiangiogénico con el que tratar las lesiones endometriósicas sin tener que padecer los graves efectos secundarios descritos de los compuestos antiangiogénicos ensayados. En este sentido nos inspiramos y apoyamos en los hallazgos previos de nuestro grupo obtenidos en el estudio de una enfermedad angiogénico-dependiente como el SHO de cara a conseguir el objetivo principal que se recoge en esta tesis. Lo trataremos con más detenimiento en el siguiente punto.

#### **1.10.4 Búsqueda de inhibidores no tóxicos de VEGF/VEGFR2 para el tratamiento de la endometriosis: El ejemplo del SHO**

Como mencionábamos anteriormente, la sucesión cronológica de estudios sobre el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) realizado por nuestro grupo de investigación en el pasado fue inspiradora y ejemplifica como se pueden desarrollar estrategias para la obtención de terapias antiangiogénicas no tóxicas frente a enfermedades VEGF/VEGFR2 dependientes y que además no interfieran con el hecho reproductivo. El SHO es una enfermedad VEGF/VEGFR2 dependiente, y para demostrar la importancia de este sistema en dicha enfermedad, Gómez y colaboradores mostraron que el incremento de la permeabilidad vascular se podía revertir utilizando un anticuerpo específico que bloquea el VEGFR2, el SU5416 (Fong y cols, 1999). Pero debido a los efectos secundarios que producía (tromboembolismo y vómitos), así como la posibilidad de interferir en el desarrollo de la gestación bloqueando la implantación ovario-dependiente y la angiogénesis uterina (Wulff y cols, 2001; Zimmermann y cols, 2001, 2003; Pauli y cols, 2005), este compuesto no pudo ser utilizado para la clínica en el SHO.

Siguiendo con el modelo del SHO, y en un intento por superar los obstáculos ofrecidos por los anteriores agentes ensayados, así como identificar nuevas dianas terapéuticas, empleamos la tecnología microarray para el análisis de los genes que se expresan en estas situaciones patológicas con el fin último de revertir (promoviendo o inhibiendo) los productos de estos genes (proteínas secretadas en exceso o defecto). En dicho estudio, Gomez y colaboradores observaron que el gen

que codifica para la tiroxin-hidroxilasa, un enzima crítico en la síntesis de dopamina, está expresado a la baja en los animales con SHO (Gomez y cols, 2003).

Esto fue de gran interés, ya que se sabía que la Dopamina (DA) ejerce un efecto antiangiogénico al interferir la vía del VEGF/VEGFR2, concretamente esta acción la realizaba a través de su receptor tipo 2, DrD2 (Basu y cols, 2001). En su estudio sobre los cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical, Basu y colaboradores afirmaban que el VEGF unido a su receptor tipo 2 produce la fosforilación del receptor, y que la DA disminuye esta fosforilación al reducir la expresión del VEGFR2 en la superficie de estas células, estimulando su internalización por endocitosis (Basu y cols, 2001).

Por todo ello se decidió investigar el papel que dicho neurotransmisor podría tener sobre el componente vascular de VEGF/VEGFR2. Al ensayar experimentalmente el papel que los análogos dopaminérgicos pudieran ejercer sobre el desarrollo del SHO, Gomez y cols observaron que agonistas del receptor D2 de la dopamina como Bromocriptina y Cabergolina fueron capaces de revertir el proceso de incremento de permeabilidad mediado por la sobreexpresión de VEGF en el SHO (Gomez y cols, 2006). Es importante resaltar en este punto que nuestro grupo confirmó este fenómeno de inhibición de fosforilación de VEGFR2 in-vivo en los ovarios de los animales tratados con cabergolina durante el transcurso de nuestros estudios de SHO.

Además recientemente nuestro grupo, en el ámbito del estudio del SHO ha publicado un trabajo en el que empleando cultivos in-vitro ha reportado que cabergolina disminuye la secreción de VEGF por parte de las células de la granulosa humana luteinizada (Gómez y cols, 2011). Dichos hallazgos implican pues que los agonistas dopaminérgicos D2 como la cabergolina actuarían no solo a nivel de receptor sino también a nivel de ligando disminuyéndolo de cara a ejercer sus efectos antiangiogénicos.

Apenas un año más tarde que en ratones, se ensayó exitosamente la cabergolina como opción terapéutica para el SHO en humanos (Álvarez y cols, 2007).

Posteriormente, se ha visto que también el agonista dopaminérgico quinagolida es capaz de prevenir el SHO moderado o severo en pacientes sometidas a técnicas de fecundación *in Vitro* (Busso y cols, 2010).

Al margen de que los trabajos de Álvarez y Busso demostraban que los hallazgos obtenidos en el modelo animal para el estudio del SHO se podían trasladar al modelo humano, el hecho importante es que se mostraba como se podía inhibir de forma eficaz el sistema VEGF/VEGFR2 de forma no tóxica.

Inspirados por esta experiencia, evaluamos la posibilidad de bloquear el sistema VEGF/ VEGFR2 de forma no tóxica con los agonistas dopaminérgicos en aras de tratar la endometriosis inhibiendo la angiogénesis en las lesiones. De hecho, puesto que la cabergolina, al igual que otros agonistas dopaminérgicos D2, son compuestos sin efectos tóxicos graves sobre humanos, aplicados incluso a mujeres embarazadas como sucede en caso de la hiperprolactinemia, desaparecían las restricciones existentes en cuanto a su potencial uso terapéutico en humanos para el tratamiento del SHO. Sin embargo parecía aconsejable demostrar el papel inhibitorio de estos compuestos sobre el sistema VEGF/VEGFR2 *in-vitro* y evaluar el efecto de los mismos sobre un modelo animal de endometriosis que garantizara mínimamente su uso exitoso en humanos. La consecución de todos estos pasos previos se detalla a continuación.

#### **1.10.6. Uso de agonistas dopaminérgicos en modelos animales de endometriosis.**

Tomando como punto de partida los hallazgos encontrados por Gómez y Álvarez en el modelo del SHO acerca de la acción de los agonistas dopaminérgicos sobre el sistema VEGF/VEGFR2, Novella-Maestre y colaboradores propusieron poner en marcha una nueva línea de investigación. En ésta, usando modelos animales de endometriosis, se podría evaluar si el empleo de los agonistas dopaminérgicos podría ser también útil en para el tratamiento de la endometriosis al disminuir la angiogénesis en las lesiones endometriósicas a través de la inhibición del sistema

VEGF/VEGFR2.

Para que la dopamina o alguno de sus análogos ejerza una acción antiangiogénica sobre el tejido endometriósico de forma directa, parecía lógico pensar que ésta debe unirse al receptor para la DA tipo 2 (DRD2) presente en dicho tejido. Hasta ese momento, el DRD2 no había sido descrito en el endometrio ni en las lesiones endometriósicas del humano. Por ello en un trabajo publicado por Novella-Maestre se puso de manifiesto, por primera vez, la existencia de receptores para la dopamina del tipo 2 en el tejido de tipo endometrial humano, tanto eutópico como endometriósico (Novella-Maestre y cols, 2010). Observaron, asimismo, que la expresión del VEGF y del receptor tipo 2 del VEGF era mucho mayor en las lesiones peritoneales rojas más activas que en las negras y blancas menos activas. En cambio, la presencia de DrD2 en las lesiones endometriósicas era menor cuando mayor era la actividad de ésta, sugiriendo incluso un posible papel del sistema dopaminérgico en la modulación de la endometriosis.

Confirmada la presencia del sistema dopaminérgico en el tejido endometriósico, Novella y cols establecieron un modelo animal heterólogo de endometriosis tras implantar tejido endometrial humano en peritoneo de ratones nude inmunodeprimidos. En este trabajo se demostró que el uso de Cabergolina (Cb2), un agonista dopaminérgico, produce una disminución del tamaño de las lesiones activas y una disminución significativa del índice proliferativo (Novella-Maestre y cols, 2009). Además, las lesiones observadas en los ratones tratados presentaban microscópicamente un estroma más laxo, con menor celularidad y una reducción del componente glandular (Novella-Maestre y cols, 2009). Se pudo observar un aumento de la expresión de los genes que codifican para el DRD2 y un aumento de este receptor en el tejido, que fue tanto mayor cuanto mayor fue la dosis de fármaco. Se comprobó que el uso de Cb2 se asociaba a una disminución en la expresión de los factores proangiogénicos como VEGF y un aumento de la expresión de marcadores anti-angiogénicos como Angiopeptina 1 (Ang-1), (Novella-Maestre y cols, 2009). Finalmente, se confirmó que el nivel de fosforilación del VEGFR-2 fue significativamente menor en los ratones tratados, de acuerdo con los

hallazgos encontrados en el modelo del SHO anteriormente (Gómez y cols, 2006).

En un estudio posterior el grupo de Delgado-Rosas y cols (Delgado-Rosas y cols, 2011) y empleando el mismo modelo animal que Novella y cols, demostró que otro agonista dopaminérgico D2 distinto de la cabergolina como la quinagolida era igualmente eficiente en la disminución de las lesiones endometriósicas confirmando las hipótesis inicial del grupo de Novella et al.

De este modo, los trabajos de Novella-Maestre Y Delado-Rosas y cols se convirtieron en el *proof of concept* sobre el que fundamentaríamos nuestros posteriores intentos de tratar la endometriosis en humanos con compuestos dopaminérgicos. De hecho tras la demostración de los efectos de los agonistas dopaminérgicos sobre la endometriosis en animales, parecía lógico hipotetizar que éstos serían igualmente efectivos en mujeres.

Confirmado este punto, el siguiente punto a decidir era cual de los fármacos agonistas dopaminérgicos D2 existentes en el mercado íbamos a ensayar para evaluar sus efectos sobre la endometriosis en el estudio que pretendíamos llevar a cabo en humanos. Para explicar con mas detalle nuestra elección en este punto, así como algunas particularidades del estudio, hemos considerado necesario incluir una breve descripción de la naturaleza del sistema dopaminérgico, así como de las propiedades de los distintos agonistas dopaminérgicos D2 originalmente empleados para el control de la secreción de la prolactina asociada al desarrollo de la endometriosis, lo cual detallamos a continuación.

## **1.11. Dopamina y análogos.**

### **1.11.1. Dopamina y sus receptores**

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico sintetizado a partir de tirosina y de la dihidroxifenilalanina (DOPA), y que a su vez es precursora en la síntesis de noradrenalina y adrenalina. Es la neurohormona que controla la secreción de prolactina, llamada por algunos factor inhibidor de la prolactina (PIF).

Sabemos que el hipotálamo es el intermediario principal entre los sistemas

nervioso y endocrino, los dos principales sistemas de control del organismo. Regula la hipófisis y la producción hormonal. La función reproductiva del hipotálamo puede resultar alterada por cualquier episodio que sea capaz de modificar la frecuencia o amplitud de la liberación pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). La dopamina es capaz de alterar la liberación de GnRH (Henderson y cols, 2008), por tanto, las sustancias que sean agonistas o antagonistas de estos compuestos podrían modificar la liberación de GnRH, interfiriendo así en la comunicación con la hipófisis.

Diversos estudios llevados a cabo al final de los años 70 revelaron que la dopamina presenta una marcada unión a dos receptores que se conocen como D1 y D2 (Kebabian y Calne, 1979). El receptor D1 (D1R) está unido a proteínas Gs e incrementa los niveles de AMPc, mientras el receptor D2 (D2R) interacciona con proteínas Gi inhibiendo la acumulación de AMPc (Bunzow y cols, 1988; Missale y cols, 1998). Más tarde, otros tres receptores de dopamina han sido caracterizados. Por lo tanto, hoy en día se conocen 5 receptores diferentes que son agrupados en dos subfamilias: La familia-D1, que incluye el D1 y D5, y la familia- D2, que incluye el D2, D3 y D4.

Generalmente, los receptores D1 y D2 poseen altos niveles de expresión y tienen más agonistas y antagonistas selectivos que los receptores D3, D4 y D5 (Missale y cols, 1998). El D2R tiene una elevada expresión en la sustancia nigra, área ventral e hipocampo; mientras que las amígdalas contienen sobretodo D1R y muy poco D2R. Ambos receptores se expresan de forma elevada en el putamen caudal, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio (Mansour y cols, 1990). La presencia de estos receptores ha sido también descrita en las células de la granulosa y del ovario de caballos y ratas (King y cols, 2005; Rey-Ares y cols, 2007) y más recientemente en las células de la granulosa de humanos (Álvarez y cols, 2007; Rey-Ares y cols, 2007).

Los antagonistas más comunes para el D1R son el **butaclamol**, **clorpromazina**, **haloperidol**, **spiperone**, **sulpirida** y **racloprida**, mientras que la **apomorfina**, **bromocriptina**, **pergolida** y **cabergolina** son potentes agonistas del D2R (Missale y cols, 1998).

### **1.11.2. Hiperprolactinemia y endometriosis. Posibilidades terapéuticas.**

La prolactina (PRL) es una hormona hipofisaria que desempeña un papel fundamental en diversas funciones reproductivas, fundamentalmente en la lactancia. En situaciones patológicas que están relacionadas con la presencia de adenomas hipofisarios o ingesta de fármacos psicotropos, los niveles de PRL están elevados y afectan a la función gonadal, pues inhiben la secreción de hormonas hipofisarias como la LH o FSH, ocasionando amenorrea (9%), galactorrea (25%) o ambas (70%) (Josimovich y cols, 1987). La hiperprolactinemia, por lo tanto, es una causa frecuente de infertilidad por anovulación ( Crosignani y cols, 1999), pero el tratamiento de esta patología con agonistas dopaminérgicos ha sido capaz de restaurar la ovulación en el 90 % de los casos Koloszár y cols, 2000).

Numerosos estudios han demostrado que existe una relación entre hiperprolactinemia e insuficiencia lútea en pacientes infértiles con endometriosis (Cunha-Filho y cols, 2001; Gregoriou y cols, 1999). Curiosamente, una hiperprolactinemia espontánea, o tras estimulación con distintos agentes, se ha descrito directamente correlacionada con la severidad de la endometriosis (Gregoriou y cols, 1999; Cunha-Filho, 2002).

Sabemos que la PRL es un potente inductor de la angiogénesis y eso se observa fisiológicamente en la decidua durante la implantación y en la mama durante el embarazo (Reese y cols, 2000). Experimentalmente, también en otros tejidos, como el músculo, la PRL induce la angiogénesis (Ko y cols, 2003; Malaguenera y cols, 2002). La PRL tiene su efecto proangiogénico a través de receptores en los vasos (Merkle y cols, 2000) y no en el endometrio, como otros han fracasado en demostrar (Martinez y cols, 2002).

El fármaco de eficacia demostrada para la hiperprolactinemia es la **bromocriptina**, un agonista dopaminérgico cuyo uso para el tratamiento de estos casos fue aprobado en 1978 (Vance, 1984) y desde entonces se ha utilizado ampliamente con excelentes resultados. La bromocriptina es capaz de inhibir la

síntesis y secreción de prolactina al unirse a los receptores lactotrópicos D2 (Thorner y cols, 1980; Espinos y cols, 1994). Este agonista administrado por vía oral a dosis diarias de 2.5 - 7.5 mg normaliza la PRL en un 80 - 90% de los pacientes (Morange y cols, 1996; Colao y cols, 1997), recupera la función gonadal y disminuye el tamaño tumoral en el 60% de los casos al afectar la vascularización de la glándula y por efecto antimitótico (Colao y cols, 1997; Wass y cols, 1982; Chiodini y cols, 1981).

El problema que presenta la bromocriptina para el tratamiento de la hiperprolactinemia es que su acción es de corta duración, necesiéndose en algunos casos 3 dosis diarias para mantener niveles normales de prolactina. Esto supone un problema para aquellas pacientes que sean resistentes o no toleren los efectos secundarios de bromocriptina como la hipotensión ortostática, mareos o náuseas.

La **cabergolina** ha demostrado ser más efectiva, menos tóxica y mejor tolerada que la bromocriptina (Webster y cols, 1994). Es capaz de normalizar los niveles de PRL y restaurar la función gonadal en 70% de los pacientes resistentes a bromocriptina y ergolina, así como de disminuir el tamaño de la masa tumoral (Colao y cols, 1997; Ciccarelli y cols, 1989; Ferrari y cols, 1986).

La **quinagolida** es un inhibidor específico de la secreción de prolactina con una larga duración de acción, efectivo en el tratamiento de la hiperprolactinemia y de sus manifestaciones clínicas como la galactorrea, oligomenorrea, amenorrea e infertilidad. También se utiliza en el tratamiento de los adenomas hipofisarios. Es un agonista selectivo de los receptores D2 de dopamina, estructuralmente diferente de los agonistas tradicionales derivados de la ergotamina o ergolina. Debido a su acción dopaminérgica, este fármaco ejerce un potente efecto inhibitor sobre la secreción de la prolactina. En los animales de laboratorio no se han observado evidencias de embriotoxicidad o de efectos teratogénicos, y de hecho es el agente reductor de la prolactina hoy en día más recomendado en pacientes gestantes o que desean gestación, cuando la bromocriptina no se puede administrar (por intolerancia al fármaco, efectos secundarios, etc.)



### **1.11.3. Restricción en el uso de los agonistas dopaminérgicos.**

Los agonistas de la dopamina se dividen en derivados no ergóticos y ergóticos.

- a) **Los derivados no ergóticos:** son la apomorfina, piribendil, quinagolida, opinirol y pramipexol, actúan sobre los receptores 1, 2 y 3 de la dopamina.
- b) **Los derivados ergóticos:** son derivados de la ergocriptina, estimulan los receptores 1 y 2 de la dopamina. La bromocriptina es el más conocido y el prototipo del grupo, mientras que pergolida y lisurida son ergolinas que carecen de cadena peptídica. La cabergolina es un derivado de acción prolongada con una acción más selectiva sobre los receptores 2 de la dopamina.

El único derivado no ergótico utilizado en clínica es la **quinagolida**. Se une más selectivamente a los receptores D1 y D2 dopaminérgicos y no presenta reacción cruzada con los receptores adrenérgicos o serotoninérgicos.

En Junio del 2008, la *European Medicines Agency* (EMA) emitía un comunicado en el que hacía públicas las conclusiones alcanzadas por el *Agency's Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP) acerca del uso y seguridad de los agonistas dopaminérgicos del grupo derivados ergóticos en relación con el riesgo de fibrosis, particularmente a nivel cardíaco, generado por su uso crónico. Según la revisión sistemática realizada por este organismo, el riesgo de fibrosis, que se trata de un efecto secundario de derivados ergóticos ya conocido, aumenta sustancialmente en los pacientes que reciben tratamientos crónicos con estos fármacos. Esta fibrosis se produce por la activación de los receptores 5HT<sub>2B</sub>, que induce la proliferación de fibroblastos y la aparición de fibrosis. Además, como el riesgo de fibrosis no aparece de la misma forma en todos los fármacos de este grupo, las recomendaciones que establece son individualizadas para cada fármaco, y son las siguientes:

- a. **Cabergolina y Pergolida:** El riesgo de fibrosis valvular cardíaca está bien establecido. Por tanto, estos fármacos están contraindicados en pacientes

con problemas valvulares cardíacos. Serán prescritos únicamente para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en aquellos pacientes que no puedan tomar otros tratamientos. Además, las medidas de control del tratamiento incluirán: 1) ecocardiografía de control antes de iniciar el tratamiento, y periódicamente durante éste para descartar o detectar precozmente la aparición de fibrosis; 2) dosis máxima diaria de 30 mg; 3) considerar e informar que la fibrosis cardíaca es un efecto secundario muy frecuente de estos dos fármacos (visto en más de 1 de cada 10 pacientes).

- b. **Bromocriptina, lisurida y dihidroergocriptina:** En todos estos fármacos se deberá advertir el riesgo de fibrosis valvular cardíaca en pacientes con tratamientos crónicos y a dosis altas. En el caso de la dihidroergocriptina y la bromocriptina, se contraindican en pacientes con problemas valvulares, y en la última, se restringe la dosis máxima a 30 mg/día.

Así pues, a la luz de las recomendaciones lanzadas por la CHMP en 2008 no parecería conveniente ensayar el uso de cabergolina, el agonista utilizado en el modelo experimental de Novella et (Novella y cols, 2009), u otros derivados ergóticos para su posible uso en humanos, ya que, como hemos comentado anteriormente, la endometriosis es una enfermedad crónica, y por consiguiente, requiere un tratamiento crónico o a largo plazo. El hecho que la cabergolina hubiese demostrado causar fibrosis valvular cardíaca en un elevado número de pacientes sometidos a este fármaco en régimen continuo y prolongado, desaconsejaba por completo su posible uso como tratamiento de la endometriosis.

#### **1.11.4. Justificación del diseño experimental y del uso de la quinagolida como agonista dopaminérgico en nuestro trabajo.**

En virtud de los estudios proof of concept de Novella et al y Delgado-Rosas y cols en modelos animales, la baja toxicidad de estos compuestos en humanos nos hizo

plantearnos el uso de agonistas dopaminérgicos para el tratamiento de las lesiones en mujeres afectas por endometriosis.

Se espera que el mecanismo de acción efectivo implique, mediada por interferencia con el sistema VEGF/VEGFR2, una inhibición de la angiogénesis llevando a una reducción del tamaño de las lesiones endometriósicas peritoneales en humanos.

- En cuanto a la elección del agonista dopaminérgico para el estudio a la luz de las recomendaciones lanzadas por la CHMP en 2008 nos decantamos por **Quinagolida** para realizar nuestro trabajo. La quinagolida es un agonista dopaminérgico derivado no ergótico que actúa mediante su unión de forma selectiva a los receptores de la dopamina D2. No posee actividad sobre el receptor 5-HT2b, por lo que no presenta riesgo de fibrosis como el grupo de los agonistas ergóticos. Además, la quinagolida presenta características farmacocinéticas que constituyen una ventaja frente al uso de cabergolina, ya que tiene una vida media más corta (de aproximadamente 17 horas en la quinagolida frente 63-69 horas en la cabergolina). Esto minimizaría la exposición al fármaco durante el período de organogénesis en las mujeres que deseen gestación.
- A pesar de que la quinagolida tiene un perfil toxicológico muy benigno y se use de manera rutinaria en la clínica incluso en mujeres embarazadas, los agonistas dopaminérgicos no tienen una indicación probada para el tratamiento de la endometriosis. Para evitar que la Agencia Estatal del Medicamento (AEM) desaprobara nuestro estudio decidimos llevarlo a cabo únicamente en mujeres con endometriosis con niveles de PRL por encima de la normalidad y por lo tanto subsidiarias de tratamiento médico con agonistas dopaminérgicos por hiperprolactinemia

En conclusión, en virtud virtud de los estudios proof of concept (Novella-Maestre y cols, 2009, Delgado-Rosas y cols, 2011) en el modelo animal y puesto que la quinagolida es el agonista dopaminérgico que presenta un perfil farmacocinético y de efectos secundarios más favorable; nos planteamos ensayar el efecto de dicho agonista sobre mujeres hiperprolactinémicas con endometriosis en el estudio que se detalla en esta tesis doctoral a continuación.

## **2 HIPÓTESIS**



La administración del agonista dopaminérgico quinagolida es capaz, mediante su acción sobre el VEGF/VEGFR-2, de reducir la angiogénesis en las lesiones endometriósicas humanas contribuyendo de esta forma a la reducción o eliminación de las mismas.





### **3. OBJETIVOS**



### **3.1. Objetivo primario.**

Evaluar el efecto del tratamiento con quinagolida sobre el tamaño de las lesiones endometriósicas peritoneales en mujeres hiperprolactinélicas con endometriosis.

### **3.2. Objetivos secundarios.**

- Evaluar el efecto de la quinagolida sobre:
  - La morfología histológica de las lesiones endometriósicas peritoneales.
  - La angiogénesis, desde el punto de vista de la vascularización y la proliferación vascular en las lesiones.
  - La expresión, producción y regulación de VEGF/VEGFR2 como medidor principal de la angiogénesis en las lesiones.
  - La expresión global en lesiones endometriósicas de otros factores implicados en la angiogénesis.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4.1 Diseño del estudio.**

Se trata de un ESTUDIO PROSPECTIVO PILOTO DE PRUEBA DE CONCEPTO en humanos aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset (Código CEIC: 52/07).

Los centros que participaron en el estudio fueron el Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia, en el que tuvo lugar la selección de pacientes, las intervenciones quirúrgicas y toma de muestras, tanto de tejido endometriósico como extracciones sanguíneas, así como el proceso de seguimiento clínico y analítico; y por otra parte La Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia, donde tuvo lugar el procesamiento de las muestras de tejido endometriósico, su análisis histológico e inmunohistoquímico, y pruebas de biología molecular.

El estudio se realizó en un período comprendido entre Septiembre del 2007 y Junio del 2010.

Todas las pacientes firmaron el Consentimiento Informado de participación en el estudio tras las pertinentes explicaciones acerca de los procedimientos a realizar, previamente a su inclusión.

### **4.1.1. Criterios de inclusión:**

- Mujeres con sospecha de endometriosis debido a la presencia una o más de las siguientes situaciones:

- Mujeres con esterilidad de origen desconocido (EDO). Ésta se define como aquélla que no permite la concepción sin llegar a conocer una causa clara de su origen, tras haber completado los estudios básicos a los que se somete una pareja estéril (Speroff y Fritz, 2006).
- Dismenorrea secundaria de más de un año de evolución, coitalgias (dolor con las relaciones sexuales) o cualquier otro síntoma que hiciese sospechar la existencia de una endometriosis.
- Mujeres con ecografías que documentasen la presencia de endometriomas.

En todas estas pacientes estaría indicada la realización de una laparoscopia diagnóstica. Además, en caso de confirmarse la presencia de endometriosis durante esta primera cirugía, estas mujeres se beneficiarían de una segunda laparoscopia de *second-look* debido al elevado riesgo de formación de adherencias en este tipo de pacientes.

- Índice de masa corporal  $< 25 \text{ kg/m}^2$ .
- Hiperprolactinemia recién diagnosticada (PRL  $> 30 \text{ ng/ml}$ ), obtenida mediante una extracción, y determinada por técnicas de enzima-inmunoensayo, excluyendo la macroprolactinemia con Polietilenglicol 6000 (PEG-6000).
- No haber recibido ningún tratamiento para la endometriosis o cualquier tratamiento anticonceptivo hormonal durante los seis meses previos a la realización de la primera laparoscopia, ni tampoco durante el seguimiento, al menos hasta después de la segunda laparoscopia.
- Presentar al menos 4 lesiones endometriósicas peritoneales rojas, consideradas como marcador de enfermedad activa, diagnosticadas durante la primera laparoscopia, y que estuviesen situadas a más de 2 cm unas de las otras.

#### **4.1.2 Criterios de exclusión:**

- Cualquier contraindicación para someterse a cirugía laparoscópica.
- Contraindicación para el uso de agonistas dopaminérgicos, en concreto la quinagolida (hipersensibilidad al fármaco, insuficiencia renal o hepática, lactancia).
- Haber recibido tratamiento para la endometriosis o cualquier tratamiento hormonal para planificación familiar durante los seis meses anteriores a la inclusión de las pacientes en el estudio.



### **4.1.3. Etapas del estudio:**

- **PRIMERA ETAPA:**

En la primera parte del estudio, las pacientes seleccionadas fueron sometidas a una primera laparoscopia (L1), realizada según procedimiento habitual, el cual se describirá más adelante, y grabada en vídeo. Todas ellas se realizaron en la fase folicular del ciclo, entre el día 1 y 13 del ciclo menstrual. El grado de severidad de la enfermedad fue establecido según la Clasificación Revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, 1997). Durante esta laparoscopia, se identificaron, previo a la manipulación quirúrgica del resto de lesiones, al menos cuatro lesiones peritoneales rojas, separadas entre sí al menos 2 centímetros. Aquellas mujeres en las cuales no fue posible la identificación de dichas lesiones fueron descartadas del estudio.

Durante la cirugía, la mitad de estas lesiones peritoneales (2 lesiones) identificadas fueron marcadas con una sutura de seda irreabsorbible. El punto de sutura se colocó a un centímetro de distancia de la lesión para evitar que el proceso inflamatorio asociado a la sutura como cuerpo extraño, interfiriese en el posterior análisis del tejido endometriósico peritoneal que pretendíamos realizar. El resto de lesiones peritoneales identificadas de interés fue extirpado y procesado para análisis como detallaremos más adelante. En cuanto al resto de lesiones no identificadas como de interés para el estudio fueron extirpadas y remitidas a estudio anatomopatológico para confirmación histológica.

Tras la laparoscopia, y aún bajo los efectos de la anestesia general, se tomó una biopsia endometrial para confirmar que la paciente se encontraba en fase proliferativa del ciclo menstrual. De esta forma, podíamos confirmar que todas las mujeres se encontraban en la misma fase del ciclo en el momento de la laparoscopia y la toma de las biopsias peritoneales. De este modo evitábamos las diferencias que pudiese haber en los tejidos debidas al influjo hormonal según la fase del ciclo menstrual.

Previamente a la cirugía, y en todos los casos con la paciente en ayunas de más de 8 horas, se tomó una muestra de sangre. En ella se determinó niveles de Ca 125 (expresado en UI/mL), niveles de prolactina (expresado en ng/mL), así como niveles hormonales (FSH (expresado en mUI/mL), LH (expresado en mUI/mL), Estradiol (expresado en pg/mL) y Progesterona (expresado en ng/mL)), para comprobar que todas las pacientes estaban en la misma fase del ciclo en el momento de la cirugía (fase proliferativa). Las determinaciones se realizaron todas mediante la técnica del enzima-inmunoensayo; en el caso del Ca 125 mediante ensayo inmunométrico con dos sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida (Inmulite 2000®). El resto de parámetros mediante inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes (Architec i2000®).

- **SEGUNDA ETAPA:**

La segunda fase del estudio se inició tras la recuperación postoperatoria. Las pacientes aptas para el estudio eran citadas en la consulta una semana después de la cirugía. Allí se les prescribía el tratamiento con quinagolida (Norprolac ®, Laboratorio Farmacéutico Ferring, Madrid, España) de acuerdo con la posología recomendada para dicho fármaco en pacientes hiperprolactinémicas.

Los comprimidos de quinagolida se debían ingerir oralmente con los alimentos una vez al día al acostarse.

El régimen de tratamiento de la quinagolida seguía una pauta de titulación. El tratamiento comenzaba con un comprimido de 25 µg al día durante los primeros 15 días, seguidos de 50 µg al día (2 comprimidos de 25 µg) los siguientes 15 días. A partir del primer mes, la dosis era de 75 µg al día, la cual se mantenía hasta finalizar el período de tratamiento para el estudio, hasta completar las 18-20 semanas. Este régimen de dosis progresivas se utilizaba para minimizar los efectos adversos al fármaco y evitar la intolerancia a la medicación.

A partir de este momento, se realizaba un seguimiento estrecho de las pacientes. Éste consistía en una visita mensual en la cual se realizaba una anamnesis completa para

evaluar su estado general, comprobar la correcta cumplimentación y recoger los datos acerca de la aparición de efectos adversos a la medicación. Se recogían tanto aquellas reacciones adversas leves, como aquéllas que aconsejasen abandonar la toma del fármaco. Entre los efectos adversos descritos del fármaco, los más frecuentes (>10%) son los mareos, las náuseas y vómitos, cefalea y fatiga. Otros efectos secundarios menos frecuentes (1-10%) son la anorexia, dolor abdominal, estreñimiento o diarrea, insomnio, congestión nasal e hipotensión. En esta visita mensual también se realizaba una exploración física general y se obtenía sangre de las pacientes para determinar niveles de Ca 125 y de prolactina. Con esta última determinación podíamos comprobar de forma indirecta la cumplimentación del tratamiento con el agonista dopaminérgico.

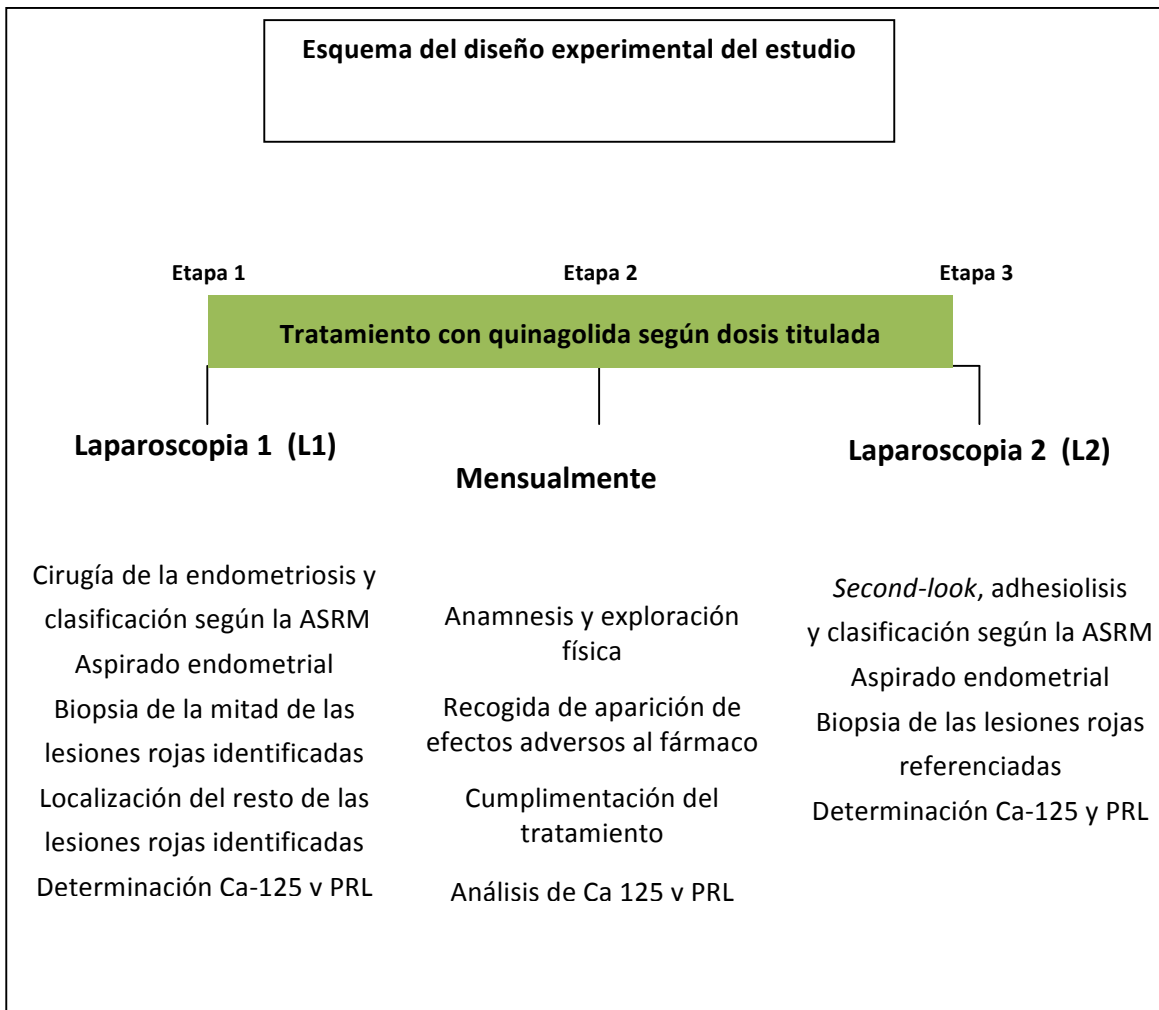
- **TERCERA ETAPA:**

Transcurridos las 18-20 semanas de tratamiento, se realizaba la segunda laparoscopia. Al igual que la primera cirugía, se grabó en vídeo todo el procedimiento. En esta segunda laparoscopia, se examinó la cavidad pélvica y abdominal, se realizó adhesiolisis de las adherencias, y se procedió a la exéresis de las lesiones peritoneales identificadas y marcadas mediante sutura irreabsorbible durante la primera laparoscopia. Además, se realizó una nueva clasificación de las lesiones remanentes según la Clasificación Revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, 1997).

Al igual que durante la primera laparoscopia, se tomó una muestra de aspirado endometrial para verificar la fase proliferativa del ciclo mediante estudio histológica por parte del anatomopatólogo. Se determinaron también niveles hormonales de FSH, LH, Estradiol y Progesterona con este mismo objetivo.

Asimismo, se tomó una muestra de sangre para determinación de Ca 125 y prolactina previa a la cirugía.

El diseño global del estudio se ilustra a continuación.(Fig 6)



**Fig 6.** Esquema del diseño experimental del estudio en el que se muestran las tres etapas fundamentales de éste. Una primera etapa de cirugía, identificación de lesiones y recogida de muestras (enfermedad endometriósica, lesiones identificadas, muestra endometrial mediante biopsia). Una segunda etapa de administración del fármaco a estudio, así como seguimiento mensual de las pacientes para detectar efectos adversos graves. Una tercera etapa de cirugía, exéresis de las lesiones referenciadas y nuevamente recogida de muestra por biopsia endometrial. A lo largo del todo el seguimiento, tuvo lugar un seguimeinto de la enfermedad mediante marcador tumoral Ca125 y ecografía, evolución de la hiperprolactinemia mediante determinación sanguínea mesual, y contacto directo con las pacientes con el fin de detectar efectos farmacológicos adversos.

## **4.2 Diseño experimental del estudio.**

Las pacientes incluídas en el trabajo de esta tesis doctoral fueron seleccionadas en la consulta de Ginecología del hospital Dr Peset según los criterios de inclusión expuestos anteriormente. Para ello, ante una mujer que cumpliera los criterios expuestos con anterioridad se solicitó una analítica general con hemograma, pruebas de coagulación, marcadores tumorales de ovario (Ca 125, Ca 19.9, BHCG, alfa-fetoproteína) como protocolo en nuestro hospital, y una determinación de PRL. Sólo las mujeres con niveles de PRL > 30 ng/ml fueron incluídas en el estudio, ya que este es el valor límite considerado como normal por nuestro laboratorio. Este hecho se debe a que la quinagolida es un fármaco agonista dopaminérgico utilizado para tratar las hiperprolactinemias. Su efecto anti-angiogénico sobre las lesiones endometriósicas no se encuentra dentro de sus indicaciones actuales, por lo que para justificar su uso, las pacientes debían presentar una hiperprolactinemia subsidiaria de tratamiento médico, tal y como hemos descrito en el apartado de la introducción.

Tras inclusión en el estudio y firma del Consentimiento Informado, las pacientes fueron puestas en lista de espera quirúrgica para la Unidad de Cirugía Sin Ingreso (UCSI).

### **4.2.1 Obtención de muestras para control interno del estudio.**

Con la finalidad de demostrar que todas las exploraciones se realizaron en la misma fase del ciclo menstrual para evitar los cambios en las muestras debidos al diferente influjo hormonal, se tomaron muestras de endometrio. Con este mismo objetivo se realizaron determinaciones hormonales de FSH, LH, Estradiol y Progesterona durante las dos cirugías. Asimismo, para confirmar de forma indirecta la cumplimentación del tratamiento, se realizaron una serie de determinaciones sanguíneas de prolactina.

#### **4.2.1.1 Obtención y procesamiento de tejido endometrial.**

Las muestras de tejido endometrial se obtuvieron tras la cirugía laparoscópica, todavía bajo anestesia general, mediante aspirado endouterino con cánula de Cournier transcervical (Prodimed, Neuilly-en-Thelle, Francia). Estas biopsias de endometrio fueron lavadas con PBS en placa de Petri, retirando en la medida de lo posible el moco y la sangre coagulada que pudiese aparecer entre el tejido, y se introdujeron en un tubo con paraformaldehído al 4% para su posterior análisis histológico que nos permitiría confirmar la fase proliferativa del ciclo en todas las pacientes en el momento de cada intervención.

#### **4.2.1.2 Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas.**

Para confirmar la adherencia al tratamiento de las pacientes realizamos en cada uno de los controles una anamnesis dirigida, preguntando explícitamente acerca de la correcta toma de los comprimidos. Al margen de ello, y como método indirecto de comprobación empleamos la determinación sanguínea de prolactina en diferentes etapas del estudio. El motivo es que una correcta toma del medicamento se traduce analíticamente en un descenso de los niveles de prolactinemia, que se mantienen en el tiempo si no se interrumpe el tratamiento.

Se determinaron niveles de PRL en diferentes etapas del estudio y seguimiento:

- Previa a la inclusión del estudio, como hemos señalado anteriormente, por suponer un requisito indispensable el presentar niveles hormonales por encima de 30 ng/ml.
- El día de la primera cirugía, el cual nos serviría de determinación basal con la que comparar los siguientes valores.
- En cada una de las visitas mensuales.
- El día de la última laparoscopia, considerada determinación final.

Al mismo tiempo se determinó el marcador tumoral de Ca 125, como marcador conocido en clínica de respuesta al tratamiento de la endometriosis.

Finalmente, se determinaron niveles en sangre de FSH, LH, Estradiol y Progesterona en día de las cirugías.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa sobre la vena basílica localizada en la flexura del codo con aguja de 20 G (BD Microlance™ 3, Becton Dickinson S.A., Huesca, España) conectada a jeringa de 10 ml (BD Discardit™ II, Becton Dockinson S.A., Huesca, España) y con la paciente en reposo. La muestra se remitió a laboratorio en 2 tubos de gelosa (BD Vacutainer® SST™ II *Advance*, BD Plymouth. PL6 7BP, UK), conteniendo cada unos de ellos 5 ml de sangre venosa. Inmediatamente se remitieron al laboratorio de bioquímica del Hospital Peset, a la sección de hormonas-marcadores tumorales, dónde se procesaron según técnica la técnica descrita más adelante en el apartado correspondiente.

#### **4.2.2 Determinación del tamaño de las lesiones mediante laparoscopia:**

El objetivo principal del estudio fue analizar los cambios macroscópicos experimentados en las lesiones endometriósicas peritoneales tras la administración del agonista dopaminérgico quinagolida. Durante la primera laparoscopia, la mitad de las lesiones identificadas fueron referenciadas previamente al tratamiento, para comprobar si durante el mismo se producía una reducción de tamaño o su eliminación, observable durante una segunda laparoscopia.

Para ello, se grabaron ambas cirugías en cada caso con una cámara de laparoscopia Karl Storz 20221130 con procesador Tricam SL II 202230 20 (Munich, Alemania). Tras la cirugía se visualizaron los vídeos con el objetivo de obtener los fotogramas adecuados para realizar mediante análisis de imagen cuantitativo las comparaciones entre las dos laparoscopias. Para poder tener una medida objetiva de las imágenes laparoscópicas, se utilizó como objeto de referencia durante la cirugía una pinza laparoscópica con punta roma, cuyo tamaño conocíamos (10mm). De esta forma, las lesiones eran fácilmente medibles de forma objetiva. Así, se capturaron los fotogramas en los que la pinza se situaba al lado de la lesión y permitía hacer un

estudio macroscópico del tamaño de las lesiones, tanto antes como después del tratamiento.

#### **4.2.3 Obtención y procesamiento de muestras de lesiones peritoneales:**

Como se ha comentado anteriormente, se obtuvieron muestras procedentes de lesiones peritoneales con la finalidad de analizar los efectos del fármaco quinagolida sobre el tejido endometriósico en base a diversos parámetros que detallaremos más adelante.

Las lesiones peritoneales se obtuvieron mediante cirugía laparoscópica. El procedimiento se realizó en todos los casos según técnica habitual. La anestesia utilizada en todos los casos fue anestesia general. Los procedimientos laparoscópicos fueron realizados por parte de dos cirujanos experimentados, los mismos en todos los casos. Todas las cirugías fueron grabadas en vídeo.

Con la paciente colocada en posición de Trendelenburg, tras la asepsia del campo quirúrgico, sondaje vesical con Sonda de Foley de 16 Fr (Kendall, Curity™, Kangar, Malaysia), y tallado, se realizó una incisión a nivel umbilical de 1,1cm de longitud. A través de una aguja de Veress (Endopath®, Ethicon endo-surgery, Guaynabo, Puerto Rico, USA. 2007) se introdujo dióxido de carbono para crear un neumoperitoneo, hasta alcanzar los 15 mmHg de presión intraabdominal. A continuación se colocó el trócar umbilical para la entrada de la óptica o laparoscopio, con un calibre de 11mm (TERNAMIAN EndoTIP™, Karl Storz, Tuttlingen, Alemania), bajo visión directa con el laparoscopio de 10mm de calibre (Karl Storz, Tuttlingen, Alemania). Tras evidenciar por visión directa la presencia de endometriosis, en todos los casos (N=12), se introdujeron tres trócares más, uno de 10mm de calibre (Versaport™ 10mm, Tyco Healthcare, Gosport, UK) a través de una incisión en fosa ilíaca izquierda, y dos de 5mm de calibre (Versaport™ 5mm, Tyco Healthcare, Gosport, UK) a través de incisiones en fosa ilíaca derecha y 4cm a nivel supraumbilical. Tras ello, y a una presión intraabdominal de 12-13mmHg, se realizaron los procedimientos quirúrgicos indicados según los hallazgos. En los casos



en los que la paciente presentaba algún quiste ovárico, se procedió a su quistectomía, realizándose mediante incisión con tijera laparoscópica de 3 mm (CLICKLINE, Karl Storz, Tuttlingen, Alemania) en frío sobre corteza ovárica y posteriormente disección de la cápsula del quiste mediante tracción contra-tracción. En caso de adherencias, se realizó disección de éstas mediante tracción roma. Las lesiones peritoneales se resecaron mediante corte en frío con tijera laparoscópica.

#### **4.2.3.1. Procesado de las muestras obtenidas por laparoscopia:**

Las muestras de lesiones endometriósicas peritoneales obtenidas por laparoscopia fueron separadas en dos grupos en el momento de su obtención, siempre bajo condiciones de esterilidad.

Por una parte, el 75% de cada lesión se fijó en paraformaldehído al 4% para su análisis histológico e inmunohistoquímico cuantitativo. Mediante la histología tratamos de confirmar el diagnóstico de endometriosis y evaluar los cambios producidos a este nivel. Mediante inmunohistoquímica de diversos marcadores y posterior cuantificación de los mismos pretendimos analizar los cambios ocurridos por el efecto de la quinagolida sobre diferentes parámetros como la vascularización, cuantificación de vasos inmaduros, la proliferación celular, la expresión del Receptor 2 de la dopamina (DrD2) y la expresión y actividad del receptor tipo 2 del VEGF (VEGFR2).

El resto del tejido, aproximadamente el 25%, fue colocado en una placa Petri sobre hielo e inmediatamente lavado de sangre y moco en PBS (Phosphate Buffered Saline) frío estéril. Se utilizó en todo momento material estéril y puntas con filtro para evitar posibles contaminaciones o factores que pudiesen comprometer la integridad del ARN. A continuación el tejido fue homogeneizado sobre 1 ml de Trizol (Invitrogen, City, USA) por cada 50-100 mg de tejido para posteriormente ser transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 ml criopreservado en nitrógeno líquido a -196°C hasta el momento de la extracción de RNA, previo a la realización de las

pruebas de biología molecular empleadas para determinar los cambios ocurridos sobre la expresión molecular de los factores angiogénicos implicados en la vascularización de las lesiones estudiadas.

### **4.3 Metodología empleada.**

#### **4.3.1 Análisis serológico.**

Las muestras de sangre para determinación PRL, FSH, LH, Estradiol, Progesterona y Ca 125 se remitieron al laboratorio del Hospital Dr peset.

En el caso de la PRL, se determinó mediante técnicas de enzima-inmunoensayo, excluyendo la macroprolactinemia con Polietilenglicol 6000 (PEG-6000), en concreto se realizó un inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes (Architec i2000®). Los valores se expresaron en ng/ml.

Las determinaciones de FSH, LH, Estradiol y Progesterona se realizaron también mediante técnica de enzima-inmunoensayo, y al igual que la PRL, a través de inmunoanálisis de micropartículas quimioluminiscentes (Architec i2000®). Los resultados se expresaron, en el caso de la FSH y LH, en UI/ml, el Estradiol se expresó en pg/ml, y la Progesterona en ng/ml.

En el caso del Ca 125 , también se realizó a través de técnicas de enzima-inmunoensayo. En este caso mediante ensayo inmunométrico con dos sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida (Inmulite 2000®). Los valores se expresaron en UI/ml.

#### **4.3.2 Análisis macroscópico.**

Para analizar de forma objetiva la reducción total de superficie de tejido endometriósico obtenido tras la administración de la quinagolida, consideramos todas

las lesiones globalmente. Analizamos la superficie de éstas antes y después del tratamiento, expresando el resultado en % de reducción de superficie de la segunda lesión respecto la primera. Para ello, se visualizaron los vídeos tras las laparoscopias obteniendo varios fotogramas en cada caso, procurando que la lesión fuese claramente visible y además se situara adyacente a ella un objeto de tamaño conocido, como la punta de una pinza quirúrgica, cuyas medidas conocemos (10 mm). Se seleccionó de cada caso el fotograma de mayor resolución, en el que la lesión se distinguiese con mayor claridad, situada en el mismo plano junto a la punta de pinza laparoscópica. Asimismo, se seleccionó una imagen de la misma lesión o área procedentes de la misma paciente tomadas durante la segunda laparoscopia, en las mismas condiciones anteriormente señaladas. El análisis de los fotogramas se realizó mediante el software de procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 6.03 (Media Cybernetics, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). En síntesis, se utilizó la imagen de la pinza laparoscópica cuyo tamaño es conocido para calibrar el software de manera que pudiera medir automáticamente a partir de dicha referencia cualquier área o perímetro delimitado por nosotros manualmente sobre la foto. De este modo una vez seleccionada la imagen de cada lesión a partir de los fotogramas se superponían sobre ésta líneas trazadas por nosotros que delimitaran el perímetro de la misma. A partir de los datos de calibración, aportados por nosotros en función del tamaño de la pinza, el programa calculaba automáticamente el perímetro real de las líneas trazadas por nosotros en la imagen, obteniendo así la superficie incluida dentro de las líneas de perímetro, o lo que es lo mismo, la superficie de la lesión a estudio.

### **4.3.3 Análisis microscópico.**

Todas las muestras biológicas obtenidas en este trabajo fueron evaluadas a nivel microscópico con el fin de evidenciar por un lado la presencia de endometriosis en las lesiones peritoneales, y por otro lado, confirmar la fase proliferativa del ciclo menstrual sobre las biopsias de endometrio. Para ello fue necesario tratar las muestras de forma adecuada para obtener bloques histológicos que permitiesen

llevar a cabo tanto los análisis histológicos como el resto de análisis inmunohistoquímicos que detallaremos más adelante. Con este fin, las muestras fueron sometidas al protocolo de inclusión, corte y tinción que se describe a continuación.

### **4.3.3.1 Preparación de las muestras.**

#### **4.3.3.1.1. Fijación.**

Todos los tejidos, una vez extraídos del organismo vivo, sufren dos tipos de procesos degradativos: autólisis (acción de enzimas intracelulares, es decir, autodigestión) y putrefacción (acción bacteriana). Además, el procesamiento histológico posterior del tejido para poner de manifiesto y observar determinadas estructuras, supone una metodología que puede degradar las estructuras tisulares. La fijación del tejido preserva sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas posible a las que poseía en estado vivo, para permitir su observación al microscopio tras determinadas técnicas de tinción y marcaje.

Utilizamos un fijador de base aldehídica, el paraformaldehído (PFA), que actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares. Se utiliza a concentraciones próximas al 4%. Normalmente se usa en solución tamponada e isotónica, por lo que su dilución final al 4% fue llevada a cabo con tampón fosfato salino (PBS).

Nuestras muestras biológicas fueron fijadas por inmersión en PFA 4% durante toda la noche en nevera para mantener una temperatura de aproximadamente 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, los tejidos fueron lavados en PBS y a continuación fueron incluidos en parafina como se detalla a continuación.

#### **4.3.3.1.2. Inclusión en parafina.**

Por lo general, los tejidos son estructuras blandas y frágiles, aunque el fijador utilizado aumente la dureza del tejido, éstos son demasiado blandos y resultarían despedazados al tratar de cortarlos finamente, por lo que previo a la obtención de los cortes fue necesario incluirlos en un medio de soporte. Los medios más utilizados son las ceras o resinas, los cuales en estado líquido tienen la capacidad de penetrar y envolver el tejido, produciendo su endurecimiento por enfriamiento o polimerización. El objetivo de la inclusión es facilitar la sección del tejido a cortes lo suficientemente finos como para permitir el paso de la luz y ser examinados mediante el microscopio. El medio utilizado por nosotros para este fin ha sido la parafina, la cual al ser hidrófoba necesita la extracción previa del agua presente en los tejidos a través de un medio intermedio miscible para poder agregarse a los intersticios del tejido, el xilol, el cual posteriormente es sustituido por parafina. Este proceso de parafinación se puede resumir en los siguientes pasos:

#### **4.3.3.1.2.1 Deshidratación.**

Los tejidos vivos poseen una gran cantidad de agua, lo que evita la impregnación de medios de inclusión como la parafina, que como hemos comentado anteriormente, es hidrófoba, por lo tanto, hay que eliminar el agua de los tejidos. Este paso conllevó el tratamiento de los tejidos por soluciones acuosas de etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) en escala creciente (dos pases de 70%, 95%, 95%, 100% y 100% durante 15 minutos cada pase). El alcohol elimina el agua debido a que posee un grupo hidroxilo (-OH) que reacciona con el agua, eliminándola del tejido. Esta escala creciente se utiliza para evitar una rápida salida del agua que se produciría si se sumerge el tejido directamente en etanol absoluto y que podría alterar la morfología del tejido.

#### **4.3.3.1.2.2 Aclaramiento o diafanización.**

Este paso es denominado aclaramiento porque los tejidos cambian su índice de refracción, volviéndose más transparentes. Para esto se necesita

una sustancia que sea miscible tanto en el agente deshidratante (el alcohol) como en el medio de inclusión (la parafina). En este caso, el agente elegido fue el xilol, también conocido como xileno. Para el procesamiento de muestras, se sumergieron los tejidos en una solución de xilol, dando dos pases de 15 minutos cada uno.

#### **4.3.3.1.2.3 Impregnación en parafina y formación del bloque.**

Al colocar la muestra de tejido en un recipiente con parafina fundida a 60°C el calor hace que el xilol se evapore y los espacios anteriormente ocupados por éste son ocupados por la parafina, que penetra de este modo en los tejidos, infiltrándolos. Se dieron tres pasos de parafina a 60°C. Finalmente el tejido se colocó en un molde con un soporte de plástico identificado con el nombre de la muestra. A continuación se añadió parafina a 60°C para cubrir el tejido. Una vez centrada la pieza se colocó el molde sobre una superficie plana a 4°C para generar el endurecimiento y formación del bloque, y una vez solidificado se desprendió del molde.

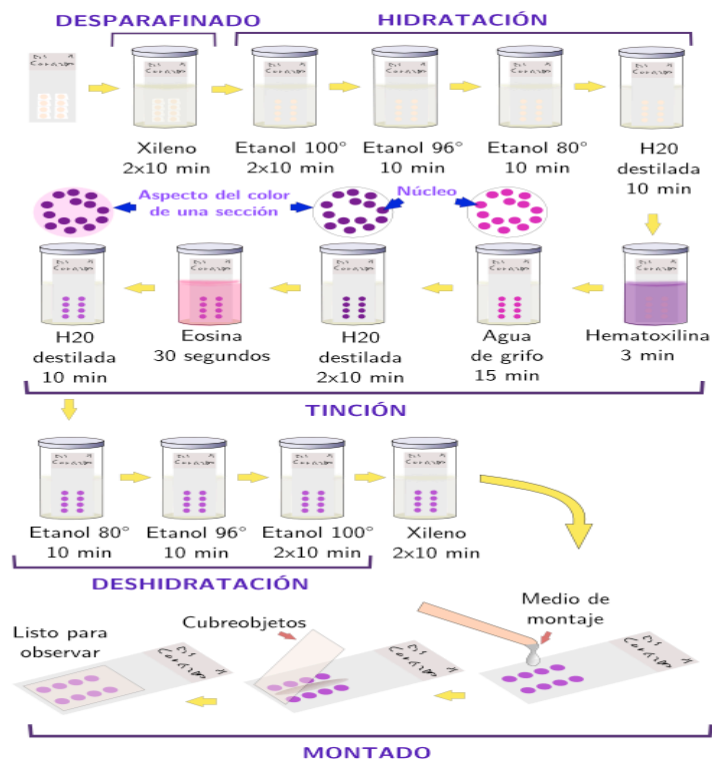
#### **4.3.3.1.3 Obtención de cortes histológicos.**

A partir de los bloques de parafina previamente enfriados sobre una base de hielo, se colocaron en el microtomo y se realizaron cortes seriados en láminas de 5 µm. Estos cortes se pasaron a un baño de agua destilada a 37°C para poder extenderlos y colocarlos sobre un porta-objetos tratados con poli-L-lisina (lo que incrementa su adherencia al cristal y evita que los cortes se despeguen en los posteriores lavados y procesamientos). Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente y se mantuvieron ordenados en cajas archivadoras hasta el momento de ser usados. Además, al menos durante las 24 horas previas al desparafinado se introdujeron en una estufa a 37°C para mejorar la adherencia de los cortes al porta-objetos.

### 4.3.3.2 Análisis histológico:

#### 4.3.3.2.1 Tinción histológica con hematoxilina y eosina:

Una de las tinciones más comúnmente usadas en histología es la hematoxilina-eosina sobre cortes de parafina. El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Antes de proceder a la tinción, sobre los cortes de parafina tenemos que llevar a cabo el desparafinado. Para facilitar este paso, las muestras se dejan 1 hora en una estufa a 60°C. A continuación se detallará con un diagrama (Fig 7), los pasos realizados para esta tinción, aunque de forma resumida, esta técnica consiste en un desparafinado de las muestras, seguido de una rehidratación de los tejidos para incorporar los colorantes, y finalmente una nueva deshidratación para terminar incorporando el medio de montaje (Eukitt™ 15320) y el cubre de cristal. Una vez realizado este procedimiento se deja secar una horas, aunque ya se puede evaluar al microscopio.



**Figura 7.** Representación gráfica del proceso de tinción histológica de las muestras para su posterior análisis microscópico. En primer lugar se realiza el desparafinado con xilol, para proceder a continuación a la rehidratación con etanol previa a la tinción de las muestras con eosina y hematoxilina. Finalmente se realiza una nueva deshidratación con etanol y se realiza el montaje de las muestras, colocándolas una vez teñidas en un portaobjetos, se recubren con un cubre-objetos y se dejan secar unas horas previamente a su observación en el microscopio. (tomado de <http://webs.uvigo.es/mmegias/-tecnicas/5-general.php>)

Esta tinción con hematoxilina y eosina fue llevada a cabo sobre los cortes realizados a los bloques procedentes de las biopsias endometriales. Estos cortes ya teñidos fueron analizados por un anatomopatólogo experimentado para confirmar la fase del ciclo menstrual en el que se encontraban las pacientes en el momento de la intervención. De esta forma se pudo comprobar que todas ellas se encontraban en fase folicular del ciclo menstrual; observando glándulas tubulares estrechas, con un epitelio cilíndrico más o menos alto y pseudoestratificado según el momento de la biopsia, que se extendía desde la capa basal hacia la superficie endometrial, con una actividad mitótica marcada y creciente, tanto en el epitelio como en el estroma, y un estroma de tipo sincitial laxo prominente. Recorriendo el estroma se vieron vasos espirales que se extendían hasta un punto inmediatamente por debajo de la membrana de unión al epitelio, donde se observaba una red capilar laxa.

Asimismo, cortes procedentes de las muestras de lesiones peritoneales tomadas tanto en la primera como en la segunda laparoscopia, también fueron teñidos con hematoxilina y eosina y analizados con el fin de evaluar por una parte las características histológicas del tejido que determinasen la presencia de tejido endometriósico en las biopsias de peritoneo, tales como la presencia de las glándulas y/o estroma, y por otra parte la apariencia de las



lesiones, con el objetivo de hallar cambios en la estructura y características del tejido tras el tratamiento con quinagolida.

#### **4.3.3.3 Análisis inmunohistoquímico de los implantes endometriósicos.**

Uno de los objetivos del estudio era analizar si los efectos producidos por la medicación sobre las lesiones endometriósicas son mediados por la inhibición de la angiogénesis. Para ello, decidimos utilizar la inmunohistoquímica con el fin de estudiar si parámetros inmunohistoquímicos definitorios del estado angiogénico de las lesiones se veían afectados por el tratamiento con quinagolida.

La inmunohistoquímica se utiliza para determinar el lugar donde se produce la reacción antígeno–anticuerpo y así poder localizar la posición exacta en el tejido dónde se encuentra la molécula a detectar. Adicionalmente, usando determinadas herramientas como el análisis de imagen, es posible cuantificar la expresión de los anticuerpos utilizados y compararla entre distintas muestras y frente a un control negativo.

Tras la preparación de las muestras mediante los procedimientos de fijación, inclusión y corte que hemos comentado anteriormente, comunes a la histología, se realizaron los protocolos propios del análisis inmunohistoquímico. A continuación describiremos en primer lugar los procesos comunes a todos los análisis inmunohistoquímicos, para a continuación detallar el protocolo específico que nos permitió revelar cada uno de los parámetros a estudio.

##### **4.3.3.3.1 Procesos inmunohistoquímicos comunes**

A partir de los cortes obtenidos de los bloques con los tejidos incluidos en parafina tal y como se ha detallado anteriormente, se llevó a cabo el

desparafinado de las muestras y su marcaje inmunohistoquímico correspondiente. El desparafinado se realizó calentando los cortes a 60°C durante 1 hora y posteriormente con 3 baños de xileno de 5 minutos cada uno, 3 baños de etanol absoluto de 3 minutos y una posterior rehidratación en alcoholes de concentración decreciente (95%, 85% y 70%, 3 minutos en cada uno de ellos) para finalmente dejar las muestras en agua y poder conformar la inmunohistoquímica. A continuación, los cortes fueron sometidos a un desenmascaramiento antigénico inducido por calor en autoclave (120°C) durante 3 minutos, inmersos en un medio tamponado. Este desenmascaramiento antigénico se realiza para romper los enlaces aldehído que se producen durante el proceso de fijación y que dificultarían el reconocimiento posterior del anticuerpo sobre el antígeno. Para el anticuerpo CD31 el medio tamponado de desenmascaramiento necesario fue Tris 0,5 M pH=10, mientras que para el resto de anticuerpos empleados (Ki67, VEGFR2, DrD2, VEGFR2<sup>Y951</sup>, VEGFR2<sup>Y1054</sup> y VEGFR2<sup>Y1075</sup>), la solución empleada fue tampón citrato 0,01 M pH=6. Una vez terminado el programa de autoclave, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Seguidamente, los cortes fueron lavados en agua destilada en primer lugar y posteriormente en una solución de TBST (Tris 0,5M, NaCl 0,15 M y 0,1% de Triton-X-100, pH=7,6). El siguiente paso fue el bloqueo de la peroxidasa endógenas sometiendo las muestras a peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Del mismo modo, para reducir más aún el marcaje inespecífico, las muestras se incubaron con un bloqueo de la avidina/biotina endógena (SP-2001, Vector Labs) a temperatura ambiente durante 30 minutos, y de nuevo se realizó otro bloqueo durante otros 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 5% (Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, MO A2153).

Una vez realizados todos los bloqueos, se incubaron las muestras en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario

diluido en PBS a la dilución específica para cada anticuerpo, como se describirá en el apartado siguiente.

#### **4.3.3.3.2 Uso de anticuerpos primarios para el análisis de los parámetros inmunohistoquímicos de interés.**

En nuestro trabajo llevamos a cabo inmunohistoquímica sobre las lesiones endometriósicas con el fin de determinar los siguientes parámetros:

- **Vascularización:** Para determinar el aporte vascular que mantiene los implantes endometriósicos, se usó un anticuerpo policlonal hecho en conejo frente el marcador endotelial CD31 (ab28364, dilución 1:200. Abcam, Cambridge, MA). Este marcador es capaz de unirse a las células endoteliales tanto de vasos pequeños que forman parte de la microvasculatura como los vasos más patentes que dan lugar a la macrovasculatura de los tejidos. La densidad de vascularización se determinó a través del porcentaje de área marcada por el CD31 frente al total del área del tejido analizado.

- **Expresión VEGFR2:** Para determinar la expresión de este receptor en los tejidos endometriósicos, se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón frente al VEGFR2 (sc-6251, dilución 1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc). La expresión del receptor VEGFR2 se evaluó mediante la cuantificación del porcentaje de área marcada por el anti-VEGR2 frente al total del tejido analizado.

- **Expresión DrD2:** La expresión del receptor DrD2 fue determinada en los tejidos endometriósicos a través de un anticuerpo monoclonal obtenido de ratón frente al receptor D2 de la dopamina (sc-5303, dilución 1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc). De este modo la expresión de este receptor se determinó como el porcentaje de área marcada por el anti-DrD2 frente al total del tejido analizado.

- **Proliferación celular:** Fue detectada mediante un anticuerpo capaz de unirse al núcleo y los cromosomas de las células que presentan actividad

proliferativa. Se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón frente al antígeno nuclear Ki67 (MIB-1, dilución 1:50. DakoCytomation), el cual solo se expresa durante las fases de actividad celular (G1, S, G2 y mitosis), pero no durante la fase G0. La proliferación celular se determinó mediante la cuantificación del porcentaje de área marcado por el Ki67 respecto al total del tejido analizado.

- **Activación VEGFR2:** La activación del VEGFR2 se determinó a través de la fosforilación de determinados sitios tirosina del receptor. Concretamente se utilizaron anticuerpos policlonales hechos en conejo frente al VEGFR2<sup>Y951</sup> (ab38473, dilución 1:50. Abcam, Cambridge, MA), frente al VEGFR2<sup>Y1054</sup> (ab63405, dilución 1:50. Abcam, Cambridge, MA) y frente al VEGFR2<sup>Y1075</sup> (ab38464, dilución 1:50. Abcam, Cambridge, MA). Para la cuantificación de este parámetro se estimó el porcentaje de área marcada por cada anti-VEGFR2 fosforilado respecto al área total representada por el tejido estudiado.

- **Neoangiogénesis o madurez de los vasos sanguíneos:** Los pericitos son células musculares que rodean a los vasos maduros, mientras que los vasos inmaduros o de reciente formación no presentan estas células alrededor. De este modo se marcaron todos los vasos mediante el marcador endotelial CD31 (ab28364, dilución 1:200. Abcam, Cambridge, MA) sobre el cual se utilizó un sistema de revelado fluorescente. Tras el revelado, todos los vasos, tanto los maduros como los inmaduros, eran identificados mediante un color verde fluorescente. Para identificar los vasos maduros, se marcó la actina de los pericitos, utilizando un anticuerpo monoclonal hecho en ratón frente a la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA), el cual estaba directamente marcado con el fluorocromo Cy3 (C6198. 1:500; Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, MO). De esta forma, sólo los vasos maduros mostrarían una tinción doble endotelial verde, y roja para los pericitos.

A su vez, en el mismo procedimiento inmunohistoquímico se incluyeron controles positivos consistentes en tejidos sobre los que se sabe

que el antígeno objeto del marcaje está presente y servirá como patrón de marcaje para discernir el marcaje real y los posibles artefactos. Los controles positivos utilizados fueron endometrio humano, para el marcador endotelial CD31; neuroblastoma humano para el Ki67, cáncer de mama para el VEGFR2 y el VEGFR2 fosforilado, y cerebro humano para el DrD2. Como controles negativos, se utilizaron cortes de los mismos tejidos estudiados, en los que se realizaron todos los pasos inmunohistoquímicos excepto la incorporación del anticuerpo primario, el cual fue sustituido por el diluyente PBS.

#### **4.3.3.3 Protocolo de revelado de señal inmunohistoquímica.**

Al día siguiente de la incubación con los anticuerpos primarios, las muestras se lavaron con TBST y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado adecuado para cada anticuerpo primario. En el caso de la inmunohistoquímica para el marcador CD31, se utilizó un anticuerpo IgG biotinilado hecho en cabra frente a conejo (B8895, 1:800; Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, MO). Para el resto de anticuerpos primarios se utilizó un link comercial formado por un anticuerpo secundario biotinilado (K0679, LSAB+ kit; Dakocytomation). Estos anticuerpos secundarios fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguidos de una incubación final durante otros 30 minutos con estreptavidina asociada a la peroxidasa de rábano (streptavidin-HRP; K0679, LSAB+ kit; Dakocytomation), la cual presenta afinidad por la biotina asociada al anticuerpo secundario. Finalmente, los cortes fueron sometidos a un método de revelado basado en la adición de una solución del cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (K0679, LSAB+ kit; Dakocytomation), la cual da un color marrón en la localización en que tenga lugar la reacción. Una vez concluida la inmunohistoquímica, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer para proporcionar un tono azulado a los núcleos del tejido, deshidratadas con pases crecientes de etanol (70%, 80%, 90%, 100%) y montadas con medio de montaje (Eukitt™ 15320). En los casos en que se

precisó de inmunofluorescencia para detección de parámetros inmunohistoquímicos de forma simultánea, se utilizó un proceso de revelado con TSA descrito en el siguiente apartado.

#### **4.3.3.3.4 Protocolo de revelado inmunofluorescente.**

Con el fin de determinar si los vasos que dan soporte a las lesiones endometriósicas son maduros o inmaduros, fue necesario analizar simultáneamente los parámetros que identifican los vasos de ambos tipos. Por ello se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia mediante la detección de los pericitos y los vasos sanguíneos de las lesiones. La inmunofluorescencia se realizó sobre los cortes del mismo modo que se realizó la inmunohistoquímica anteriormente descrita con algunas modificaciones. En este caso se sustituyó el sistema de revelado con DAB por el sistema de fluoresceína TSA (*Tyramide Signal Amplification*; TSA™, Perkin Elmer; NEL701A001KT). Además, también se incluyó un nuevo paso intermedio con un reactivo de bloqueo incluido en el kit de amplificación de TSA justo después de la incubación del anticuerpo primario, para disminuir las señales inespecíficas que pudiesen generar ruido de fondo. Una vez incubado el anticuerpo secundario y tras el lavado con PBS, se incubaron las muestras con la estreptavidina-HRP procedente del Kit de TSA a una dilución 1:100 en PBS durante 30 minutos. Después de lavar los cortes de nuevo con PBS dos veces durante 3 minutos, se añadió la fluoresceína-tiramida diluida en solución de amplificación e incubada durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Justo después del marcaje de fluorescencia del anticuerpo anti-CD31, se lavaron las muestras dos veces durante 3 minutos en PBS y se marcaron los pericitos mediante la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal creado en ratón frente la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA), directamente marcado con el fluorocromo Cy3. Por último, los cortes fueron lavados en PBS y contrateñidos con medio de

montaje con DAPI (ProLong® Gold Antifade Reagent. Invitrogen, P36931) el cual proporciona un marcaje nuclear bajo el láser ultravioleta.

Para esta inmunofluorescencia también se incluyeron controles negativos en los que se usaron cortes del mismo tejido que el usado con los anticuerpos anteriormente citados, pero omitiendo los anticuerpos primarios CD31 y  $\alpha$ SMA-Cy3 en el diluyente usado para su incubación. Como controles positivos se usaron cortes de un tejido donde se expresan claramente los marcadores estudiados, en este caso, ya que tanto el CD31 como el  $\alpha$ SMA-Cy3 reconocen igualmente los antígenos humanos y los de ratón, se usaron cortes de lengua de este último para establecer el funcionamiento de estos anticuerpos.

#### **4.3.3.3.5                      Cuantificación                      del                      marcaje inmunohistoquímico/inmunofluorescente.**

Para cada parámetro inmunohistoquímico analizado, se evaluaron tres portaobjetos que no correspondiesen a cortes contiguos. Cada uno de ellos fue fotografiado al azar en cuatro campos con el objetivo de 40 aumentos (x40), utilizando el sistema de captura de imagen asociado al microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, NY). Todos estos parámetros con la excepción de la inmadurez de los vasos fueron cuantificados mediante el programa de análisis de imagen *Image Pro Plus 6.3*. El área de interés para cada parámetro inmunohistoquímico se segmentó de forma automática mediante el programa de análisis, marcándola de color rojo. El área restante se marcó de color azul, quedando una imagen de fondo azul con las áreas vascularizadas en rojo. De esta forma, se delimitó el área total de interés del tejido para proporcionar un valor numérico de cada señal obtenida por inmunohistoquímica. Los resultados se expresaron como porcentaje de área teñida respecto del total del tejido. En el caso de la inmadurez, la señal de fluorescencia se visualizó y fotografió para obtener capturas a 40X usando un microscopio de fluorescencia unido a una cámara Olympus de 35mm

(Olympus Provis AX70, Olympus Optical España S.A. La madurez e inmadurez de los vasos sanguíneos fue determinada de forma manual por el operador a través del conteo del número de vasos que eran maduros (CD31+/α-SMA+) y los que eran inmaduros (CD31+/α-SMA-) respecto al total en cada uno de los campos visuales analizados. Se utilizó para su representación las siguientes fórmulas: Madurez= [numero de Vasos (CD31+/α-SMA+) / Vasos Totales] x 100; Inmadurez=[ numero de vasos (CD31+/α-SMA-) /Vasos totales-]x 100.

#### **4.3.4 Análisis molecular.**

Finalmente, nuestro último objetivo fue analizar los efectos de la quinagolida sobre la angiogénesis y los procesos inflamatorios ligados a la endometriosis, a nivel molecular. Para ello, las muestras de tejido procedentes de las biopsias de las lesiones peritoneales tomadas durante las cirugías laparoscópicas, antes y después del tratamiento con quinagolida, fueron procesadas para la extracción del ARN mensajero, retrotranscritas y amplificadas mediante la técnica de PCR a tiempo real o QF-PCR.

##### **4.3.4.1 Extracción del ARN mensajero (ARNm).**

Como hemos mencionado anteriormente, las muestras que fueron destinadas a la extracción de ARN fueron rápidamente resuspendidas en Trizol (Gibco/BRL, MD) siguiendo las instrucciones de fabricación, y después congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. Para continuar con la extracción del ARN total de dichas muestras se procedió como se indica a continuación. Tras el Trizol se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol. Se agitó vigorosamente durante 15 s. Tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 25 min y a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol utilizado en el paso previo. Se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche y tras otra centrifugación a 13.000 rpm durante 25 min



a 4°C se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v) en agua DEPC. Se volvió a centrifugar por última vez en las mismas condiciones y se resuspendió en 15 µL de agua DEPC. Terminada la fase de extracción de ARN, se procedió a la cuantificación en un SmartSpec 3000 spectrophotometer (Biorad, Barcelona, España).

#### **4.3.4.2 Retrotranscripción o transcripción reversa (RT).**

El ARNm total extraído de las lesiones endometriósicas, fue purificado usando un Kit de purificación (Qiagen) incluyendo un tratamiento con DNase I para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico. La cantidad y la calidad del RNA aislado se evaluó mediante un chip de RNA (RNA 6000 Nano LabChip kit), usando el Agilen 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) y se confirmaron que todas las muestras tenían un RIN (RNA Integrity Number) superior a 7. Para evitar pérdidas de material genético se procedió a retrotranscribir el ARN a ADN complementario (ADNc). Para ello, se tomó 1 µg de ARN y se utilizó el *Advantage RT-for-PCR kit* (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU). A cada muestra se le añadió 1 µL de oligo-18-dT y agua-DEPC hasta un volumen final de 13,5 µL y se calentó a 70°C durante 2 min para desnaturalizar las cadenas de ARN y evitar la estructura secundaria de las mismas. Después de esos 2 min se añadió a cada tubo 6,5 µL de la mezcla de reacción que contenía: 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de dNTP mix (10 mM cada uno), 0,5 µL de inhibidor recombinante de ARNasa, 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV (*Moloney-Murine Leukemia Virus*). Completados los 20 µL de volumen final se procedió a llevar a cabo la reacción de retro-transcripción. Las muestras se incubaron durante 1h a 42°C y al final 5 min a 94°C para detener la reacción y destruir la actividad ADNasa.

El producto final de la retrotranscripción fue diluido hasta un volumen final de 100 µL con agua-DEPC y almacenado a 4°C hasta su análisis por RT-PCR cuantitativa.

#### **4.3.4.3 PCR Cuantitativa fluorescente en tiempo real (RT-QF-PCR).**

La técnica de PCR a tiempo real o QF-PCR consiste en la determinación ciclo a ciclo de la intensidad fluorescente que generan los fluoróforos unidos al cDNA en amplificación. Su principal ventaja con respecto a la PCR convencional radica en que al poder ser monitorizada durante todo el proceso evita errores de cuantificación por saturación de producto resultante. Además es una técnica de biología molecular rápida y no necesita el procesamiento ulterior del producto de PCR, lo que reduce el riesgo de contaminación.

Desde el punto de vista técnico, existen dos métodos principales de análisis de PCR cuantitativa que se basan en técnicas de fluorescencia diferenciadas en la metodología de detección de los productos de PCR. Estos métodos son:

- a) **Sondas TaqMan:** basados en el uso de dos sondas que hibridan en las secuencias específicas.
- b) **SYBR Green I:** se basa en este fluorocromo intercalante, el cual se une a la doble cadena de ADN.

Nosotros utilizamos un superarray disponible en el mercado (PAHS-072E-4; SAP Biosciences, Frederick, Maryland, Estados Unidos). Este superarray contiene 84 citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, y factores inhibidores de la angiogénesis.

Para amplificar la ADNc, todo el volumen de cada uno de las muestras de RT se vertió en su totalidad en tubos individuales que contenían un mix de SYBR Green PCR fórmula magistral (PE Applied Biosystem), nucleótidos, Taq ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, una reacción tamponada con SYBR green y agua destilada. Posteriormente se procedió a pipetear 25 ul de esta mezcla en cada uno de los pocillos de la placa del superarray. Cada uno de estos pocillos contenían primers específicos e individuales para amplificación específica de cada uno de los genes de interés. La PCR de tiempo real se desarrolló usando

un termociclador ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se utilizó una tapa caliente (105° C) para evitar la evaporación del líquido, un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos. La amplificación se llevó a cabo mediante 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Cada muestra se amplificó en duplicado y se normalizó con respecto a la media normalizada obtenida de la amplificación de los 5 genes constitutivos incluidos en cada placa mediante. Los resultados finales, expresados como número de veces sobre o Infra expresado (fold change), se determinaron por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizando un software específico de SAB Bioscience.

Para determinar si otros productos inespecíficos habían sido amplificados, las muestras de reacción de la PCR, después de 40 ciclos, fueron sometidos a un proceso de calentamiento progresivo para estudiar la extinción de la fluorescencia generada por el SYBR green en lo que se denomina curva de fusión. La existencia de un único pico de máxima extinción de fluorescencia a temperatura determinada y constante fue indicativa de que la reacción de amplificación había sido correcta. Aquellas muestras con más de un pico se descartaron del análisis por contener contaminación.

#### **4.4. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, Chicago, Illinois, Estados Unidos), versión 15.

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  Desviación Estándar (SD). Se realizó un Test de Wicoxon para muestras pareadas para determinar las diferencias en el tamaño de las lesiones y en los niveles de prolactina; y el análisis cuantitativo de los parámetros inmunohistoquímicos (densidad vascular, proliferación celular, madurez de los vasos

sanguíneos, expresión del DrD2, expresión y activación del VEGFR2) se realizó mediante un test no paramétrico de Mann-Whitney.

El análisis estadístico para los arrays se realizó con el Software específico SAP Bioscience. Valores de  $P < 0,05$  se consideraron como estadísticamente significativos.

## **5. RESULTADOS**



## **5.1. Proceso de Reclutamiento, efectos secundarios del tratamiento y hallazgos laproscópicos.**

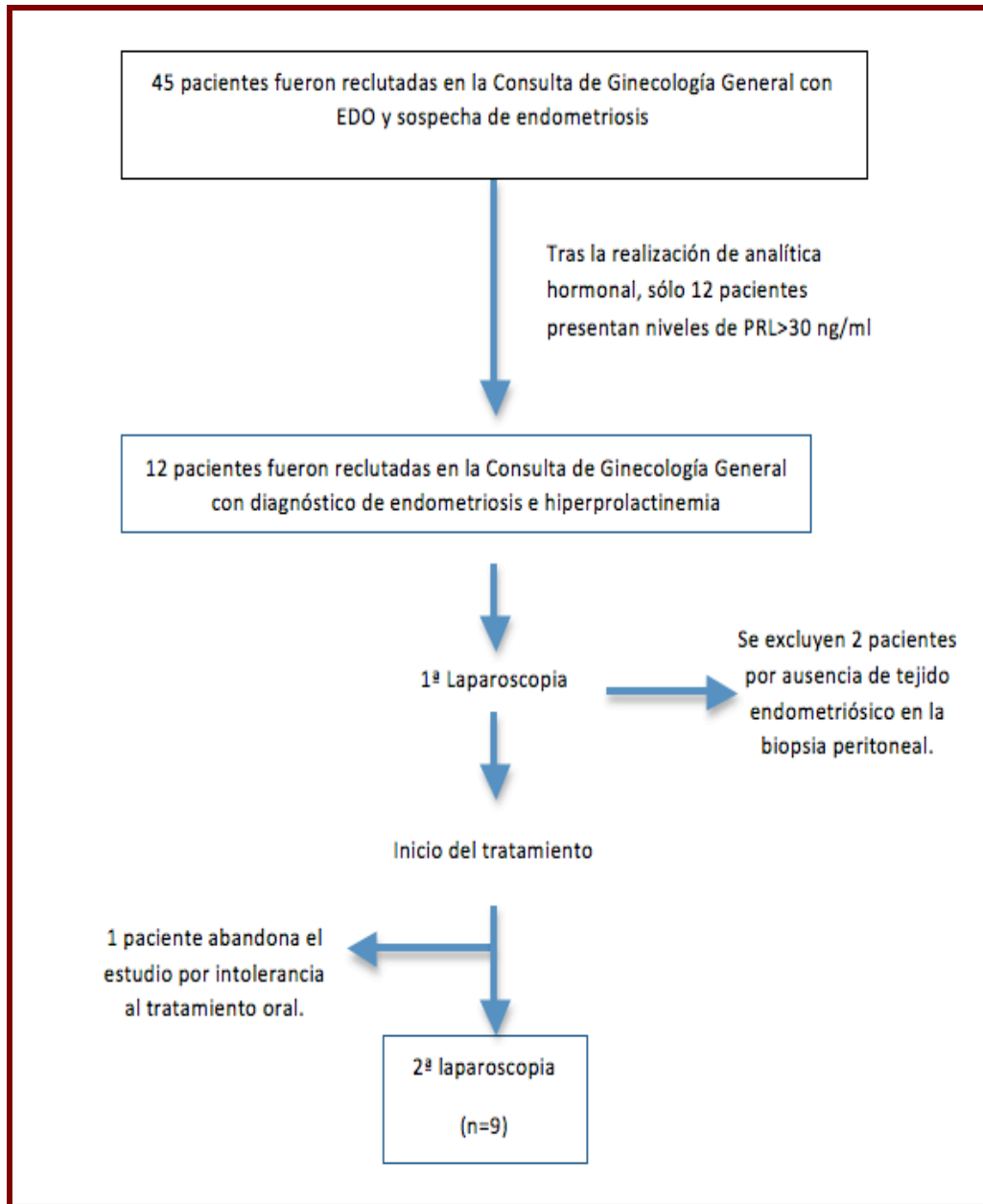
### **5.1.1. Pacientes incluídas.**

Inicialmente se preseleccionaron en la Consulta de Ginecología General del Hospital Doctor Peset de Valencia 45 mujeres con sospecha de endometriosis según los criterios de inclusión comentados anteriormente. Tras realizar la determinación sanguínea de PRL, únicamente 12 de ellas presentaron una hiperprolactinemia, definida  $> 30$  ng/ml. Por tanto, finalmente únicamente éstas se incluyeron en el estudio como mujeres que cumplían todos los criterios. Tras firmar el Consentimiento Informado del estudio fueron programadas para cirugía en la Unidad de Cirugía Sin Ingreso del Hospital Dr Peset.

De las 12 pacientes reclutadas inicialmente, 2 fueron excluídas del estudio ya que el análisis anatomopatológico de la biopsia peritoneal tomada durante la primera cirugía no confirmó la presencia de tejido endometriósico.

Posteriormente, 1 paciente abandonó el estudio a los 35 días de iniciar la toma de quinagolida por intolerancia al tratamiento oral, presentando mareos y náuseas como efectos secundarios. Por todo ello Finalmente, fueron 9 las pacientes que completaron el estudio (n=9) (Fig 8).

La edad de las pacientes oscilaba entre los 27 y los 44 años, con una media de edad de 34,3 años (Tabla 2).



**Figura 8.** Proceso de inclusión de las pacientes: este esquema ilustra el proceso de reclutamiento, que inicialmente se inició con 45 pacientes. Tras excluir las pacientes normoprolactinémicas, aquellas en las que no se halló tejido endometriósico durante la primera laparoscopia y la única paciente que abandonó el estudio por intolerancia al tratamiento, finalmente 9 pacientes completaron el estudio.



### 5.1.2. Efectos secundarios.

A lo largo de las entrevistas mensuales con las pacientes, se les preguntó acerca de las reacciones adversas presentadas al fármaco. En caso de existir algún efecto secundario, la intensidad de éste era puntuado por las pacientes del 1 al 3, según fuesen leves (1, expresado como +), moderados (2, expresado como ++) o graves (3, expresados como +++). Los efectos secundarios más frecuentemente observados fueron las náuseas y los mareos (Tabla 2). No se observaron efectos adversos mayores.

CASO	EDAD	ASRM ANTES	ASRM DESPUÉS	CA 125 EN SANGRE (UI/ml) ANTES	CA 125 EN SANGRE (UI/ml) DESPUÉS	EFFECTOS ADVERSOS DEL TRATAMIENTO
1	44	IV	I	79.7	22	Náuseas +; Mareos ++
2	33	IV	II	39.5	24.1	∅
3	27	IV	I	45.3	20.4	Náuseas +; Mareos ++
4	36	IV	III	80.6	29.9	Mareos +++
5	36	IV	II	41.2	24.9	Náuseas +
6	30	IV	II	24.3	25.9	∅
7	36	III	I	31.5	15.5	∅
8	36	IV	I	45.9	31.1	Náuseas ++; Mareos ++
9	31	III	I	23.4	13.6	∅

*+*: intensidad leve

*++*: intensidad moderada

*+++*: intensidad grave

∅: Ningún efecto secundario

**Tabla 2.** Características y determinación de parámetros clínicos de interés de las pacientes incluidas en el estudio. Podemos observar los cambios en el estadio de la enfermedad según la clasificación de la ASRM modificada en 2007, la evolución en los valores del marcador tumoral Ca 125 antes de empezar el tratamiento y al final del estudio, y finalmente las reacciones adversas a la quinagolida presentadas en las pacientes. En las entrevistas mensuales se preguntaba a las pacientes acerca de la aparición de algún efecto secundario, y en caso de presentarlo, se puntuaba sobre 3 la intensidad de éste.

### **5.1.3 Hallazgos laparoscópicos.**

De las 9 mujeres que completaron el estudio, tras someterse a la primera laparoscopia se vió que 5 de ellas presentaban una endometriosis ovárica bilateral, mientras que 4 mujeres presentaban quistes a nivel de un solo ovario. A todas ellas se les realizó una cirugía conservadora, practicando una quistectomía uni o bilateral en función de los hallazgos operatorios.

Atendiendo a la Clasificación Revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM, 1997), en la primera laparoscopia 7 de las 9 pacientes presentaban una endometriosis grave o grado IV, y 2 de ellas, una endometriosis moderada o grado III. En todas ellas hubo que hacer adhesiolisis para liberar las adherencias que presentaban durante esta primera intervención. Tras el tratamiento, se pudo evidenciar en la segunda laparoscopia que únicamente 1 paciente presentaba endometriosis moderada o grado III, a expensas de adherencias densas en trompas y ovarios que se liberaron con disección roma. De nuevo atendiendo a la clasificación ASRM, 3 pacientes presentaban endometriosis leve o grado II, realizándose adhesiolisis de las adherencias laxas en 2 de ellas, y 5 mujeres presentaron una endometriosis mínima o grado I, sin adherencias (Tabla 2). Obviamente, este cambio en la severidad de la enfermedad que presentaban no se debe exclusivamente al tratamiento con quinagolida, ya que la cirugía practicada en primera instancia ya redujo sustancialmente el grado de endometriosis en cada paciente. No obstante, también es cierto que en ninguna de ellas observamos recidiva de los quistes ováricos.

Ninguna de las mujeres requirió ingreso tras la primera cirugía, ni tampoco tras la segunda laparoscopia. No se produjo ninguna complicación derivada del acto quirúrgico o anestésico en ninguna de las dos intervenciones.

## **5.2 Control interno y seguimiento.**

### **5.2.1 Biopsias endometriales.**

Las muestras endometriales obtenidas mediante biopsia aspirativa con cánula de Cournier durante la primera y segunda laproscopia confirmaron que ambos procedimientos se realizaron durante la fase proliferativa del ciclo en todas las pacientes. De esta forma se pudo observar la histología típica del endometrio proliferativo: glándulas tubulares estrechas, con un epitelio cilíndrico más o menos alto y pseudoestratificado según el momento del ciclo, que se extendía desde la capa basal hacia la superficie endometrial, con una actividad mitótica marcada y creciente, tanto en el epitelio como en el estroma, y un estroma de tipo sincitial laxo prominente. Recorriendo el estroma se vieron vasos espirales que se extendían hasta un punto inmediatamente por debajo de la membrana de unión al epitelio, donde se observaba una red capilar laxa.

### **5.2.2 Determinación de prolactina: cumplimentación del tratamiento.**

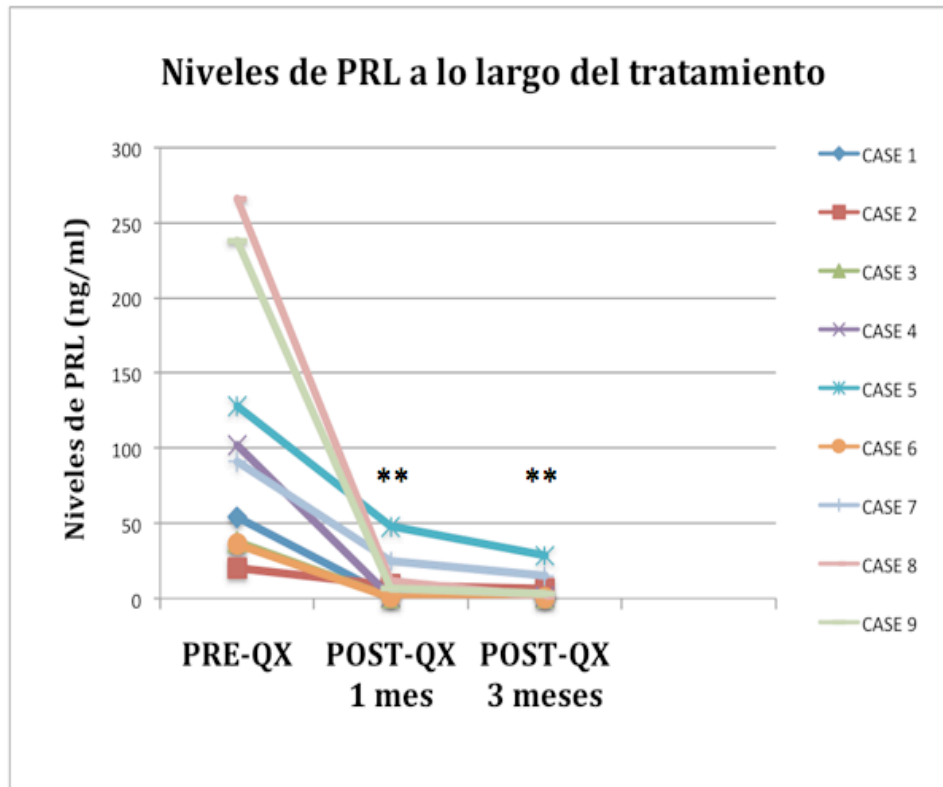
El régimen de tratamiento de la quinagolida diseñado para el estudio, como hemos comentado anteriormente, seguía una pauta de titulación. El tratamiento comenzaba con un comprimido de 25 µg al día durante los primeros 15 días, seguidos de 50 µg al día (2 comprimidos de 25 µg) los siguientes 15 días. A partir del primer mes, la dosis era de 75 µg al día, la cual se mantenía hasta finalizar el período de tratamiento para el estudio. Todas las pacientes cumplimentaron el tratamiento adecuadamente, excepto una, que, como hemos comentado anteriormente, abandonó el estudio por náuseas y vómitos al aumentar la dosis a 75 µg al día, quedando finalmente una n=9.

La cumplimentación del tratamiento se comprobó mediante entrevista mensual con las pacientes, y determinación de PRL en suero. De esta manera, se pudo

observar un descenso de los niveles sanguíneos de PRL por debajo del límite considerado para la normalidad según nuestro laboratorio (<20 ng/ml) tras la laparoscopia e inicio del tratamiento, así como el mantenimiento de estos niveles a lo largo del seguimiento (Tabla 3 y Figura 9), lo cual interpretamos como signo indirecto que demostraba una adecuada cumplimentación de la toma de la medicación.

	PRL (ng/ml) PRE-QX	PRL (ng/ml) POST-QX 1 month	PRL (ng/ml) POST-QX 3 months
CASO 1	54	< 1	1
CASO 2	30.2	9.1	6.4
CASO 3	37.7	<0.6	<0.6
CASO 4	102	1	1.1
CASO 5	128	48	28.6
CASO 6	36	1.6	<0.6
CASO 7	91	15.1	15.1
CASO 8	266	1.1	1.1
CASO 9	238	6.5	3.1

**Tabla 3.** Valores de Prolactina durante el estudio. PRE-QX: valores de prolactina determinadas antes de la primera cirugía. POST-QX 1 mes: niveles sanguíneos de prolactina, determinados durante la visita de seguimiento, 1 mes después del inicio del tratamiento con quinagolida. POST-QX 3 meses: valores séricos de prolactina determinados en la visita de seguimiento a los tres meses de iniciar el tratamiento con quinagolida. Podemos observar una clara disminución al primer mes de iniciado el tratamiento, así como la persistencia de los valores descendidos con el seguimiento a tres meses.

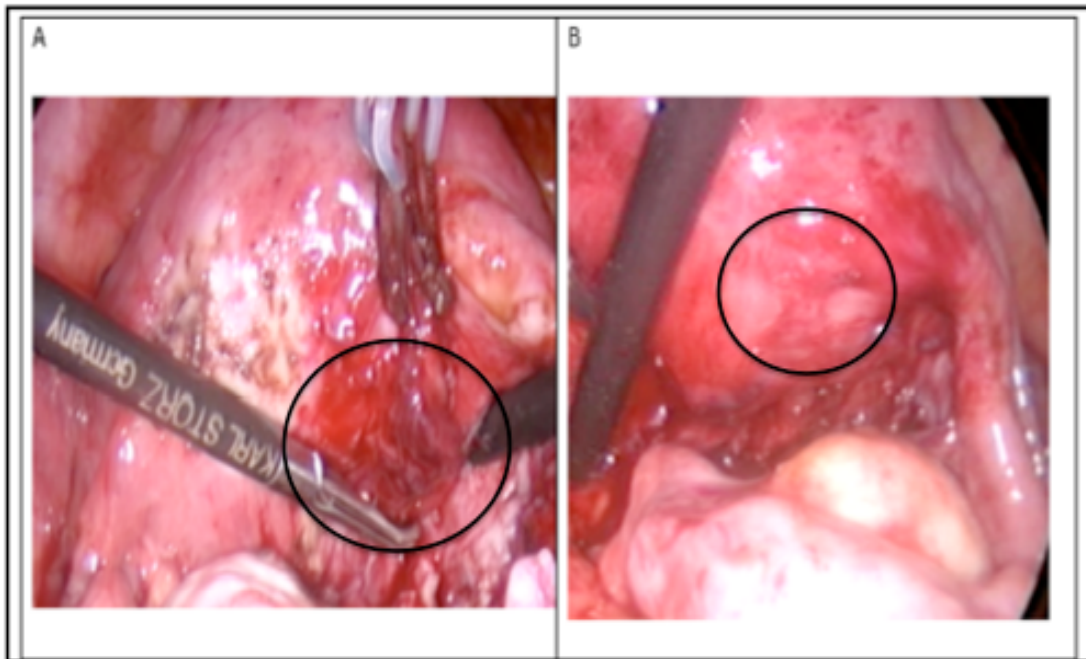


**Figura 9.** Representación gráfica de los niveles séricos de prolactina obtenidos en las nueve pacientes incluidas en el estudio en diferentes momentos a lo largo de su seguimiento. Las pacientes iniciaban el tratamiento con quinagolida una semana después de la primera laparoscopia (QX). PRE-QX: valores de prolactina determinadas antes de la primera cirugía. POST-QX 1 mes: niveles sanguíneos de prolactina, determinados durante la visita de seguimiento, 1 mes después del inicio del tratamiento con quinagolida. POST-QX 3 meses: valores séricos de prolactina determinados en la visita de seguimiento a los tres meses de iniciar el tratamiento con quinagolida. Podemos observar como los valores de Prolactina se normalizan en todos los casos por debajo de los 20ng/ml tras un mes de tratamiento, y permanecen en estos niveles a lo largo de todo el seguimiento. Las diferencias en los valores obtenidas antes de la cirugía y al mes y los tres meses, fueron estadísticamente significativas, análisis estadístico mediante Test de Wilcoxon para datos pareados: **\*\*P<0.01.**

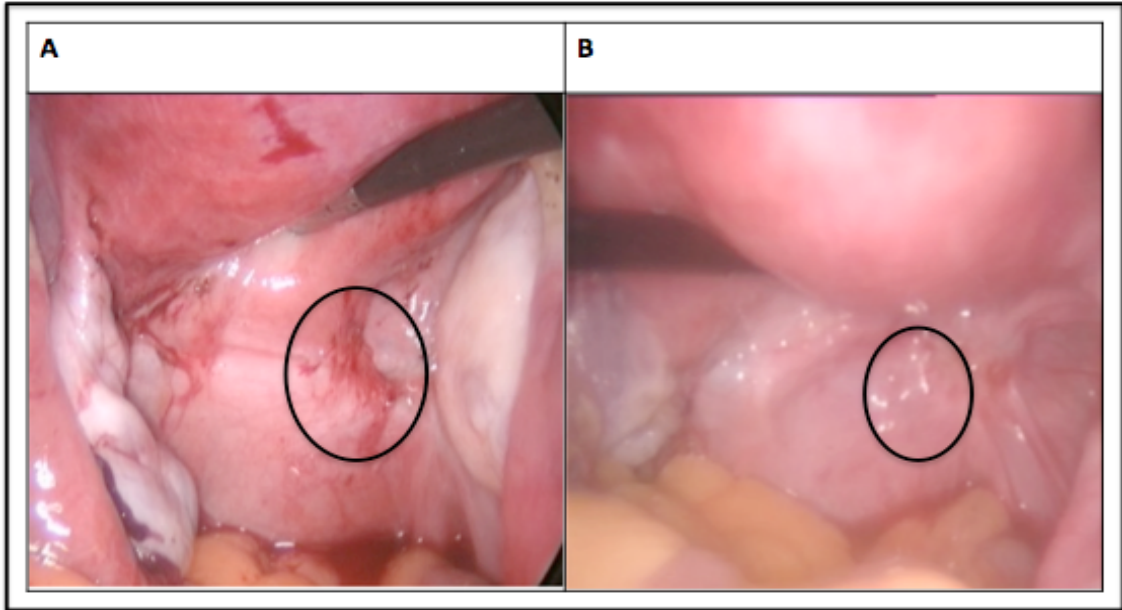
### **5.3. Cambios macroscópicos: Efecto del tratamiento sobre el número, tamaño y morfología de las lesiones.**

Todas las lesiones de interés que se biopsiaron durante la primera laparoscopia en las nueve mujeres que completaron el estudio, así como las que se dejaron referenciadas para su análisis posterior durante la segunda laparoscopia, eran lesiones rojas y activas, tras confirmación mediante análisis histológico.

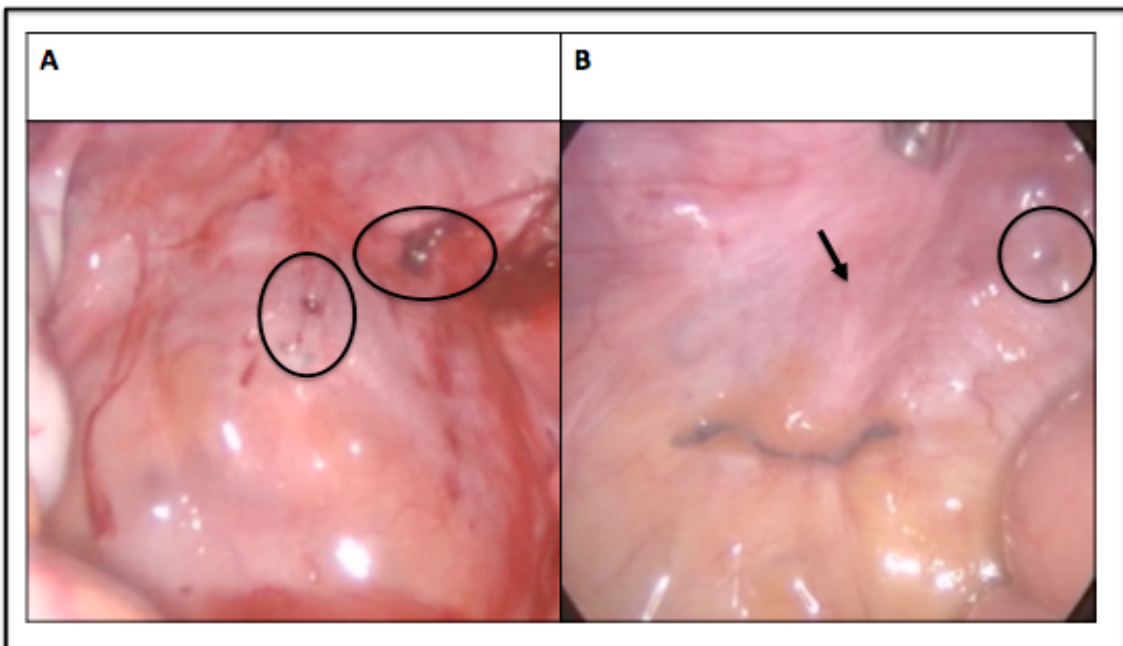
Cuando se realizó la comparación macroscópica de las lesiones referenciadas, se observó cómo en 2 de las 9 pacientes habían desaparecido por completo todas las lesiones (Figuras 10 y 11). En 3 casos observamos cómo algunas de las lesiones habían desaparecido por completo, mientras que las que persistían habían reducido su tamaño significativamente (Figura 12). En las pacientes restantes, 4 casos, no pudimos comprobar desaparición de ninguna de las lesiones, aunque si una disminución del tamaño en todas excepto una, respecto de la primera laparoscopia.



**Figura 10.** Estas dos imágenes ejemplifican uno de los casos en los que la lesión que se dejó referenciada en la primera cirugía (A), había desaparecido tras el tratamiento con quinagolida en la segunda laparoscopia (B). El círculo negro marca en la primera imagen la lesión que se dejó referenciada, y en la segunda, nos indica el lugar en el que esperaríamos haber encontrado la lesión.



**Figura 11.** Como en las imágenes anteriores, éste se trata de otro de los casos en los que tras el tratamiento con el agonista dopaminérgico quinagolida (B), la lesión referenciada en la primera cirugía (A), había desaparecido.



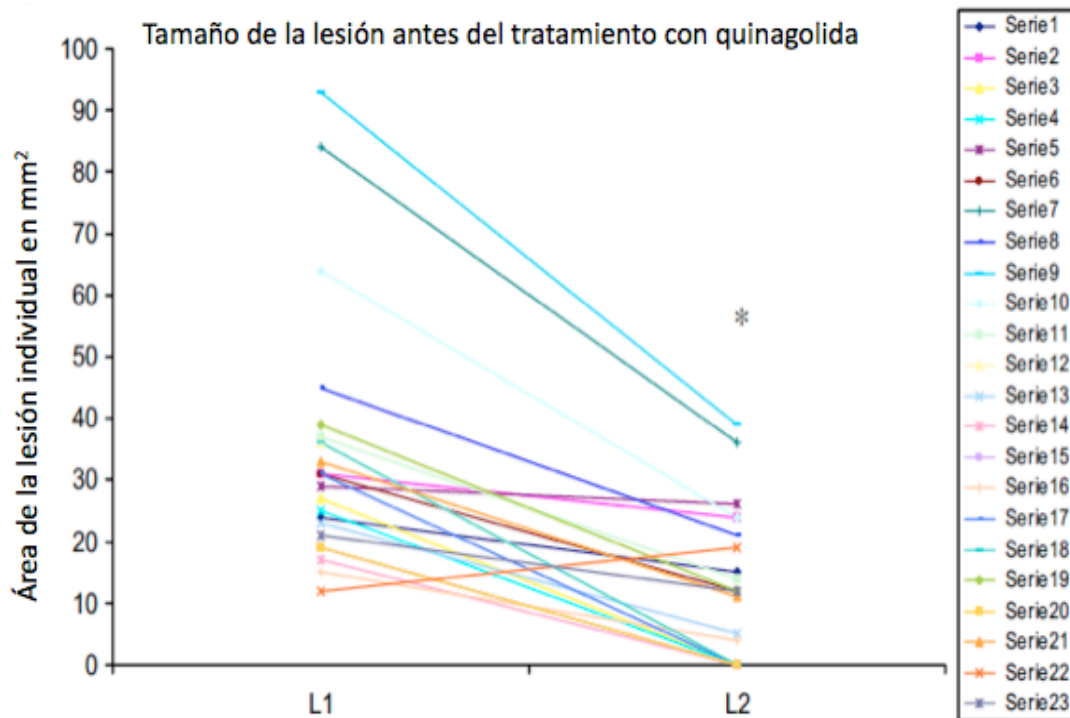
**Figura 12** En estas dos imágenes podemos ver las lesiones peritoneales que se dejaron durante la primera cirugía (dentro del círculo) para su posterior evaluación (A); y cómo en la segunda laparoscopia (B) se observaba que algunas habían desaparecido por completo (la flecha señala el lugar en el que se encontraba la lesión inicialmente) y las que permanecían lo habían hecho a coste de reducir su tamaño (lesión dentro del círculo en B).

Para analizar de forma objetiva la reducción total de superficie de tejido endometriósico obtenido tras la toma de la quinagolida, consideramos todas las lesiones globalmente, y analizamos la superficie de éstas antes y después del tratamiento.

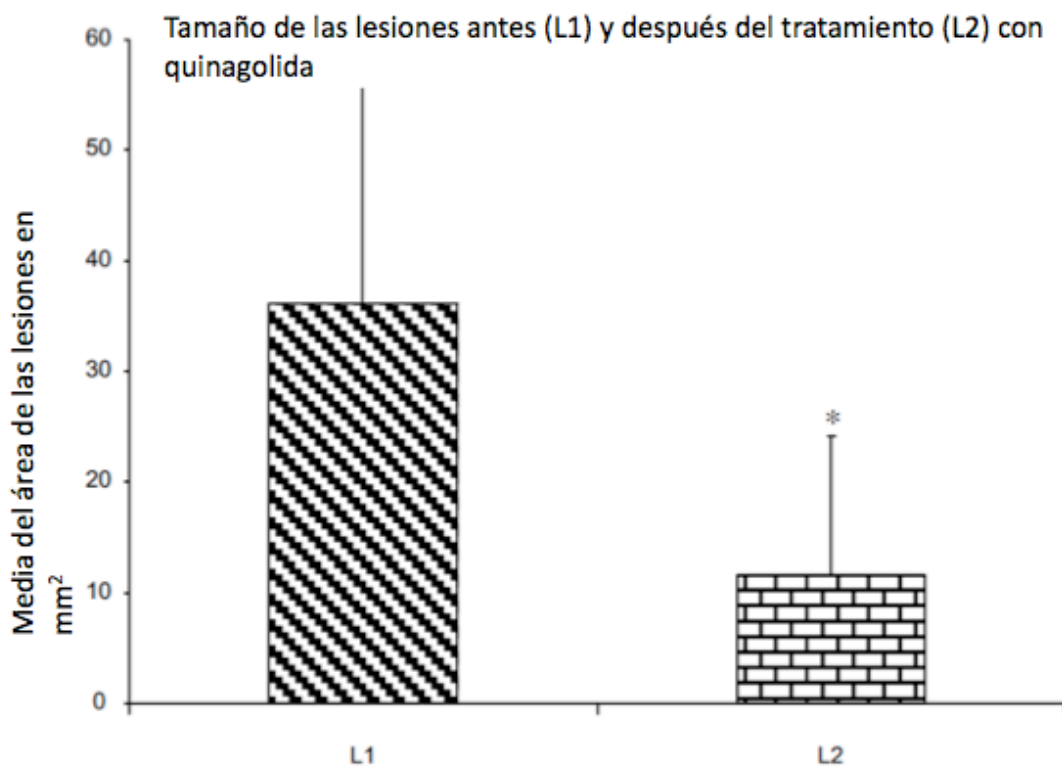
Durante la primera etapa, en la primera laparoscopia, se dejaron referenciadas en total 23 lesiones rojas, de las cuales, durante la segunda etapa sólo se pudieron recuperar un total de 15 lesiones rojas, ya que 8 de las 23 habían desaparecido por completo. De las 15 lesiones biopsiadas en la segunda laparoscopia, 1 de ellas era de mayor tamaño que antes del tratamiento, 1 no había modificado su tamaño significativamente, y las 13 restantes habían reducido su tamaño (Fig 13).

En cuanto a los cambios en la superficie de tejido endometriósico tras el tratamiento, considerando que las 8 lesiones desaparecidas suponían una reducción del 100% de la superficie, la media de la superficie total del tejido endometriósico referenciado durante la primera laparoscopia en el conjunto de las nueve mujeres se redujo en un 69.5% (de  $36.09 \pm 20.56 \text{ mm}^2$  durante la primera laparoscopia, a  $11.57 \pm 12.54 \text{ mm}^2$  en la segunda laparoscopia);  $p < 0.05$  (Fig 14).





**Figura 13:** En este gráfico se representa la superficie de cada una de las lesiones referenciadas durante la primera laparoscopia (L1) así como el tamaño de estas mismas lesiones durante la segunda laparoscopia (L2) y tras 20 semanas de tratamiento con quinagolida). El cálculo del área de cada lesión se determinó objetivamente mediante el software de análisis de imagen Image-Pro Plus y se expresó en mm<sup>2</sup> tal y como se muestra en el eje de ordenadas Y). Cada una de las 23 lesiones rojas referenciadas durante la primera laparoscopia se considera un “caso” y se representa mediante un número de serie. Cabe destacar que, de las 23 lesiones referenciadas durante la primera laparoscopia, 8 habían desaparecido en la segunda laparoscopia (valor 0 en el eje de ordenadas), una había aumentado de tamaño (lesión identificada como serie 22), otra había mantenido su tamaño (lesión identificada como serie 5), y el resto habían reducido su tamaño. El test utilizado para comparar estadísticamente el tamaño de las lesiones antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida fue un Test de Wilcoxon para muestras pareadas: \*  $p < 0.05$ .



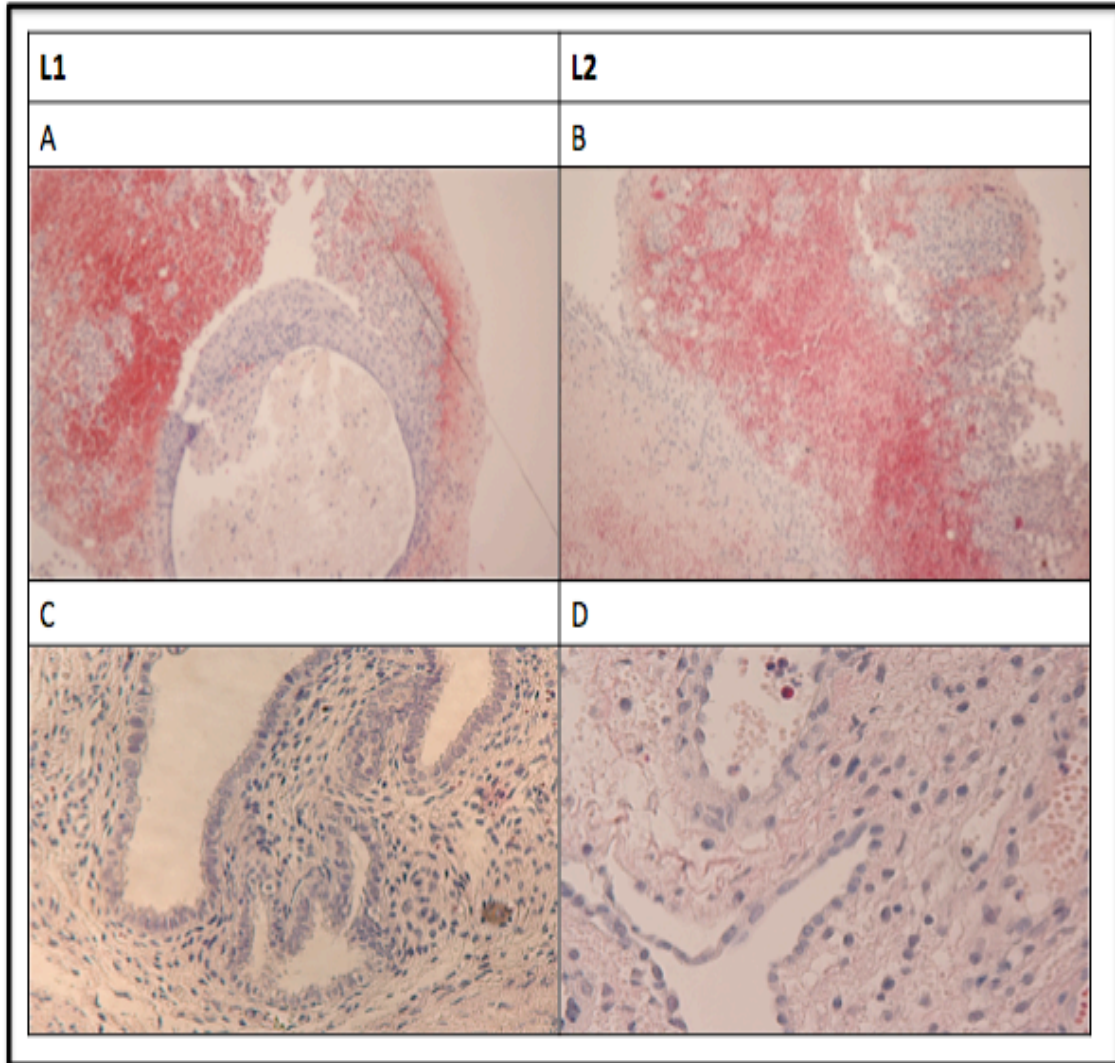
**Figura 14.** En este gráfico de barras se representa la media  $\pm$  DS del área de la superficie de las lesiones endometriósicas referenciadas durante la primera laparoscopia (L1) así como el tamaño de estas mismas lesiones durante la segunda laparoscopia (L2) tras 20 semanas de tratamiento con quinagolida). El tamaño de las lesiones fue medido mediante el software Image-Pro Plus sobre las imágenes procedentes de los vídeos de las intervenciones y se expresó en mm<sup>2</sup>. Cabe destacar que la media de la superficie total del tejido endometriósico referenciado durante la primera laparoscopia en el conjunto de las nueve mujeres se redujo en un 69.5% tras el tratamiento con quinagolida. Para el análisis comparativo estadístico utilizamos el Test de Mann Whitney, \* $P < 0.05$ .

## **5.4. Cambios microscópicos.**

### **5.4.1. Cambios histológicos.**

Cuando analizamos la histología de las biopsias de las lesiones peritoneales obtenidas durante la primera cirugía pudimos observar como éstas mostraban un patrón histológico típico de la endometriosis peritoneal fuertemente organizado. Dicho patrón se caracteriza por tejido glandular dispuesto en su mayoría de manera circular, dejando un espacio central ocupado por las secreciones glandulares. Asimismo y como parte de dicha estructura altamente cohesionada, se encontraba el estroma, organizado, con presencia de fibroblastos y estroma no celular ocupando el espacio intercelular.

En 15 de las biopsias peritoneales obtenidas durante la segunda laparoscopia, observamos que el típico patrón constituido por glándulas y estroma fuertemente organizado había desaparecido, y en su lugar encontramos una matriz estromal laxa, escasa, y con poca celularidad (Fig 15). Esos indicios eran claramente indicativos del inicio en la regresión del tejido endometriósico. En apoyo de este argumento cabe recordar que 8 de las 23 lesiones ni siquiera pudieron ser encontradas pues habían desaparecido después del tratamiento con quinagolida.



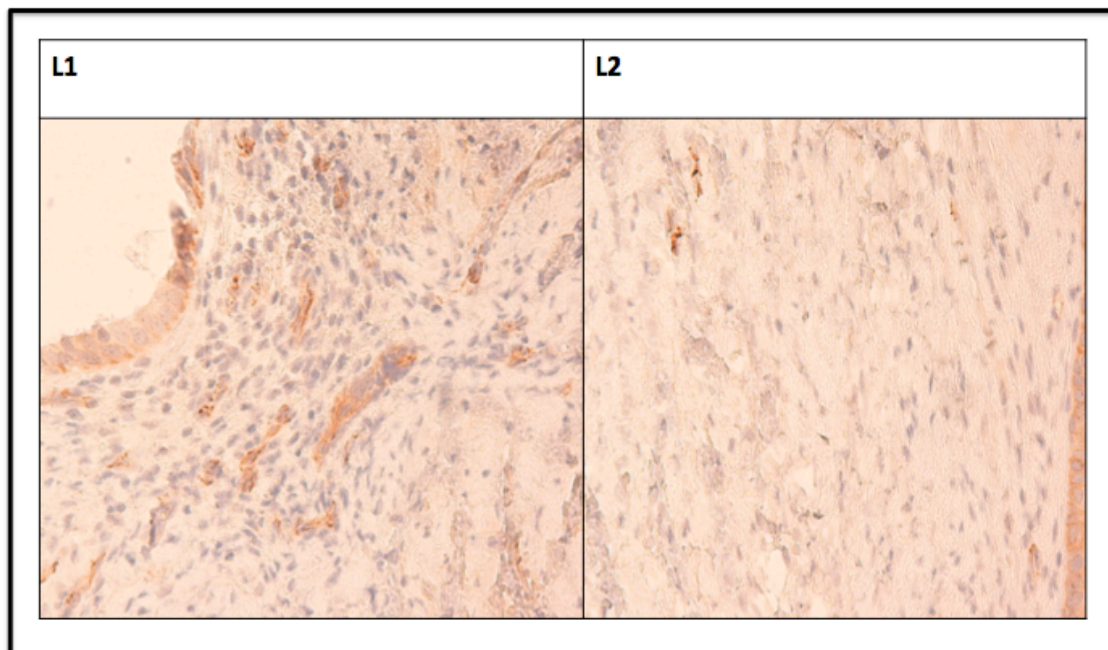
**Figura 15.** En estas imágenes se muestra un ejemplo ilustrativo de la histología con tinción de Hematoxilina-Eosina obtenida de las lesiones rojas antes (L1) y de lesiones referencias obtenidas después (L2) del tratamiento. En las imágenes A y B, a un aumento de 10 campos (x10), podemos observar la histología típica de las lesiones rojas endometriósicas, con el componente glandular endometrial envuelto por gran cantidad de sangre. Las imágenes C y D muestran las mismas lesiones a mayor aumento (x40). Nótese como la muestra inicial (C) presenta un epitelio glandular bien organizado y un estroma densamente celular, mientras que la biopsia posterior (D), el estroma es más laxo, y pobre en células, presentando un epitelio glandular poco organizado y con pérdida de su estructura típica.

## **5.4.2 Cambios inmunohistoquímicos:**

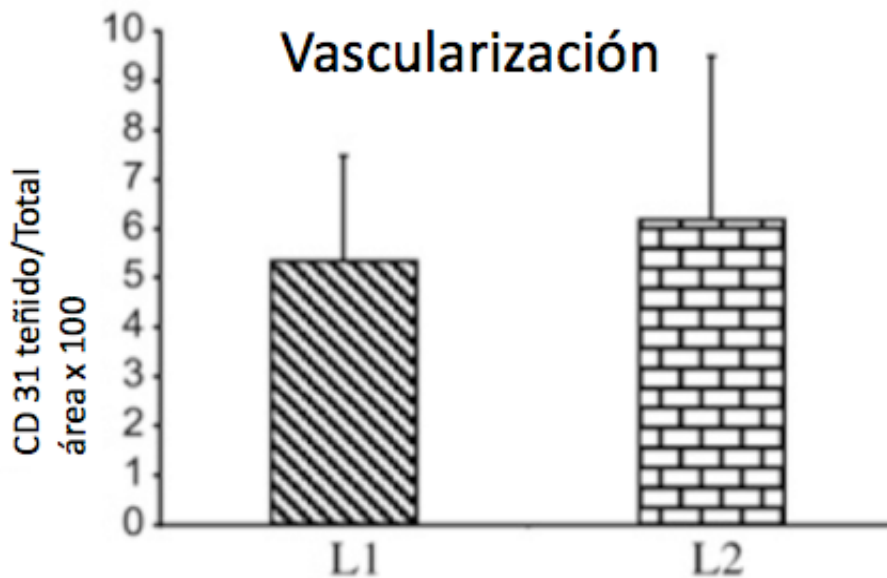
Los cambios inducidos por el fármaco en los parámetros inmunohistoquímicos de interés se describen a continuación:

### **5.4.2.1 Vascularización**

Como hemos mencionado anteriormente, se utilizó el marcador endotelial CD31 para la detección de endotelio, y así poder estudiar los cambios a nivel de la densidad vascular ejercidos por el fármaco quinagolida (fig 16). Vemos como en las imágenes los vasos sanguíneos aparecen teñidos intensamente de color marrón, mostrando la vascularización del tejido en cada caso. En ambos se observa una distribución homogénea. Aunque, como podemos apreciar en las imágenes, la cantidad de vasos sanguíneos teñidos aparentemente es mayor antes del tratamiento, tras el análisis cuantitativo realizado con el sistema de análisis Image-Pro Plus no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área de vascularización antes y después del tratamiento ( $p = 0,58$ ) (Fig 17).



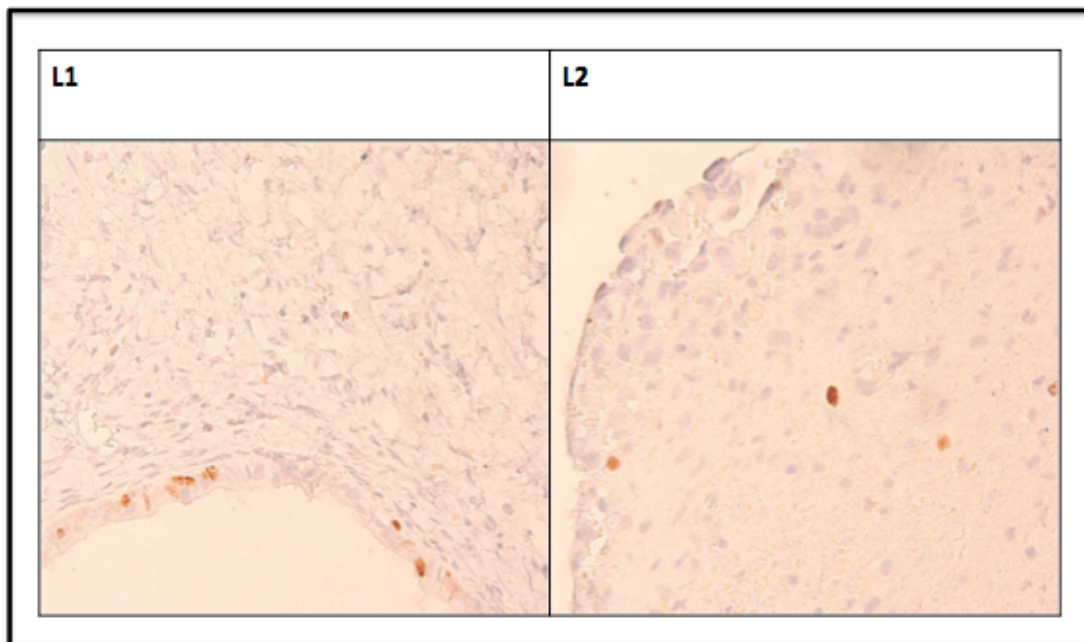
**Figura 16.** Imágenes ilustrativas de inmunohistoquímica para el estudio de la vascularización. En ellas se muestran la lesiones con la tinción inmunohistoquímica para el anticuerpo CD31 antes (L1) y después del tratamiento (L2) a 40 aumentos (x40). Los vasos sanguíneos aparecen teñidos de color marrón.



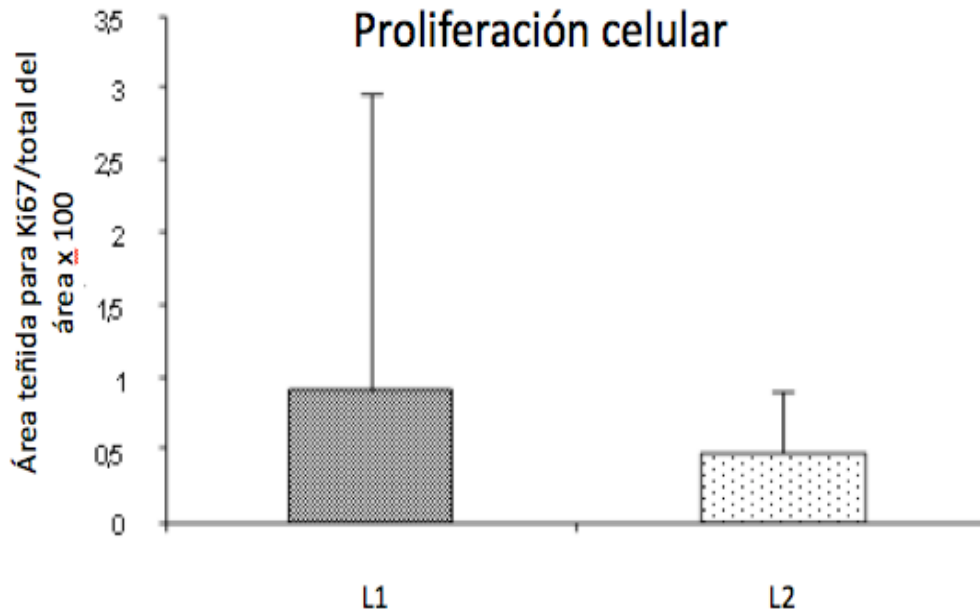
**Figura 17.** Este gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo de vascularización a partir de las áreas con tinción positiva para el antígeno CD31 obtenidas en secciones de la lesión a estudio antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida. Los resultados se representan como la ratio área teñida para el antígeno CD31/área total del tejido analizado multiplicado por 100. No se detectaron diferencias estadísticamente significativa de la vascularización en las lesiones endometriósicas después del tratamiento con quinagolida ( $p=0,58$ ).

#### **5.4.2.2 Proliferación celular.**

Para el estudio de la proliferación celular se utilizó el anticuerpo monoclonal frente al antígeno nuclear Ki67. En las imágenes procedentes de lesiones antes (L1) y después (L2) del tratamiento (Fig 18), se observan las células que presentan actividad proliferativa con una tinción nuclear marrón oscuro frente a la tinción violácea de los núcleos de las células no proliferativas. Se observa una menor cantidad de núcleos teñidos tras la administración de quinagolida. No obstante, tras el análisis cuantitativo realizado con el sistema de análisis Image-Pro Plus no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 1,0$ ) (Fig 19).



**Figura 18.** Imágenes de inmunohistoquímica para el estudio de la vascularización. En las imágenes se representan las muestras con la tinción inmunohistoquímica para el antígeno nuclear Ki67 antes (L1) y después del tratamiento (L2) a 40 aumentos (x40). Podemos distinguir las células proliferativas como positivas para el Ki67, mostrando el núcleo teñido de marrón.



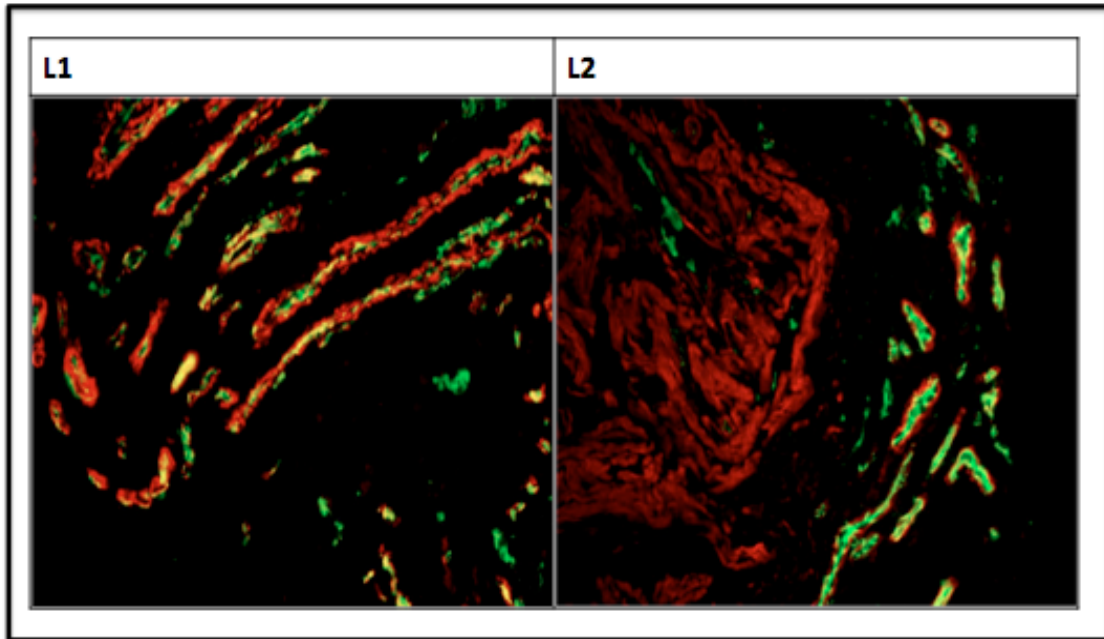
**Figura 19.** Este diagrama de barras muestra el análisis cuantitativo de las áreas con tinción positiva para el antígeno nuclear ki67 respecto el total del área de lesión a estudio antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida. Los resultados se representan como la ratio área teñida para el antígeno Ki67/área total del tejido analizado multiplicado por 100. Podemos ver como se pudo observar una disminución de la proliferación vascular en las lesiones endometriósicas después del tratamiento con quinagolida, aunque ésta no fue estadísticamente significativa ( $p=1$ ).

#### **5.4.2.3 Madurez de los vasos sanguíneos.**

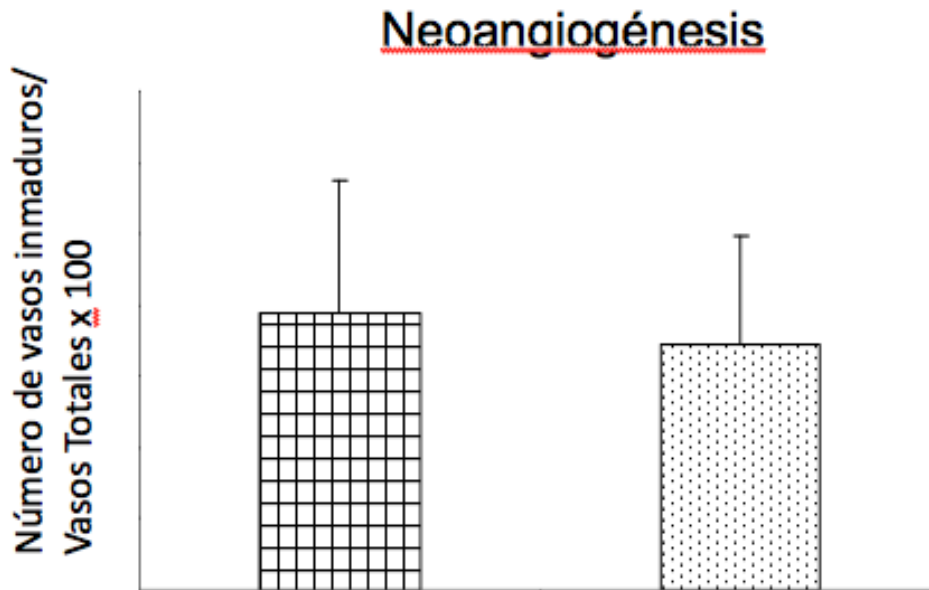
La madurez de los vasos sanguíneos fue determinada de forma manual por el operador a través del conteo de número de vasos maduros (CD31+/ $\alpha$ -SMA+), con presencia de pericitos a su alrededor, e inmaduros (CD31+/ $\alpha$ -SMA-), vasos de reciente formación carentes de pericitos en su estructura. En la figura 20 podemos observar las imágenes procedentes de cortes antes (L1) y después (L2) del tratamiento. Los vasos maduros presentan una tinción doble (verde fluorescente para el endotelio y rojo para los pericitos), mientras que los inmaduros aparecen con una tinción única verde fluorescente. Podemos ver como en la muestra procedente de tejido tras el tratamiento, se encuentran muy escasos vasos



inmaduros respecto del total. Sin embargo, tras el análisis cuantitativo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,429$ ) (Fig 21).



**Figura 20.** Imágenes de inmunofluorescencia para el estudio de la neoangiogénesis. En las imágenes se representa la coexpresión CD31/ $\alpha$ SMA en las lesiones antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida (x20). Se utilizó un marcador endotelial, el CD31, (fluorescencia verde) para marcar de forma global (tanto maduros como inmaduros) los vasos sanguíneos. Los vasos maduros se identificaron mediante inmunofluorescencia de ( $\alpha$ -SMA), (fluorescencia roja). El color amarillo es producto del solapamiento de ambas. Tras la cuantificación no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos muestras ( $p= 0,429$ ).

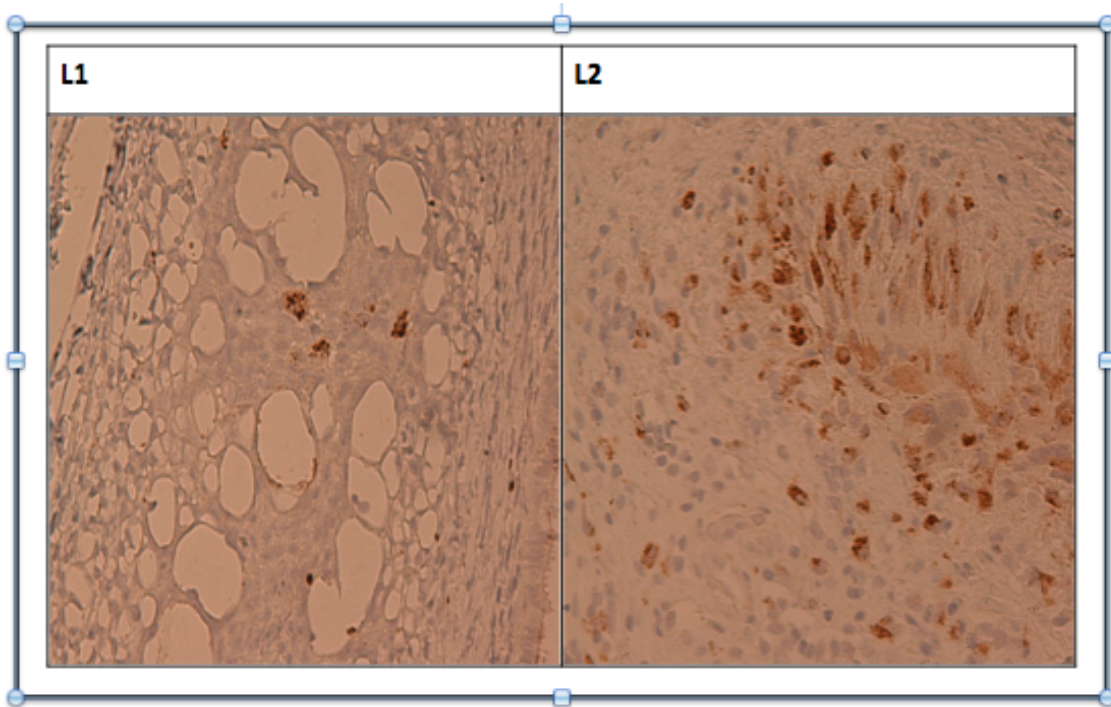


**Figura 21.** Este diagrama de barras muestra el análisis cuantitativo de las áreas con tinción positiva para CD31/negativa para SMA respecto al total del área de lesión a estudio antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida, en fotografías tomadas a 40 aumentos y analizadas mediante el programa específico Image-Pro Plus. Los resultados se representan como la ratio área teñida para el antígeno CD31/negativo SMA respecto del total del área del tejido analizado multiplicado por 100. Podemos ver como se pudo observar una disminución de la neoangiogénesis en las lesiones endometriósicas después del tratamiento con quinagolida, aunque ésta no fue estadísticamente significativa ( $p=0,429$ ).

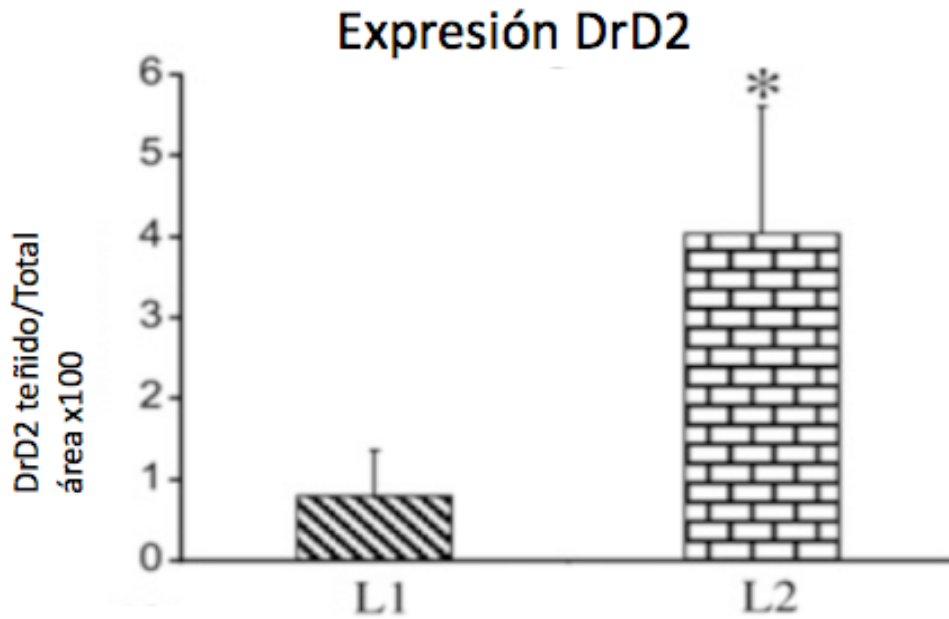
#### 5.4.2.4. Expresión del DrD2.

Al comparar las muestras procedentes de ambas cirugías para analizar las diferencias en cuanto a la expresión del DrD2, pudimos observar como la tinción para los anticuerpos específicos contra el receptor D2 mostró, en las imágenes procedentes de la segunda laparoscopia, tras el tratamiento, una señal punteada y con una clara regulación a la alta, inducido por el tratamiento con quinagolida

(Fig 22). Esta diferencia con las muestras procedentes de las pacientes antes del tratamiento fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Fig 23).



**Figura 22.** *Imágenes de inmunohistoquímica para la determinación de la expresión del receptor tipo 2 de la Dopamina. Las células que expresan DrD2 aparecen teñidas de color marrón. Podemos observar claramente como la cantidad de células que expresan el DrD2 tras el tratamiento con quinagolida (L2) es mucho mayor que antes del tratamiento (L1).*

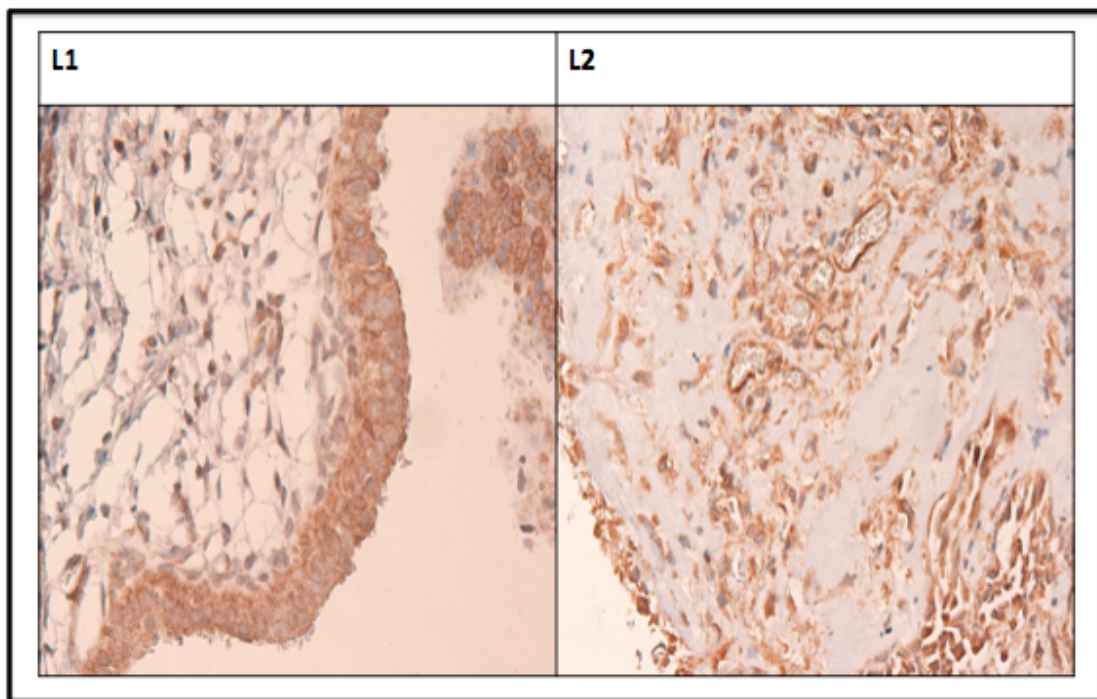


**Figura 23.** Este diagrama de barras muestra el análisis cuantitativo de las áreas con tinción positiva para el receptor tipo 2 de la Dopamina (DrD2) respecto el total del área de lesión a estudio antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida. La cuantificación se realizó a partir de fotografías ilustrativas de las tinciones tomadas a 40X y se analizaron mediante el programa específico Image-Pro Plus. Los resultados se representan como la ratio (área teñida para el receptor DrD2/área total del tejido analizado) y multiplicado por 100. Nótese el incremento del parámetro de estudio en L2 vs L1. \* $P < .05$ .

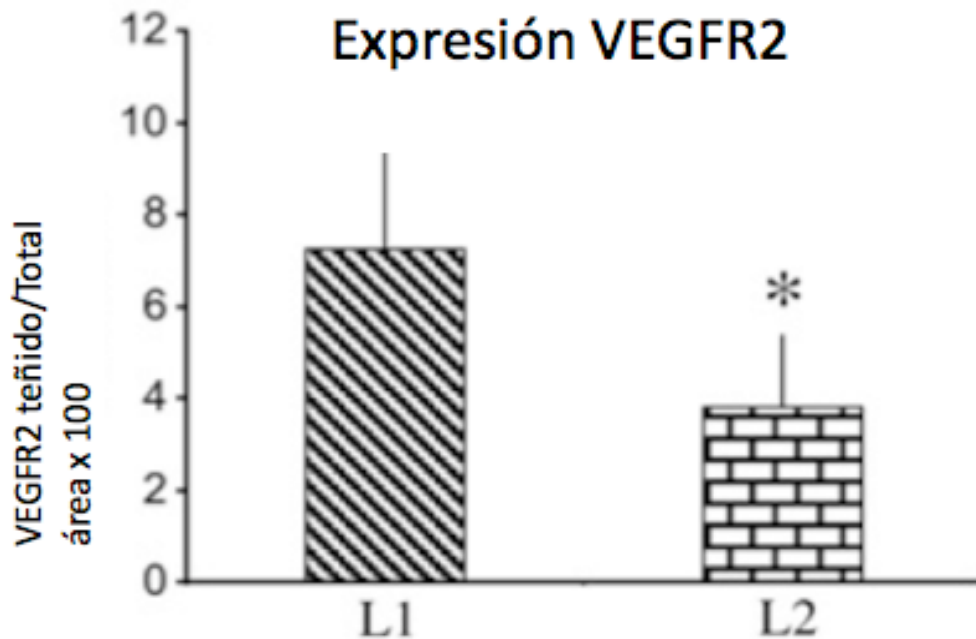
#### 5.4.2.5 Expresión y activación VEGFR2.

Tanto en las muestras obtenidas antes (L1) como en las de después del tratamiento (L2), la señal que obtuvimos para el VEGFR2 fue muy buena, si bien es cierto que a simple vista se pudo observar una franca disminución de éste en las muestras procedentes de la segunda cirugía (Fig 24). En el análisis de las diferencias de la expresión del VEGFR2, observamos que la densidad de señal para éste tras el tratamiento se había reducido a la mitad ( $p < 0,05$ ) (Figura 25). A pesar de utilizar un nivel muy alto de anticuerpo primario (1:10), las señales obtenidas para el VEGFR2-Tyr1054 y para el VEGFR2-Tyr1212 fueron tan débiles, que las imágenes obtenidas tanto en L1 como L2 no permitieron al software Image-Pro Plus discriminar las señales positivas sobre el resto de la tinción. Debido pues a que las señales correspondiente a VEGFR2-Tyr1054 y VEGFR2-Tyr1212 no pudieron ser cuantificadas, procedimos a descartar estos parámetros

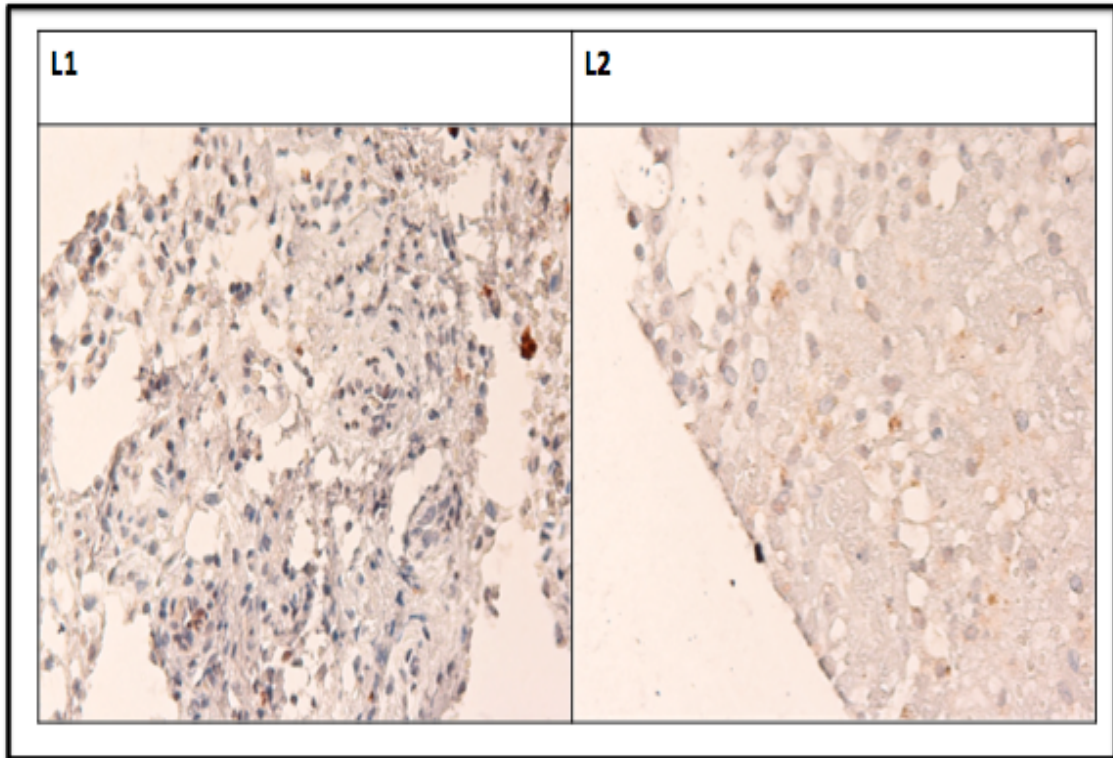
del estudio. La tinción para El VEGFR2-Tyr 951, en cambio, proporcionó una señal clara en las muestras de la primera cirugía, así como una señal, de menor intensidad pero todavía detectable, en las muestras procedentes de la segunda laparoscopia (Fig 26). Gracias a ello se pudo observar la disminución, prácticamente al 50%, de la fosforilación del VEGFR2-Tyr 951 (Fig 26 y 27). Observamos que la disminución en la intensidad de Tyr-951, hasta en un 50 %, acaecía en paralelo a la reducción a la mitad de la intensidad de señal del VEGFR2 (Fig 24 y 25). Esto parecería indicar, por tanto, que la disminución en la actividad (fosforilación) del VEGFR2 estaría reflejando simple y llanamente una reducción en la expresión del VEGFR2.



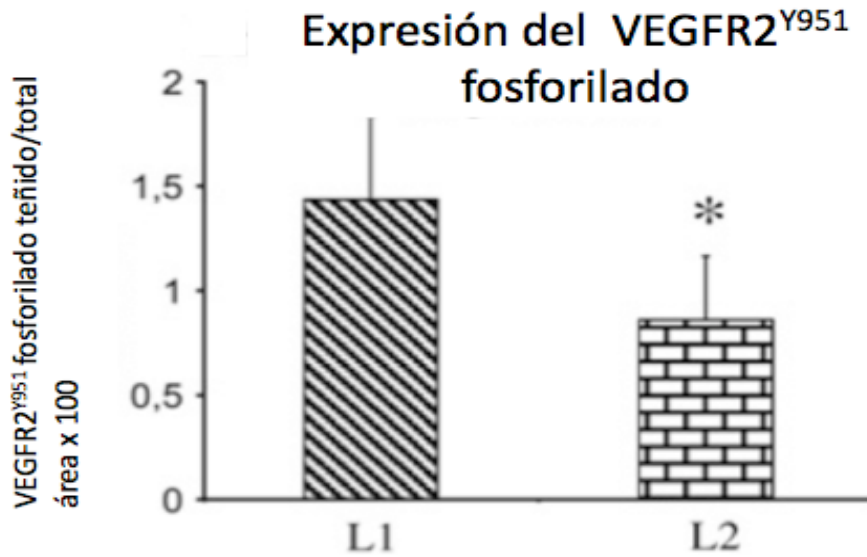
**Figura 24.** En estas imágenes observamos la tinción inmunohistoquímica para el Receptor tipo 2 del VEGF (VEGFR2), antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida (x40). En ambos casos podemos encontrar una marcada expresión del receptor en el tejido procedente de las lesiones endometriósicas, aunque tras el tratamiento parece apreciarse a simple vista una disminución en esta expresión.



**Figura 25.** Este gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo de las áreas con tinción positiva para el Receptor tipo 2 del VEGF respecto al total del área de lesión a estudio antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida, en fotografías tomadas a 40 aumentos y analizadas mediante el programa específico Image-Pro Plus. Los resultados se representan como la ratio (área teñida para el receptor VEGFR2/área total del tejido analizado) multiplicado por 100. Podemos observar como, a pesar que la expresión del VEGFR2 estaba presente de forma significativa en ambos tipos de lesiones, se pudo demostrar una disminución de ésta en el tejido sometido al tratamiento con quinagolida de forma estadísticamente significativa. \* $P < .05$ .



**Figura 26.** Imagen ilustrativa que muestra tinción (color marron-negro parduzco) para el VEGFR2 fosforilado específicamente en la tirosina en posición 951 (VEGFR2-Tyr 951) antes (L1) y después (L2) del empleo de quinagolida. Las secciones fueron ligeramente teñidas con hematoxilina como contraste. Podemos observar una tinción para VEGFR2 tyr951 débil pero todavía distinguible en ambos casos. Se aprecia una aparente reducción en el número de células marcadas así como en la intensidad de la tinción en las lesiones obtenidas tras el tratamiento.



**Figura 27.** Este gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo de las áreas con tinción positiva para el VEGFR2 fosforilado en la tirosina en posición 951 (VEGFR2<sup>Y951</sup>) respecto al total del área de lesión a estudio antes (L1) y después (L2) del tratamiento con quinagolida, en fotografías tomadas a 40 aumentos y analizadas mediante el programa específico Image-Pro Plus. Los resultados se representan como la ratio (área teñida para el receptor VEGFR2<sup>Y951</sup>/área total del tejido analizado) multiplicado por 100. Podemos observar como, a pesar que la expresión del VEGFR2<sup>Y951</sup> es débil en ambos tipos de lesiones, ocupando una pequeña área respecto del total, ésta se reduce prácticamente a la mitad después del tratamiento, de forma estadísticamente significativa. \*P<.05.

## 5.5 Resultados del PCR Superarray de genes implicados en la inflamación y la vascularización en tejido procedente de las lesiones endometriósicas.

Por último, uno de los objetivos de nuestro estudio era analizar los cambios en la expresión génica de los factores implicados en la angiogénesis y en los procesos inflamatorios a nivel molecular, mediados por la acción de la quinagolida.

Para ello, se realizó un superarray PCR con 16 muestras de cDNA, 9 procedentes del material obtenido por biopsia peritoneal en cada una de las laparoscopias iniciales realizadas a las 9 pacientes incluidas en el estudio, y 7 con las



muestras obtenidas por biopsia de las lesiones peritoneales durante la segunda laparoscopia en las 7 pacientes en las que encontramos lesiones. Hay que recordar que en dos pacientes desaparecieron por completo las lesiones endometriósicas tras el tratamiento con quinagolida por lo que se utilizó una placa de superarray para cada una de las muestras individuales. En concreto el array que utilizamos se encuentra comercialmente disponible en el mercado (PAHS-072E-4 de SAP Biosciences, Frederick, Maryland, EEUU) y consiste en una placa de PCR que contiene los primers para amplificar un panel de un total de 84 citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y factores inhibidores de la angiogénesis.

La comparación de las 9 muestras iniciales frente las 7 muestras procedentes de la segunda laparoscopia y su posterior análisis estadístico reveló que el tratamiento con quinagolida había dado lugar a una inhibición en la expresión génica, estadísticamente significativa, de 5 genes implicados en la angiogénesis (Serpina 1, CCL2 (Quimioquina ligando 2), VEGF, AGGF1 (*Angiogenic factor with G patch and FHA domains*), RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*)), y a una sobreexpresión génica, también estadísticamente significativa, de uno de ellos CXCL10 (C-X-C motif chemokine).

GEN	VALOR DE P VS EL CONTROL	MAGNITUD Y SENTIDO DE LA REGULACIÓN TRAS EL TRATAMIENTO
SERPINA 1	.03254 <sup>a</sup>	-19.8491
AGGF1	.0376 <sup>a</sup>	-3.1984
CCL2	.04389 <sup>a</sup>	-6.1199
VEGF	.04428 <sup>a</sup>	-5.8199
CXCL10	.04770 <sup>a</sup>	6.7693
RUNX1	.04901 <sup>a</sup>	-4.3878
CXCL12	.08206	-3.3952
BTG1	.086207	-3.3776
FST	.10483	-3.0136
RHOB	.12902	-1.7303
FGFBP1	.15187	-3.0283
FGF1	.165346	-2.5955
SERPINF1	.183201	-1.9339
STAB	.19273	-5.4869

**Tabla 4. Análisis estadístico para la identificación de genes regulados por el tratamiento con quinagolida en el ADN de las muestras procedentes de lesiones peritoneales obtenidas en las laparoscopias L1 y L2, tras la realización de QF-PCR utilizando un superarray (PAHS-072E-4).** En esta tabla se muestran los 14 genes que sufrieron mayor regulación, de entre las 84 citoquinas implicadas en los procesos de inflamación y angiogénesis incluidas en el kit del superarray PAHS-072E-4, disponible en el mercado y empleado en nuestro estudio. Los genes se han ordenado en la tabla en la primera columna según su valor de P, en sentido creciente (valor de P situado en la columna central). Un valor de P menor indica mayor probabilidad de que la regulación sufrida por un determinado gen no sea debida al azar. La tercera columna muestra la regulación experimentada a la alza (valores positivos), o a la baja (valores negativos) de los genes procedentes de las lesiones peritoneales tratadas con quinagolida (L2) respecto de aquellos procedentes de las lesiones no tratadas (L1).<sup>a</sup> P<.05

## **6. DISCUSIÓN**



La endometriosis es una enfermedad con elevada prevalencia en la población de mujeres en edad fértil (Goldstein y cols, 1980; Eskenazi y cols, 1997; Gazvani y cols, 2002), que cursa con dolor pélvico crónico, dismenorrea, sangrados irregulares e infertilidad, principalmente (Goldstein y cols, 1980; Eskenazi y cols, 1997). Esta sintomatología causa una merma en la calidad de vida de la paciente (D’Hooghe T y cols, 2006) y un gran gasto en términos económicos y sociales (Simoens y cols, 2007), de lo que se deriva su gran importancia. Ésto, unido a las múltiples cuestiones que se desconocen o están en controversia en relación a la enfermedad, justifica el enorme interés que despierta a nivel científico e investigador. Una de las cuestiones en controversia es el debate entre el tratamiento médico y quirúrgico, convirtiéndose en tema reiterado de estudio el hecho de hallar el abordaje farmacológico capaz de tratar la enfermedad y disminuir las recidivas, tratando de maximizar el uso de los tratamientos médicos sobre los tratamientos quirúrgicos de repetición.

Dentro de los tratamientos médicos, los más utilizados en la actualidad son los tratamientos hormonales antiestrogénicos, administrados en base a las características hormonodependientes de la endometriosis (Speroff y Fritz, 2006). Ninguno de ellos, no obstante, se ha mostrado completamente satisfactorio (Mihalyi y cols, 2006). En cambio tienen efectos secundarios derivados de su acción hormonal, induciendo muchos de ellos una menopausia artificial durante su uso, sofocos, efectos deletéreos sobre la densidad mineral ósea, entre otros (Surrey, 2006; Crosignani y cols, 2006; Fedele y Berlanda, 2004). Además, interfieren claramente en la capacidad reproductiva de las pacientes (Olivares y cols, 2008). Si además consideramos que nos referimos a una enfermedad crónica que necesita de tratamiento a largo plazo (Rice, 2002; Valle y Sciarra, 2003), estos problemas adquieren mayor magnitud.

Por ello, nuestra motivación inicial para este trabajo fue encontrar una terapia no hormonal que fuese eficaz en el tratamiento de la endometriosis. Todo ello teniendo en cuenta que administrado de forma continuada y crónica, como requiere esta enfermedad, no presentase los efectos secundarios descritos anteriormente característicos de las terapias hormonales.

Nuestro punto de partida en esta búsqueda se inició con el conocimiento del hecho de que existían compuestos capaces de inhibir la angiogénesis, requisito

fundamental para el establecimiento y desarrollo de la endometriosis (Nap y cols, 2004), inhibiendo el sistema VEGF/VEGFR2. Los agentes angiostáticos se desarrollaron inicialmente en el campo de la oncología. En humanos el Avastin, un anticuerpo humanizado anti-VEGF, demostró una disminución de la angiogénesis en pacientes oncológicas (Ferrara, 2002; McCarthy, 2003). Desafortunadamente, los efectos secundarios que se derivan de su acción difícilmente serían tolerables éticamente en mujeres con patologías angiogénico-dependientes no tumorales como la endometriosis (Via y cols, 2000). No obstante, los ensayos realizados con estos compuestos en modelos animales de endometriosis consiguieron demostrar una reducción significativa de los implantes endometriósicos de los animales tratados (Hull y cols, 2003; Nap y cols, 2004). Estos hallazgos confirmaban su utilidad en el tratamiento de la endometriosis y suponían, por tanto, nuestro punto de partida para la búsqueda de una droga menos tóxica pero igualmente efectiva de modo que permitiera su uso terapéutico en humanos.

Por ello, había que buscar compuestos que fuesen capaces de inhibir el sistema VEGF pero de una forma no tóxica. En este sentido, Gómez y cols iniciaron en 2002 una sucesión de estudios sobre el SHO y su tratamiento mediante inhibidores sistema VEGF/VEGFR2. Éstos desembocarían en el hallazgo, en 2006, de que los agonistas del receptor D2 de la dopamina como Bromocriptina y Cabergolina eran capaces de revertir el proceso de incremento de permeabilidad mediado por la sobreexpresión de VEGF (Gomez y cols, 2006). Posteriormente la Cabergolina se confirmó como un tratamiento exitoso para el SHO en humanos (Álvarez y cols, 2007).

Estos trabajos mostraban pues cómo se podía inhibir el VEGF/VEGFR de forma no tóxica, y sentaba las bases para su aplicación en el tratamiento de la endometriosis, inhibiendo la angiogénesis de las lesiones a través del bloqueo del sistema VEGF/VEGFR2. Tomando como punto de partida los hallazgos encontrados por Gómez y Álvarez, Novella-Maestre y colaboradores pusieron en marcha una serie de trabajos con el objetivo de demostrar esta hipótesis, empleando un modelo animal heterólogo de endometriosis. En este trabajo se demostró que el uso de Cabergolina (Cb2), un agonista dopaminérgico, produce una disminución del tamaño de las lesiones activas y una disminución significativa del índice proliferativo (Novella-Maestre y cols, 2009), así como un cambio en el aspecto microscópico hacia lesiones con menor celularidad

(Novella-Maestre y cols, 2009). Al mismo tiempo se comprobó que la Cabergolina inducía una disminución en la expresión de los factores proangiogénicos como VEGF y del nivel de fosforilación del VEGFR-2, además de un aumento de la expresión de marcadores anti-angiogénicos como Angiopeptina 1 (Ang-1), (Novella-Maestre y cols, 2009).

En un estudio posterior el grupo de Delgado-Rosas y cols (Delgado-Rosas y cols, 2011) y empleando el mismo modelo animal que Novella y cols, demostró que otro agonista dopaminérgico D2 distinto de la cabergolina como la quinagolida era igualmente eficiente en la disminución de las lesiones endometriósicas confirmando las hipótesis inicial del grupo de Novella et al.

Animados pues por el hecho de poder disponer de un tratamiento no hormonal, antiangiogénico y no tóxico, que había demostrado su eficacia en el tratamiento de la endometriosis en animales, nos propusimos realizar este trabajo para estudiar si estos mismos resultados se podían trasladar a los humanos.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar, por primera vez, el efecto del tratamiento con el agonista-DrD2 dopaminérgico quinagolida sobre el tamaño de las lesiones endometriósicas peritoneales de mujeres con endometriosis. Al mismo tiempo, hemos analizado el efecto de este fármaco sobre los procesos de angiogénesis, con especial atención al sistema VEGF/VEGFR2.

A continuación nos dispondremos a explicar los resultados obtenidos en base a los parámetros utilizados para evaluar los efectos del fármaco a diferentes niveles:

En primer lugar, quisimos analizar los efectos de la quinagolida a nivel macroscópico. A la luz de los resultados obtenidos podemos decir que esta es la primera vez que se observa que un tratamiento no hormonal es capaz de inducir la desaparición completa o reducción en el tamaño de las lesiones peritoneales de mujeres con endometriosis. La quinagolida es además la primera terapia antiangiogénica aplicada a humanos para el tratamiento de la endometriosis. Precisamente por tratarse de un agonista dopaminérgico con un perfil bajo de efectos secundarios probado con su uso en otros campos, nos ofrece la posibilidad de

administrarla de forma continua y segura para las pacientes, lo cual nos parecía esencial al inicio de nuestro trabajo.

Tras evidenciar los excelentes resultados a nivel macroscópico sobre las lesiones tratadas, pasamos a analizar los cambios histológicos ocurridos en éstas. La evaluación a nivel histológico de las lesiones después del tratamiento (L2) mostró una pérdida de la organización típica de las lesiones endometriósicas. En éstas observamos típicamente una estricta relación entre las glándulas, que se disponen en forma circular, y el estroma que se encuentra fuertemente organizado con gran presencia de fibroblastos y estroma no celular dispuesto en el espacio intercelular. En cambio, las lesiones obtenidas en la segunda laparoscopia tras el tratamiento presentaban un estroma laxo, escaso, y con poca celularidad. Estos hallazgos sugieren que la quinagolida inducía de algún modo la degeneración tisular en las lesiones endometriósicas.

Posteriormente indagamos en cuáles podían ser las causas de los cambios observados, centrándonos ya en el estudio inmunohistoquímico de los marcadores angiogénicos. Siendo como es la quinagolida un fármaco con supuestas capacidades antiangiogénicas, quisimos investigar más en los mecanismos de acción de ésta. Para ello evaluamos los efectos a nivel de la angiogénesis sobre las lesiones analizando el grado de vascularización o densidad vascular, la proliferación vascular y la neoangiogénesis, antes y después del tratamiento. No pudimos demostrar una disminución de la densidad vascular mediante el marcaje inmunohistoquímico del marcador endotelial CD31. Tampoco se observó que los vasos inmaduros de reciente formación (CD31+/SMA-), y por tanto, la neoangiogénesis, se viera significativamente reducida en las lesiones endometriósicas sometidas al tratamiento con quinagolida. Aunque pudimos observar una tendencia a la disminución en la mayoría de estos parámetros, incluida la proliferación celular, en ningún caso fue significativa como hemos comentado.

En nuestra determinación a la hora de esclarecer el mecanismo de acción de la quinagolida sobre las lesiones endometriósicas, estudiamos el efecto de la quinagolida sobre la expresión, producción y regulación del sistema VEGF/VEGFR2. Basándonos,



como hemos comentado inicialmente, en los hallazgos obtenidos en modelo animal (Novella- Maestre y cols, 2009; Gómez y cols, 2006), nosotros esperábamos encontrar que al administrar la quinagolida se iba a producir una activación y regulación al alza de los Receptores tipo 2 de la Dopamina (Drd2) en las células endoteliales, lo cual produciría mediante un mecanismo autocrino, una disminución en la fosforilación del VEGFR2. Como resultado de la inhibición del VEGFR2 se esperaba que se inhibiera la vascularización y neovascularización de las lesiones endometriósicas mediante la reducción de la proliferación y densidad vascular. Nosotros corroboramos nuestras expectativas en este punto sólo a la mitad. En efecto, después del tratamiento con quinagolida, pudimos observar un incremento en la expresión del Drd2 en las lesiones endometriósicas de forma significativa, asociado a una disminución de la expresión del VEGFR2, así como una menor fosforilación o activación de éste, todas ellas diferencias estadísticamente significativas. No obstante, a pesar de la corroboración de estos hallazgos, similares a los encontrados en el modelo animal (Novella-Maestre y cols, 2009; Delgado-Rosas, Gómez y cols, 2011), no pudimos demostrar, como hemos comentado anteriormente, diferencias significativas en cuanto a la vascularización y neoformación de vasos.

Nos planteamos entonces cuál podría ser la causa de estos hallazgos discordantes con los encontrados en el modelo animal de endometriosis (Novella y cols, 2009), en el que sí que se demostraba una disminución de la proliferación celular, vascularización y una reducción en el número de lesiones endometriósicas peritoneales. En este sentido no podemos obviar el hecho que de las 23 lesiones referenciadas en la primera laparoscopia, sólo pudimos recuperar 15 durante la segunda cirugía tras 20 semanas de tratamiento. Por tanto, aunque se demostró una reducción en el tamaño de las lesiones e incluso desaparición completa de algunas de ellas en relación a la primera cirugía, no pudimos estudiar en las lesiones desaparecidas si la quinagolida tenía o no un efecto antiangiogénico, quedando pues éste potencialmente enmascarado. De hecho, en un reciente trabajo publicado por Kurt y colaboradores, aportan datos a favor de nuestra teoría antiangiogénica del agonista dopaminérgico quinagolida actuando a través de la vía del VEGFR-2, demostrando una mejoría en la sintomatología ocasionada por una endometriosis

rectal en una paciente sometida al tratamiento con cabergolina por una hiperprolactinemia sintomática secundaria a un prolactinoma hipofisario (Kurt y cols, 2010).

Sin embargo tampoco podemos olvidar que en aquellas lesiones que sí que recuperamos no fuimos capaces de observar un efecto de reducción de densidad vascular evidente. Asumiendo pues que los efectos antiangiogénicos de la quinagolida pudieran ser modestos, la hipótesis más lógica es que fueran otros mecanismos de acción mediados por la quinagolida los que que estuvieran interviniendo en la desaparición y reducción de las lesiones. En este punto, hipotetizamos con diversas explicaciones posibles.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que las lesiones endometriósicas están constituídas en parte por vasos maduros que en principio no serían susceptibles a la acción de los fármacos antiangiogénicos (Krikun y cols, 2010). Por tanto, la quinagolida debe ejercer alguna acción que justifique la desaparición y reducción en el tamaño de las lesiones diferente a la ejercida a nivel del proceso de neoangiogénesis. En este sentido, otros autores han demostrado, en el modelo animal, la desaparición de lesiones endometriósicas preformadas mediante la acción sobre el factor tisular (FT), presente de forma anómala en las células endoteliales de los vasos de implantes endometriósicos (Krikun y cols, 2010). Así pues, o bien la quinagolida posee la capacidad de actuar selectivamente sobre los vasos “patológicos” frente a los “fisiológicos”, papel que hasta la fecha desconocíamos; o bien habría que pensar en hipótesis alternativas algo más plausibles que permitan al agonista dopaminérgico DrD2 ejercer una acción disruptiva sobre los vasos maduros a través de otros mecanismos indirectos.

Nosotros hipotetizamos que uno de estos sistemas indirectos de destrucción podrían vehicularse a través del sistema inmunitario. De hecho una de las principales causas por las que no hemos visto un paralelismo más cercano entre los experimentos en animales y los aquí mostrados en humanos posiblemente radique en que los ratones *nude* del modelo animal de endometriosis (Novella-Maestre y cols, 2009), carecen de dicho sistema ya que se trata de ratones inmunocomprometidos. Muchos

tipos de células inmunitarias expresan DRD2, pero entre ellas los macrófagos parece que desempeñarían un papel predominante (McKenna y cols, 2002), y sobre ello hemos vertebrado las hipótesis alternativas o complementarias de acción de la quinagolida sobre las lesiones, que comentaremos a continuación:

- Posibles mecanismos de acción local complementarios de la quinagolida.

Como hemos comentado, a la luz de los resultados obtenidos parece ser que la desaparición y disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas no sería debida únicamente al efecto antiangiogénico del fármaco quinagolida. Sin embargo, tampoco podemos descartar por completo este efecto, dados los resultados obtenidos en estudios previos (Gómez y cols 2006; Novella-Mestre y cols, 2009; Delgado-Rosas y cols, 2011). Por ello más que una hipótesis alternativa, lo que nosotros planteamos es que existen varios mecanismos de acción están actuando de forma conjunta y complementaria, cuyo resultado converge en la destrucción del tejido patológico.

1. **Efecto deprivatorio sobre VEGF.** Como ya hemos comentado, el efecto antiangiogénico aunque modesto podría ser una de los responsables del fenómeno observado. En este sentido se ha visto que los macrófagos expresan VEGF en grandes cantidades (Nap y cols, 2004), de forma que la activación del DrD2 en los macrófagos por parte de la quinagolida, disminuiría la producción del VEGF y la angiogénesis mediada por el sistema VEGF-VEGFR2, ejerciendo de esta forma una acción inhibitoria de la angiogénesis (Chakroborty y cols, 2008) y afectando de esta manera al tamaño de las lesiones endometriósicas.
2. **Aumento de fibrinólisis:** Otro mecanismo mediante el cual los macrófagos podrían ejercer una acción sobre las lesiones endometriósicas es mediante la activación del proceso de fibrinólisis. Se ha visto que la activación del DRD2 sobre los macrófagos aumenta su capacidad fagocítica (Sookhai y cols, 1999), y además, el análisis de PCR arrays realizado en nuestro estudio mostró una regulación a la baja del Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI-1), uno de los más potentes inhibidores de la fibrinólisis. Podríamos decir, pues, que la unión de la quinagolida al DrD2 en los

macrófagos podría dar lugar a una activación de la actividad fibrinolítica que conllevaría la disrupción y degradación de las lesiones endometriósicas, favoreciendo la disminución del tamaño e incluso desaparición de éstas.

3. **Inducción de un perfil anti-inflamatorio y antiangiogénico:** En este mismo sentido, sabemos que la endometriosis es una enfermedad en la que existe un ambiente proinflamatorio marcado, sobretodo a nivel del líquido peritoneal, en el que existe un aumento en la actividad y número de macrófagos y como consecuencia un aumento de citoquinas, las cuales participan activamente en la génesis y progresión de esta enfermedad (Tasuku, 2001). Neutrófilos y macrófagos promueven la angiogénesis en etapas iniciales de endometriosis, y las quimoquinas y citoquinas liberados por éstos (MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, IL-6, TNF $\alpha$ , VEGF) amplifican el estímulo angiogénico para el crecimiento del tejido endometriósico (Yiu-Jiuan Lin, 2006). El papel que desempeña la angiogénesis inflamatoria en el desarrollo de la endometriosis ha sido demostrada también en nuestro estudio a través de los resultados obtenidos a nivel molecular con los PCR arrays. A continuación pasaremos a comentar con detalle las diferencias en cuanto a la expresión génica de los factores implicados en la angiogénesis y en los procesos inflamatorios a nivel molecular, mediados por la acción de la quinagolida.

Por una parte, hemos visto que el gen de la **CXCL10 (C-X-X motif chemoquine 10)**, es uno de los reguladores antianangiogénicos más importantes (Yoshino y cols, 2003), está sobreexpresado tras el tratamiento con la quinagolida. Este gen codifica para la proteína CXCL10, también conocida como *Interferon gamma-induced protein 10* (IP10). Se le han atribuido varias funciones, como la quimiotaxis de monocitos/macrófagos, células T, células *Natural Killer*, y células dendríticas; promueven la adhesión de células T a las células endoteliales; presentan actividad antitumoral; y es un potente inhibidor de la angiogénesis (Dufour y cols, 2002; Jump y cols, 1995).

Por otra parte, los genes cuya expresión se vio inhibida por el uso de quinagolida fueron:

- **Serpina 1:** Es el gen que codifica para la proteína PAI-1 o inhibidor del activador del plasminógeno 1. Es el principal inhibidor del activador del plasminógeno tisular (tPA) y la uroquinasa, los activadores del plasminógeno, y por tanto, de la fibrinólisis (Konno y cols, 2007).
  
- **CCL2 (Quimioquina ligando 2):** Este gen codifica para la quimioquina ligando 2 (CCL2), también conocida como proteína quimiotáctica de monocitos-1. Esta proteína recluta monocitos, células T de memoria y células dendríticas a los sitios de daño tisular, infección e inflamación. Es, por tanto, un mediador de la inflamación, y también de la neovascularización (Ulukus y cols, 2009).
  
- **VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular):** Este gen codifica para el VEGF, el cual estimula la vasculogénesis y la remodelación angiogénica favoreciendo la formación de brotes angiogénicos y la supervivencia de las células endoteliales evitando la apoptosis celular y la regresión de los vasos (Oral y cols, 1996). También aumenta de forma considerable la permeabilidad vascular (Dvorak y cols, 1995; Clauss y cols, 1990), la cual es una vía indirecta de estimulación de la angiogénesis que precede o se produce de forma simultánea a su acción sobre las células endoteliales y ha demostrado ser un paso clave en el proceso de angiogénesis.
  
- **AGGF1 (Angiogenic factor with G patch and FHA domains):** Este gen codifica para la proteína del mismo nombre, AGGF1. Se trata de un factor angiogénico que promueve la proliferación de células endoteliales (Tian y cols, 2004).

- **RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*)**: Este gen codifica para a proteína RUNX1, un factor de transcripción que regula la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en células sanguíneas maduras (Konno y cols, 2007).

El hecho de que los agentes pro-inflamatorios y angiogénicos VEGF, AGGF1, RUNX1 y CCL2 se encuentran significativamente expresados a la baja, mientras que el inhibidor de la inflamación CXCL10 esté sobreexpresado al alza tras quinagolida indicaría que potencialmente este fármaco estaría revirtiendo el ambiente proangiogénico existente en las lesiones endometriósicas. Al convertir éste en un ambiente antiinflamatorio y antiangiogénico estaría actuando sobre diferentes niveles del proceso inflamatorio, previniendo el desarrollo y crecimiento de éstas.

Por todo ello pensamos que la suma de las acciones antiangiogénicas de la quinagolida sobre el sistema VEGF, la inducción de la fibrinólisis tras la expresión reducida de la Serpina E1 y la reducción del ambiente proinflamatorio estaría sumando esfuerzos a al hora de conseguir los efectos observados en nuestro estudio sobre las lesiones endometriósicas. De esta forma daríamos explicación a la desaparición o reducción del tamaño de las lesiones, sin encontrar en cambio, diferencias estadísticamente significativas a la hora de analizar los parámetros de densidad vascular, proliferación o neoangiogénesis.

Al margen se estos mecanismo de acción local no podemos obviar un efecto a nivel central que indirectamente estuviera también mediando el crecimiento de las lesiones. Nos referimos a la privación de prolactina. Se sabe que la prolactina ejerce una acción inductora de la angiogénesis (Reese y cols, 2000; Ko y cols, 2003; Malaguenera y cols, 2002), actuando a través de los receptores específicos en los vasos (Merkle y cols, 2000). Además, se ha visto que una hiperprolactinemia espontánea, o tras estimulación con distintos agentes, se ha descrito directamente correlacionada con la severidad de la endometriosis (Gregoriou y cols, 1999; Cunha-Filho, 2002). Por tanto, es posible que la disminución de los niveles circulantes de

prolactina como consecuencia del tratamiento con el agonista dopaminérgico, contribuya a la inhibición de la respuesta angiogénica inducida por este fármaco en las lesiones endometriósicas.

Con todo esto, nos hallamos ante un estudio piloto, en el que se ensayó por primera vez el uso de la quinagolida, un agonista dopaminérgico, para tratar la endometriosis en humanos, y por tanto pionero en el hecho de administrar de forma continua un tratamiento no hormonal. Todo ello con unos resultados que superan incluso nuestras expectativas al inicio del trabajo.

En primer lugar, por los brillantes resultados a nivel macroscópico. Recordar que de las 23 lesiones referenciadas en la primera laparoscopia, sólo 15 pudieron ser recuperadas en la segunda cirugía. El resto, desapareció bajo los efectos de la quinagolida.

En segundo lugar, por el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción teóricos de la quinagolida diferentes a los que inicialmente hipotetizamos. Aunque partíamos en última instancia de los estudios Novella-Mestre y cols y Delgado-Rosas y cols, esperando demostrar, como en éstos, una disminución de la vascularización y neoangiogénesis tras la administración del agonista dopaminérgico, nos encontramos que no fue así exactamente. En lugar de trasladar exactamente sus resultados a los humanos, nos encontramos con nuevos mecanismos de acción que lejos de competir con los descritos en nuestra hipótesis inicial, la refuerza aportando nuevas vías de acción del fármaco, que conjuntamente darían como resultado los magníficos resultados obtenidos.

Dado lo novedoso e interesante de estos hallazgos, pensamos que futuros estudios con mayor número de pacientes puedan investigar con mayor profundidad y acalorar con mayor precisión el mecanismo de acción de la quinagolida sobre las lesiones endometriósicas. Además, dados los buenos resultados obtenidos a nivel macroscópico con este tratamiento, consideramos también que debería de plantearse su uso también en pacientes normoprolactinémicas.

En este sentido cabe señalar que la quinagolida ofrece varias ventajas como tratamiento contra la endometriosis frente a otras terapias utilizadas hasta el momento. Como hemos comentado extensamente al inicio de este trabajo, hasta el momento el panorama terapéutico actual frente a la endometriosis está dominado por una serie de tratamientos hormonales, los cuales tienen como objetivo reducir el ambiente estrogénico con el fin de disminuir el crecimiento y la actividad de las lesiones endometriósicas, limitando el sangrado cíclico, mejorando la sintomatología y frenando de forma transitoria la progresión de la enfermedad (Speroff y Fritz, 2006). Estos tratamientos se centran en la disminución de la producción de estrógenos por el ovario, dando lugar a una decidualización y posterior atrofia del tejido endometrial eutópico y ectópico (Sánchez-Fernández, 2011), pero por el contrario presentan efectos secundarios que desaconsejan su uso a largo plazo. De esta forma, los anticonceptivos orales combinados (AOC) interfieren en el ciclo menstrual normal, inhibiendo la ovulación e induciendo una atrofia del tejido endometrial (Harada y cols, 2008), al igual que los progestágenos a altas dosis (Bruner y cols, 1999), el danazol (Barbieri, 1987) o los agonistas de la GnRH (Bergqvist y cols, 1995). Además, los AOC pueden producir sangrados uterinos disfuncionales, cefaleas, náuseas, vómitos, aumento de peso, de la tensión mamaria, depresión y disminución de la libido, al igual que los progestágenos a altas dosis (Surrey, 2006). Por otra parte, los agonistas y antagonistas de la GnRH así como los inhibidores de la aromatasa pueden producir sofocos de forma importante y una pérdida en la densidad mineral ósea asociada a osteoporosis, cuando se utiliza en periodos prolongados de más de 6 meses (López y cols, 2009; Buzdar, 2004). Por tanto, estos tratamientos que acabamos de describir tienen algunas limitaciones importantes, sobretodo a nivel de la disminución de la capacidad reproductiva, impidiendo el embarazo durante el transcurso del tratamiento. Si consideramos que se trata de mujeres jóvenes, muchas de ellas con deseo reproductivo, y que además nos referimos a una enfermedad crónica que necesita un tratamiento a largo plazo (Rice, 2002; Valle y Sciarra, 2003), estos efectos adversos adquieren mayor importancia.

Frente a estos fármacos, la quinagolida presenta un mejor perfil de efectos secundarios, sin interferir en la foliculogénesis ni la formación del cuerpo lúteo (Gómez



y cols, 2006), además de mantener la función endometrial normal, de manera que tampoco se vería afectada la receptividad endometrial y la gestación (Verhelst y cols, 1999) durante el transcurso del tratamiento. Además, en los animales de laboratorio no se han observado evidencias de embriotoxicidad o de efectos teratogénicos, lo cual ofrece una seguridad en caso de embarazo durante la toma del medicamento (Robert y cols, 1996; Ricci y cols, 2002). Los datos que nos han permitido establecer este perfil favorable de reacciones adversas de los agonistas dopaminérgicos DrD2 se han obtenido de las mujeres sometidas a tratamientos prolongados con éstos, con el fin de tratar la hiperprolactinemia causada, generalmente, por tumores hipofisarios productores de prolactina (Bevan y cols, 1992). Aún así, y teniendo en cuenta que el tratamiento con quinagolida no está exento de efectos secundarios, principalmente, y como hemos visto en nuestro estudio, sensación de mareos y náuseas, consideramos que en posteriores trabajos deberían investigarse nuevas vías de administración, como podría ser la vía vaginal, a fin de minimizarlos y obtener así mayor beneficio del tratamiento, ya que podría plantearse incluso la administración del fármaco a dosis mayores que las utilizadas en el presente estudio, y que en nuestro caso no pudimos llevar a cabo limitados por los síntomas presentados en las pacientes de forma progresiva con el aumento de la dosis.

Es importante comentar también la elección del agonista dopaminérgico, ya que como hemos comentado también de forma extensa, nuestro estudio parte de la experiencia de Novella-Maestre con la cabergolina en el modelo animal de endometriosis (Novella-Maestre y cols, 2009).

Como hemos visto anteriormente, los agonistas de la dopamina se dividen en derivados no ergóticos y ergóticos. Actualmente, el único derivado no ergótico utilizado en la clínica es la quinagolida. Ésta se une selectivamente al receptor D2 dopaminérgicos y no presenta reacción cruzada con los receptores adrenérgicos o serotoninérgicos. En cambio la cabergolina, utilizada en el trabajo de Novella-Maestre, es un derivado ergótico de acción prolongada con acción selectiva sobre los receptores tipo 2 de la Dopamina. Debido al comunicado lanzado por la EMEA en Junio del 2008 acerca de las conclusiones alcanzadas por el *Agency's Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHMP) en referencia al riesgo de fibrosis, particularmente a

nivel cardíaco, generado por el uso prolongado del grupo de los derivados ergóticos, nos vimos obligados a buscar otro fármaco para nuestro estudio. Se sabe que la fibrosis es un efecto secundario de los derivados ergóticos que se produce por la activación de los receptores 5HT<sub>2B</sub>, que induce la proliferación de fibroblastos y la aparición de fibrosis (Roth, 2007). Además, se ha visto que este efecto aumenta sustancialmente en pacientes que reciben tratamientos crónicos, y concretamente, en el caso de la cabergolina, se presenta en más de 1 de cada 10 pacientes (Schade y cols, 2007; Zanettini y cols, 2007). Por tanto, el hecho que la cabergolina haya demostrado causar fibrosis valvular cardíaca en un elevado número de pacientes sometidos a este fármaco en régimen continuo y prolongado, desaconsejaba por completo su posible uso como tratamiento de la endometriosis.

En cambio la a quinagolida es un agonista dopaminérgico derivado no ergótico que actúa mediante su unión de forma selectiva a los receptores de la dopamina D2. No posee actividad sobre el receptor 5-HT<sub>2b</sub>, por lo que no presenta riesgo de fibrosis como el grupo de los agonistas ergóticos. Además, la quinagolida presenta características farmacocinéticas que constituyen una ventaja frente al uso de cabergolina, ya que tiene una vida media más corta (de aproximadamente 17 horas en la quinagolida frente 63-69 horas en la cabergolina) (Colao y cols, 2002). Esto minimizaría la exposición al fármaco durante el período de organogénesis en las mujeres que queden gestantes durante el tratamiento. Por todo ello consideramos que la quinaolida era más adecuada en nuestro estudio, ya que se trata de un fármaco con un perfil más favorable de efectos secundarios graves comparado con la cabergolina. De esta forma, al unirse a los receptores de la dopamina D2 obtendríamos el mismo efecto a nivel del sistema VEGF/VEGFR2 que con la cabergolina, pero con menos efectos secundarios graves.

Aún así, existen algunas limitaciones en el presente estudio que debemos analizar.

En primer lugar, sería necesario comentar el diseño experimental del estudio. Idealmente, el estudio debería haber sido constituido por un grupo de casos, al que se les administrara la quinagolida durante los 4 meses posteriores a la primera cirugía, y

un grupo control, al que se le administrara placebo. Transcurridos los 4 meses de tratamiento, al realizar la segunda laparoscopia, se hubiesen obtenido las muestras de las lesiones referenciadas de ambos grupos, realizando una comparación entre el grupo sometido al tratamiento, y el grupo control. No obstante, este diseño no ha sido posible por razones éticas, de forma que diseñamos el estudio pensando que las lesiones endometriósicas maduras como las que dejamos referenciadas durante la primera laparoscopia, no varían significativamente su tamaño durante un periodo de 4 meses (Thomas y cols, 1987). De este modo, las lesiones resecaadas en la primera cirugía serían comparables a las lesiones expuestas a la quinagolida y resecaadas durante la segunda laparoscopia, pudiendo interpretarse como un “grupo placebo” frente a las lesiones tratadas.

Por otra parte, debemos comentar el reducido número de casos, con una n final de 9. Tratándose el presente trabajo de un estudio de prueba de concepto, consideramos que el tratamiento sería efectivo y justificaría el planteamiento de un estudio a mayor escala si se reducía el tamaño de las lesiones al 50%. Con la fórmula de cálculo de N para detectar cambios pequeños, la n que se obtiene es una n pequeña, en nuestro caso, de 9. Además, hay que tener en cuenta que en este estudio además trabajamos con lesiones de forma independiente, y no con individuos, de manera que al obtener 23 lesiones referenciadas durante la primera laparoscopia, consideraríamos una n de 23, siendo suficiente para demostrar nuestro objetivo y justificar, a la luz de nuestros resultados, la puesta en marcha de ensayos clínicos mayores.

No obstante, con todas las limitaciones comentadas, el presente estudio sugiere que la quinagolida es un eficaz inhibidor de las lesiones endometriósicas, reduciendo su tamaño e incluso induciendo su desaparición.



## **7. CONCLUSIONES**



1. La quinagolida induce la desaparición o disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas peritoneales en mujeres hiperpolactinélicas con endometriosis.
2. La histología de las lesiones endometriósicas recuperadas tras el tratamiento sugiere que la quinagolida reduce el tamaño de éstas induciendo la degeneración tisular de las mismas.
3. El tratamiento con quinagolida induce un sobreexpresión del Receptor tipo 2 de la Dopamina en las lesiones endometriósicas peritoneales, así como una menor expresión y activación del sistema VEGF/VEGFR2 que no se traducen sin embargo en una reducción significativa de la neovascularización y neoangiogénesis en las lesiones endometriósicas.
4. El tratamiento con quinagolida ocasiona a nivel molecular un aumento de los genes implicados en la fibrinólisis y una disminución de genes implicados en procesos inflamatorios.
5. El presente estudio sienta las bases para el desarrollo de una futura terapia contra la endometriosis basada en el uso de agonistas de la dopamina.





## **8. BIBLIOGRAFÍA**



1. Abou-Setta AM, al-Inany HG, Farquhar CM. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 4. Art. No.: CD005072. 2006.
2. Abrao MS, Diaz JA Jr, Rodini GP, Podgaec S, Bassi MA, Averbach M. Endometriosis at several sites, cyclic bowel symptoms, and the likelihood of the appendix being affected. *Fertil Steril* 2010;94:1099-101.
3. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999; 13(3):295-306.
4. Adamson D. Surgical Management of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:223.
5. Adamson GD, Pasta DJ. Surgical treatment of endometriosis-associated infertility: meta-analysis compared with survival analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:1488.
6. Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 2010;94:1609-1615.
7. Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signalling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:8715-8722.
8. Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, Bulun SE. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004; 81:290–6.
9. Álvarez C, Marti-Bonmati L, Novella-Maestre E, Sanz R, Gomez R, Fernandez-

- Sanchez M, Simon C, Pellicer A. Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8):2931-7.
10. American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification: 1985. *Fertil Steril* 1985;43:351-353.
  11. American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67:817-21.
  12. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84(2):300-4.
  13. Aydin NE, Celik O, Hascalik S, Elter K, Tagluk ME, Gurates B. Combating endometriosis by blocking proteasome and nuclear factor-kB pathways. *Hum Reprod* 2008;23:2458-2465.
  14. Azem F, Lessing JB, Geva E. Patients with stages III and IV endometriosis have a poor outcome of in vitro fertilization embryo transfer than patients with tubal infertility. *Fertil Steril* 1999; 72:1107-1109.
  15. Babaei S, Stewart DJ. Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovasc Res* 2002; 55(1):190-200.
  16. Bacic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M. Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebrovascular endothelium. *J Neurochem* 1991; 57(5):1774-80.
  17. Badawy SZ, Cuenca V, Stitzel A, Jacobs RD, Tomar RH. Autoimmune phenomena in infertile patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 271-275.

18. Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Martínez-Román S, Manau D, Vanrell JA. Pentoxifylline versus placebo in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: a pilot randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1997;12:2046-2050.
19. Banerjee SK, Ballard KD, Wright JT. Endometriomas as a Marker of Disease Severity. *J Minimally Invasive Gynecol.* 2008; 5: 538-540.
20. Barbeito CG, Andrés PF. Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. *Analecta veterinaria* 2005;25(1):8-17.
21. Barbieri R. Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:565-567.
22. Barbieri RL, Hornstein MD. Medical therapy for endometriosis. En: Wilson EA, ed. *Endometriosis*. Alan R. Liss. Nueva York, 1987: 111-140.
23. Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC, Scaetzi E, Kistner RW, [Knapp RC](#). Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1986; 45:630-634.
24. Barbieri RL, Osathanondh R, Ryan KJ. Danazol inhibition of steroidogenesis in the human corpus luteum. *Obstet Gynecol* 1981;57:722.
25. Barillari G, Albonici L, Franzese O, Modesti A, Liberati F, Barillari P, Ensoli B, Manzari V, Santeusano G. The Basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form: implications for tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 152(5):1161-6.
26. Basini G, Bianco F, Gresselli F. EGCG, a major component of green tea, inhibits VEGF production by swine granulosa cells. *Biofactors* 2005;23:25-33.

27. [Bast RC Jr](#), [Klug TL](#), [St John E](#), [Jenison E](#), [Niloff JM](#), [Lazarus H](#), [Berkowitz RS](#), [Leavitt T](#), [Griffiths CT](#), [Parker L](#), [Zurawski VR Jr](#), [Knapp RC](#). A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309:883-887.
28. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, Manseau EJ, Dasgupta PS, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001; 7(5):569-74.
29. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R422-R435.
30. Bazot M, Detchev R, Cortez A, Amouyal P, Uzan S, Daraï E. Transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography for the assessment of pelvic endometriosis: a preliminary comparison. *Hum Reprod* 2003; 18:1686-1692.
31. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, Agarwal A. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod* 2002; 17: 426-431.
32. Bergqvist A, Ljungberg O, Myhre E: “Human endometrium and endometriotic tissue obtained simultaneously: A comparative histological study”. *Int J Gynecol Pathol* 1984; 3:135-140.
33. Bergqvist I: “Hormonal regulation of endometriosis and the rationales and effects of gonadotriphin-releasing hormone agonist treatment: a review”. *Hum Reprod* 1995; 10: 446-452.
34. Bérubé S, Marcoux S, Langevin M, Maheux R, and The Canadian Collaborative

- Group of Endometriosis. Fecundity of infértils women with minimal or mild endometriosis and women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998; 69:1034.
35. Bevan JS, Webster J, Burke CW, Scanlon MF. Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocr Rev* 1992;13:220-40.
36. Bianchi M, Macaya R, Durruty G, Manzur A. Correlation between Ca-125 marker with the presence and severity of pelvic endometriosis. *Rev Med Chil* 2003; 131 (4):367-72.
37. Bischoff FZ, Simpson JL. Heritability and molecular genetic Studies of endometriosis. *Hum reprod Update* 2000;6:37-44.
38. Bonte H, Chapron C, Vieira M, Fanconnier A, Barakat H, Fritel X, et al. Histologic appearance of endometriosis infiltrating uterosacral ligaments in women with painful symptoms. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2002;9:519-24.
39. Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction*. 2006; 132(3):501-9.
40. Boyle D y McCluggage G. Peritoneal stromal endometriosis: a detailed morphological análisis of a large series of cases of a common and under-recognised form of endometriosis. *J. Clin. Pathol.* 2009; doi:10.1136/jcp.2008.064261.
41. Brenner C, Wohlgemuth S. Scar endometriosis. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:538.

42. Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis. An association with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:106-112.
43. Bruhat MA, Mage G, Chapron C, Pouly JL, Canis M, Wattiez A. Present day endoscopic surgery in gynecology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;41:4.
44. Bruner KL, Eisenberg E, Gorstein F, Osteen KG. Progesterone and transforming growth factor-beta coordinately regulate suppression of endometrial matrix metalloproteinase's in a model of experimental endometriosis. *Steroids* 1999;64:648.
45. Bruner-Tran KL, Osteen KG, Duleba AJ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2489-94.
46. Bulun SE, Gurates B, Fang Z, Tamura M, Sebastian S, Zhou J, Amin S, Yang S. Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002;55:21-33.
47. Bussaca M, Somigliana G, Bianchi S, Post-operative Ngr. Analogue treatment alter conservative surgery for syntomatic endometriosis stage III-IV; a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001; 16:2399.
48. Busso C, Fernández-Sánchez M, García-Velasco JA, Landeras J, Ballesteros A, Muñoz E, González S, Simon C, Arce JC, Pellicer A. The non-ergot derived dopamine agonist quinagolide in prevention of early ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 2010; 25:995-1004.
49. Buzdar AU. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial: an update. *Clin Breast Cancer* 2004; 5 Suppl 1:S6–12.



50. Cakmac H, Basar M, Seval-Celik Y, Osteen KG, Duleba AJ, Taylor HS, Lockwood CJ, Arici A. *Reprod Sci*. 2012 Jan 19. In press.
51. Calderay M, González JM, Sánchez C, Lázaro J, Cid MJ, Camarasa N, et al. Endometriosis extragenital y extrapelviana. *Prog Obstet Ginecol*. 2003;46:548-51.
52. Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 1999;398:381.
53. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6(4):389-95.
54. Ceccaroni M, Clarizia R, Cosma S, Pesci A, Pontrelli G, Minelli L. Cyclic sciatica in patient with deep monolateral endometriosis infiltrating the right sciatic nerve. *J Spinal Disord Tech* 2011;24:474-8.
55. Ceccaroni M, Clarizia R, Roviglione G, Bruni F, Ruffo G, Peters I, et al. Deep rectal and parametrial infiltrating endometriosis with monolateral pudendal nerve involvement: case report and laparoscopic nerve-sparing approach. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;153:227-9.
56. Cakroborty D, Chowdhury UR, Sarkar C, Baral R, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from Mouse bone marrow in tumor vascularization. *J Clin Invest* 2008;118:1380-9.
57. Chapron C, Chiodo I, Leconte M, Amsellem-Ouazana D, Chopin N, Borghese B, et al. Severe Ureteral endometriosis: the intrinsic type is not so rare after complete surgical exeresis of deep endometriotic lesions. *Fertil Steril* 2010;93:2115-20.
58. Chapron C, Dubuisson JB. Management of deep endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943:276-280.

59. Chapron C, Dubuisson JB, Pansini V, Vieira M, Fauconnier A, Barakat, Dousset B. Routine clinical examination is not sufficient for diagnosing and locating deeply infiltration endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2002; 9:115-119.
60. Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, Barakat H, Vieira M, Breart G. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Hum Reprod* 2003;18:760-766.
61. Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, Vieira M, Bonte H, Vacher-Lavenu MC. Does deep endometriosis infiltrating the uterosacral ligaments present an asymmetric lateral distribution? *BJOG* 2001;108:1021-4.
62. Chapron C, Fauconnier A, Viera M et al. Anatomical distribution of deeply endometriosis: surgical implications and proposition for a classification. *Hum Reprod* 2003;18:157-161.
63. Charnock-Jones DS, Sharkey AM y Rajput-Williams, J. Identification and localisation of alternately spliced nRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993;59:1540-1548.
64. Chawlisz K, Mattia-Goldberg K, Lee M, Elger W, Edmons A. Treatment of endometriosis with the novel selective progesterone receptor modulator (SPRM) asoprisnil. *Fertil Steril* 2004;82:S83-4.
65. Chawlisz K, Perez MC, DeManno D, Winkel C, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endoc Rev* 2005; 26:423-438.

66. Chen FP, Soong YK, Lee N, Lo SK. The use of serum CA-125 as a marker for endometriosis in patients with dysmenorrhea for monitoring therapy and for recurrence of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:665-670.
67. Chiodini P, Liuzzi A, Cozzi R, Verde G, Oppizzi G, Dallabonzana D, Spelta B, Silvestrini F, Borghi G, Luccarelli G, Rainer E, Horowski R. Size Reduction of Macroprolactinomas by Bromocriptine or Lisuride Treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53:737-743
68. Ciccarelli E, Giusti M, Miola C, Potenzoni F, Sghedoni D, Camanni F, Giordano G. Effectiveness and tolerability of Long Term Treatment with Cabergoline, a new Long-Lasting Ergoline Derivate, in Hyperprolactinemic Patients. *J Clin Endocrinol Metabol* 1989; 69:725-728.
69. Cirillo F, Vismarra M, Buononato M, Magnani E, Vergoni F, Martinotti M. Endometriosis of the caecum and ileo-caecal valve. A case Report and review of the literature. *Chir Ital* 2008;60:603-6.
70. Claus M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, y cols. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endotelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535-45.
71. Clement PB. The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Adv Anat Pathol* 2007;14:241-260.
72. Clement PB; Young RH. Two previously unemphasized features of endometriosis: micronodular stromal endometriosis and endometriosis with stromal elastosis. *Int J Surg Phatol* 2000;8;223-227.

73. Clement PB, Young RH, Scully RE. Stromal endometriosis of the uterine cervix. A variant of endometriosis that may simulate a sarcoma. *Am J Surg Pathol* 1990;14:449-455.
74. Colao A, Di Sarno A, Sarnacchiaro F, Ferone D, Di Renzo G, Merola B, Annunziato L, Lombardi G. Prolactinomas Resistent to Standard Dopamine Agonists Respond to Chronic Cabergoline Treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:876-883.
75. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1989; 84(5):1470-8.
76. Cornillie FJ, Osterlinck D, Lauweryns JM, Konick PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990; 53:978-983.
77. Cramer DW. Epidemiology of endometriosis. 1987. In: Wilson EA, ed. *Endometriosis*. New York: Alan R. Liss, Inc.; 5.
78. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955:11, 2002.
79. Creus M, Fábregues F, Carmona F, del Pino M, Manau D, Balasch J. Combined laparoscopic surgery and pentoxifylline therapy for treatment of endometriosis-associated infertility: a preliminary trial. *Hum Reprod* 2008;23:1910-1916.
80. Crispi CP, de Souza CA, Oliveira MA, Dibi RP, Cardeman L, Sato H, et al. Endometriosis of the round ligament of the uterus. *J Min Invasive Gynecol* 2012;19:46-51.

81. Cristina C, Díaz-Torga G, Baldi A, Góngora A, Rubinstein M, Low MJ, Becú Villalobos D. Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology* 2005;146:2952-62.
82. Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(2):179-89.
83. Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Dias EC, Vettori D, Souza CA, Passos EP. Prolactin and growth hormone secretion alter thyrotrophin-releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Hum. Reprod*. 2002; 17:960-5.
84. Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, Ross C, Gauldie J. Therapeutic effect of angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *Am J Pathol*. 2002; 161: 909-18.
85. Dadhwal V, Deka D, Mathur S, Kaushal S, Sharma AK, Mittal S. Vaginal polypoid endometriosis simulating neoplasia in a young woman. *J Low Genit Tract Dis* 2012;16:318-21.
86. Daftary GS, Taylor HS. EMX2 gene expression in the female reproductive tract and aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2390-6.
87. Dananberg HD, Fishbein I, Gao J, Monkkonen J, Reich R, Gati I, Moerman E, Golomb G. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon-injury in rats and rabbits. *Circulation* 2002;106:599-605.

88. Daniel Y, Geva E, Amit A, Eshed-Englender T, Baram A, Fait G. Do soluble cell adhesion molecules play a role in endometriosis? *Am J Reprod Immunol* 2000; 43:160-166.
89. Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest.* 1999; 103(2):157-8.
90. De Placido G, Alviggi C, Di Palma G, Carravetta C, Matarese G, Landino G. Serum concentrations of soluble human leukocyte class I antigens and of the soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis: relationship with stage and non-pigmented peritoneal lesions. *Hum Reprod* 1998; 13:3206-3210.
91. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255:989–91.
92. Delgado-Rosas F, Gómez R, Ferrero H, Gaytán F, García-Velasco J, Simón C, Pellicer A. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction* 2011; 142(5):745-55.
93. D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, De Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR. Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 173(1):125-34.
94. D'Hooghe T, Hummelshoj L. Multidisciplinary centres/networks of excellence for endometriosis management and research: a proposal. *Hum Reprod* 2006;21: 2743-8.

95. Dmowski W., Radwanska E. Current concepts on pathology, histogenesis and etiology of endometriosis. *Acta Obstet Ginecol (suppl)*. 1984; 123-129.
96. Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B. regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertile Steril* 2004;82(Suppl 3):1115-1120.
97. Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F: “Three dimensional architectures of peritoneal endometriosis”. *Fertil Steril* 1991; 57: 980-983.
98. Donnez J, Pirard C, Smets M, Jadoul P, Squifflet J. Pre- and post-surgical management of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:235.
99. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor in endometriosis. *Hum. Reprod.* 1998; 13:1686-90.
100. Donnez J, Spada F, Squifflet J, Nisolle M. Bladder endometriosis must be considered as bladder adenomyosis. *Fertil Steril* 2000;74:1175.
101. Drenkhahn M, Gescher DM, Wolber EM, Meyhoefer-Malik A, Malik E. Expression of angiopoietin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril.* 2004; 81 Suppl 1:869-75
102. Dunselman GA, Bouckaert PX, Evers JL. The acute-phase response in endometriosis of women. *J Reprod Fertil* 1988b; 83:803-808.
103. Duque A, Ordoñez D, Muñoz-Galligo E. Endometriosis. En: Bajo Arenas JM, Laila Vicens JM, Xercavins Montosa J. *Fundamentos de Ginecología*. 2006.p.255-263.
104. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability,

- and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146(5):1029-39.
105. El-Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 137(1):137-40.
106. Epstein H, Berger V, Levi I, Eisenberg G, Koroukhov N, Gao J, Golomb G. Nanosuspensions of alendronate with gallium or gadolinium attenuate neointimal hyperplasia in rats. *J Controlled Rel.* 2007;117:322-32.
107. Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, Claesson-Welsh L, Cross MJ. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett.* 2003; 536(1-3):19-24.
108. Eskenazi B, Warner M, Bonsignore L, Olive D, Samuels S, Vercellini P. Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:929-935.
109. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24:235-58.
110. Espinos J, Rodríguez J, Webb S, Calaf J. Long-actin repeatable bromocriptine in the treatment of patients with Microprolactinoma Intolerant or Resistent To Oral Dopaminergics. *Fertil Steril.* 1994; 62:926-931.
111. Evers JL, Dunselman GA, Van der Linden PJ. Markers for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 7:715-739.
112. Eyster KM, Boles AL, Brannian JD, Hansen KA. DNA microarray analysis of gene expression markers of endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77:38-42.



113. Falcone T, Lebovic DI. Clinical Management of endometriosis. *Obstet and Gynecol* 2011; 118:691-705.
114. Fassina G, Vene R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, Albini A. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Cli Cancer Res* 2004;10:4865-4873.
115. Fedele L, Bianchi S, Bocciolone L, Di Nola G, Parazzini F. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1992;79:767.
116. Fedele L, Bianchi S, Raffaelli R, Portugese A. Pre-operative assessment of bladder endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12:2519-2522.
117. Fedele L, Bianchi S, Zanconato g, portuese A, Raffaelli R. Use of a levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertile steril* 2001;75:485.
118. Fedele L, Berlanda N. Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2004; 9(1):167-77.
119. Fernández-Rey CL, Álvarez-González SA, Díaz-Solis P, Blanco-González A, Costilla-García S. Small bowel obstruction secondary to ileal endometriosis multisection computer tomography evaluation. *Rev Esp Enferm Dig* 2009;101:872-4.
120. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 161(2):851-8.
121. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002;

- 29(Suppl16):10-14 Semin Oncol 2002; 29(Suppl16):10-14.
122. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:1- 30.
123. Ferrari C, Barbieri C, Caldara R, Mucci M, Codecasa F, Paracchi A, Romano C, Boghen M, Dubini A. Long-lasting prolactin-lowering effect of cabergoline, a new dopamine agonist, in hyperprolactinemic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:941-945.
124. Ferrero H, Gaytán F, delgado-Rosas F, Gaytán M, Gómez R, Simón C y Pellicer A. Dopamine receptor 2 (DrD2) activation inhibits VEGF secretion in granulosa luteinized cells: implications for OHSS treatment in low drd2 milieus. *Hum Reprod* 2010;25 (Suppl 1) i56-i58. (doi:10.1093/humrep/de.25.s1.40).
125. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
126. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267(16):10931-4.
127. Franssen AM, Van der Heijden PF, Thomas CM, Doesburg WH, Willemsen WN, Rolland R. On the origin and significance of serum CA-125 concentrations in 97 patients with endometriosis before,during and after buserelin acetate, nafarelin or Danazol. *Fertil Steril* 1992; 57:974-979.
128. Gagné D, Rivard M, Pagé M, Lépine M, Platon C, Shazand K, Hugo P, Gosselin D. Development of a non surgical diagnostic tool for endometriosis based on the detection of endometrial leukocyte subsets and serum CA-125 levels. *Fertil Steril* 2003; 80:876-885.
129. García M, Olartecoechea B, Aubá M, alcázar J.L, López G. Angiogénesis y endometriosis. *Rev Med Univ Navarra* 2009, 53:8-13.

130. Gargett C, Weston G, Rogers P. Mechanisms and regulation of endometrial angiogenesis. *Reprod Med Rev* 2002; 10: 45- 61.
131. Garrido N, Navarro J, Remohí J Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000; 6:67-74.
132. Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis therapy. *Semin Oncol* 2004;31:2-11.
133. Gazvani R, Templeton A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002 Feb;76(2):117-26. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 76:117-26.
134. Gille H, Kowalski J, Yu L, Chen H, Pisabarro MT, Davis- Smyth T, Ferrara N. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO J.* 2000 Aug 1; 19(15):4064-73.
135. Goldstein DP, deCholnoky C, Emans SJ, Leventhal JM. Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J Reprod Med* 1980;24:251-6.
136. Gómez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytán M, Morales C, Zimmermann RC, Simón C, Gaytán F, Pellicer A. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(8):2484-92.
137. Gómez R, Gonzalez-Izquierdo M, Zimmermann RC, Novella- Maestre E,

- Alonso-Muriel I, Sanchez-Criado J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Low-dose dopamine agonista administration blocks vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated vascular hyperpermeability without altering VEGF receptor 2-dependent luteal angiogenesis in a rat ovarian hyperstimulation model. *Endocrinology*. 2006; 147(11):5400-11.
138. Gómez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod*. 2003; 68(6):2164-71.
139. Gómez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*. 2002; 143(11):4339-48.
140. Gregoriou G, Bakas P, Vitoratos N, Papadias K, Goumas K, Chryssicopoulos A, Creatsas G. Evaluation of serum prolactin levels in patients with endometriosis and infertility. *Gynecol. Obstet. Invest*. 1999; 48:48-51.
141. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 2000; 52:237-68.

142. Guerreiro S, Mais V, Ajossa S, Paoletti AM, Angiolucci M, Labate F, Melis GB. The role of endovaginal ultrasound in differentiating endometriomas from other ovarian cystic. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1995; 22:20-22.
143. Guo SW. Nuclear factor kappaB (NF-kappaB): an unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? *Gynecol Obstet Invest* 2007;63:71-97.
144. Haas D, Chavatal R, Habelsberg A, et al. Comparison of revised American Fertility Society and ENZIAN staging: a critical evaluation of classifications of endometriosis on the basis of our patient population. *Fertil Steril* 2011;95:1574-1578.
145. Haber E, Danenberg, HD, Koroukhov N, Ron-El R, Golomb G, Schachter M. Peritoneal macrophage depletion by liposomal biphosphonate attenuates endometriosis in the rat model. *Hum Reprod* 2009;24:398-407.
146. Harada T, Kubota T, Aso T. Usefulness of CA 19-9 versus CA 125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:733-739.
147. Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N. Low dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril* 2008;90:1583.
148. Hefler LA, Grimm C, Van Trotsenburg M, Nagele F. Role of the vaginally administered aromatase inhibitor anastrozole in women with recto-vaginal endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2005;84(4):1033-6.
149. Hemmings R, Bissonnette F, Bouzayen R. results of laparoscopic treatments of ovarian endometriomas: laparoscopic ovarian fenestration and coagulation. *Fertil Steril* 1994;70:527.

150. Henderson HL, Townsend J, Trotonese DJ. Direct effects of prolactin and dopamine on the gonadotroph response of GnRH. *J Endocrinol* 2008; 197:343-50.
151. Heryanto B, Lipson KE, Rogers PA. Effect of angiogenesis inhibitors on estrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. *Reproduction*, 2003;125:337-346.
152. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005; 23(5):1011-27.
153. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*. 1991; 5(12):1806-14.
154. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*. 1992; 267(36):26031-7.
155. Hock DL, Dagostino L, Kemmann E, Seifer DB. Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *J Reprod Med* 2001; 46: 7-10.
156. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999; 284(5422):1994-8.
157. Hornstein MD, Thomas PP, Gleason RE, Barbieri RL. Menstrual cyclicality of CA 125 in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58:279-283.

158. Houston DE, Noller RL, Melton LJ. Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1970. *Am J Epidemiol* 1987; 125:959-969.
159. Houston DE, *Epidemiol Rev*, 1994; 6:167.
160. Huges E, Fedorkow D, Collins J, Vandekerckhove P. Ovulation suppression for endometriosis, *Cochrane Database Syst Rev* 2003:CD0000155.
161. Hughesdon PE. The endometrial identity of benign stromatosis of the ovary and its relation to other forms of endometriosis. *J Pathol* 1976;119:201-209.
162. Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BD, Fan TP, Smith SK. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2889-99.
163. Imai A, Horibe S, Takagi A, Takagi H, Tamaya T. Drastic elevation of serum CA 125, CA 72-4 and CA 19-9 levels during menses in patients with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 78:79-81.
164. Jacobson TZ, Barlow DH, Koninckx PR, Olive D, Farquhar C. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4. 2002.
165. Jansen R, Russel P: “Non pigmented endometriosis: Clinical laparoscopic and pathologic definition”. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1154-1159.

166. Jelenc F, Ribic-Pucelj M, Juvan R, Kobal B, Sinkovec J, Salamun V. Laparoscopic rectal resection for deep infiltrating endometriosis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech* 2012;22:66-9.
167. Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 355-358
168. Jung YD, kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, Bucana CD, Gallick GE, Ellis LM. ECGC, a major component of green tea, inhibits tumor growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer* 2001;84:844-850.
169. Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, et al. New insights into the pathophysiology of endometriosis: from chronic inflammation to danger signal. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27:73-9.
170. Ke LD, Shi YX, Im SA, Chen X, Yung WK. The relevance of cell proliferation, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor production to angiogenesis and tumorigenicity in human glioma cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(6):2562-72.
171. Keck PJ, y cols. Vascular permeability factor, an endotelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246(4935):1309-12.
172. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron A, D’Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E on behalf of the ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:2698-2704.



173. Kettel LM, Murphy AA, Mortola JF, Liu JH, Ulmann A, Yen SS. Endocrine responses to long-term administration of the antiprogestone RU486 in patients with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56:402.
174. Keetel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 440-442.
175. Kinkel K, Chapron C, Balleyguier C, Fritel X, Dubuisson JB, Moreau JF. Magnetic resonance imaging characteristics of deep endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:1080-1086.
176. Kitawaki J, Ishihara H, Koshiba H, Kiyomizu M, Teramoto M, Kitaoka Y, Honjo H. Usefulness and limits of CA-125 in the diagnosis of endometriosis without associated ovarian endometriomas. *Hum Reprod* 2005; 20: 1999-2003.
177. Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T. Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 1997; 57:514-519.
178. Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Fushiki S, Honjo H. Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 72:1100-1106.
179. Ko JY, Ahn YL, Cho BN. Angiogenesis and white blood cell proliferation induced in mice by injection of a prolactinexpressing plasmid into muscle. *Mol. Cell.* 2003; 15: 262-70.

180. Koks CA, Dunselman GA, De Goeij AF, Arends JW, Evers JL. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril* 1997; 68: 560-564.
181. Koloszar S, Kereszturi A, Kovacs L. Treatment of hyperproliferative anovulation with the dopamine-agonist quinagolide. *Orv Hetil* 2000; 141:1621-3.
182. Koninckx P, Martin D. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction, or possibly adenomyosis externa. *Fertil Steril*. 1992;58:924-928.
183. Koninckx PR, Meuleman C, Oosterlynck D, Conillie FJ. Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma Ca 125 concentration. *Fertil Steril* 1996;65:280.
184. Konno R, Fujiwara H, Netsu S, Odagiri K, Shimane M, Nomura H, y cols. Gene expression profiling of the rat endometriosis model. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:330-43.
1. Koovor E, Nassif J, Miranda-Mendoza I, Wattiez A. Endometriosis of the bladder: outcomes after laparoscopic surgery. *J Min Invasive Gynecol* 2010;17:600-4.
2. Kressin P, Wolber EM, Wodrich H, Meyhofer-Malik A, Buchweitz O, Diedrich K, Malik E. Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*. 2001; 76: 1220-4.
1. Krikun G, Hu Z, Osteen K, Bruner-Tran KL, Schatz F, Taylor HS, Toti P, Arcuri F, Konigsberg W, Garen A, Booth CJ, Lockwood CJ. The Immunoconjugate “Icon” Targets Aberrantly Expressed Endothelial Tissue Factor Causing Regression of

Endometriosis. Am J Pathol 2010;176:1050-56

1. Kubes P, Grisham MB, Barrowman JA, Gaginella T, Granger DN. Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. Am J Physiol 1991;261:1872-9.
2. Kundu N, Smith MJ, Samsel L, Fulton AM. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. Breast Cancer Res Treat 2002;76:57-64.
3. Kuohung W, Jones GL, Vitonis AF, Cramer DW, Kennedy SH, Thomas D, Hornstein MD. Characteristics of patients with endometriosis in the United States and the United Kingdom. Fertil Steril, 2002; 78:767.
4. Kupker W, Felberbaum RE, Krapp M, Schill T, Malik E, Diedrich K. Use of GnRH antagonist in the treatment of endometriosis. Reprod Biomed Online. 2002;5:12.
5. Kurt M, Ibis M, Karaman K, Bostanci EB, Temucin T. Rectal endometriosis and prolactinoma. Hum reprod 2010;25:1588-89.
6. Lamszus K, Brockmann MA, Eckerich C, Bohlen P, May C, Mangold U, Fillbrandt R, Westphal M. Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin. Clin Cancer Res. 2005; 11(13):4934-40.
7. Larsen WJ. Human embriology England: Churchil Livingstone, 1993: 167-204.
8. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. Hum Reprod Update. 2007;13(4):331-42.

9. Lebovic DI, Chao VA, Martini JF, Taylor RN. IL-1beta induction of RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene expression in endometriotic stromal cells depends on a nuclear factor-kappaB site in the proximal promoter. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4759-4764.
10. Lebovic DI, Chao VA, Taylor RN. Peritoneal macrophages induce RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene transcription in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1379-1401.
11. Lin YJ, Lai MD, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* 2006;147:1278-1286.
12. Lindsay FC. Medical and endocrine modulatory treatment. En: Shaw RW. *Endometriosis Current Understanding and Management*. Blackwell Science Ltd., Oxford, 1995; 187-205.
13. López Lopes E, López Martínez C (2009). Actualización en el tratamiento de la endometriosis con Análogos de la GnRH.
14. Luciano AA. Danazol treatment of endometriosis-associated pain. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006; 13(6):523-4.
15. Maas JW, Calhaz-Jorge C, ter Riet G, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-oudier HA. Tumor necrosis factor-alpha but not interleukin-1 beta or interleukin-8 concentrations correlate with angiogenic activity of peritoneal fluid from patients with minimal to mild endometriosis. *Fertil. Steril*. 2001b; 75:180-5.

16. Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA, Evers JL. Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum. Reprod.* 2001a; 16:627–31.
17. Mahmood TA, Templeton AA. Prevalence and genesis of endometriosis. *Hum Reprod* 1991; 6:554-559.
18. Mais V, Guerreiro S, Ajossa S, Angiolucci M, Paoletti AM, Melis GB. The efficiency of transvaginal ultrasonography in the diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 60:776-780.
19. Malaguarnera L, Pilastro MR, Quan S, Ghattas MH, Yang L, Mezentsev AV, Kushida T, Abraham NG, Kappas A. Significance of heme oxygenase in prolactin-mediated cell proliferation and angiogenesis in human endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 2002; 10:433-40.
20. Marcoux S, Maheux R, Berube S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Engl J Med* 1997; 337:217-222.
21. Martínez S, Garrido N, Coperias JL, Pardo F, Desco J, García-Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Hum Reprod.* 2007; 22(3):836-42.
22. Matalliotakis I, Panidis D, Vlassis G, Neonaki M, Goumenou A, Koumantakis E. Unexpected increase of CA 19-9 tumour marker in patients with endometriosis. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998; 19:498-500.
23. Matalliotakis IM, Vassiliandis S, Goumenou AG, Athanassakis I, Koumantakis GE, Neonaki MA. Soluble ICAM-1 levels in the serum of endometriotic patients appear to be independent of medical treatment. *J Reprod Immunol* 2001; 51:9-19.

24. Mathur S, Peress MR, Williamson HO. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp. Immunol.* 1982; 50: 259-266.
25. Matorras R, Rodríguez F, Pijoan JI, Etxanojauregui A, Neyro JL, Elorriaga MA, Rodríguez-Escudero FJ. Women who are not exposed spermatozoa and infertile women have similar rates of stage I endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:923-928.
26. Matzukaki S, Canis M, Darcha C, dallel R, Okamura K, Mage M. Cyclooxygenase-selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004a;82:1609-1615.
27. Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Wattiez A, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertile Steril* 2004b;82:1309-1315.
28. McCarthy M. Angiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 2003; 361:1959.
29. McKay LI, Cidlowski ja. Molecular control of immune7inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999;20:435-459.
30. McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, Sibbring GC, Cummerson JA, Bowen-Jones D, y cols. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol* 2002;132:34-40.
31. McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod* 2000;6:45-55.

32. McLaren J, Prentice A, Chanock-Jones DS. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98:482-489.
33. Meek SC, Hodge DD, Musich JR. Autoimmunity in infertile patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:1365-1373.
34. Merkle CJ, Schuler LA, Schaeffer RC Jr, Gribbon JM, Montgomery DW. Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cells: evidence for an endothelial prolactin receptor. *Endocrine* 2000; 13:37-46.
35. Mihalyi A, Simsa P, Mutinda KC, Meuleman C, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Emerging drugs in endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2006;11:503-524.
36. Moen MH. Is a long period without childbirth a risk factor for developing endometriosis?. *Hum Reprod*, 1991;6:1404.
37. Moghissi KS. Medical treatment of endometriosis. *ClinObstet Gynecol*. 1999 Sep; 42(3):620-32.
38. Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck MA, Bongers MY, van der Veen F, Bossuyt PM. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1998; 70: 1101-1108.
39. Molema G, Griffioen AW. Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply. *Immunol Today* 1998; 19:392-394.
40. Morange I, Barlier A, Pellegrini I, Brue T, Enjalbert A, Jaquet P. Prolactinomas Resistent to Bromocriptine: long-term efficacy of quinagolide and outcome of pregnancy. *Eur J Endocrinol* 1996; 135:413-420.
41. Muneyyirci-Delale O, Karacan M. Effect of norethindrone acetate in the

- treatment of symptomatic endometriosis. *Int J Fertil Womens Med*, 1998; 43:24.
42. Murphy AA, Palinski W, Rankin S, Morales AJ, Parthasarathy S: Evidence for oxidatively modified lipid-protein complexes in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69:1092-1094.
43. Namnoum AB, Hickman TN, Goodman SB, Gehlbach DL, Rock JA. Incidence of symptom recurrence after hysterectomy for endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 64(5):898-902.
44. Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, Groothuis PG. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1089-95.
45. Netsu S, Konno R, Odagiri K, Soma M, Fujiwara H, Suzuki M. Oral eicosapentaenoic acid supplementation as possible therapy for endometriosis. *Ferti Steril* 2008;90:1496-1502.
46. Ngo C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol*. 2009;175:225-34.
47. Nieto N, Torres MI, Rios A, Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr* 2002;132:11-9.
48. Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59:681-684.



49. Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil Steril*. 2000; 74(2):306-12.
50. Nisolle M, Paindaveine B, Bourdon A, Berlière M, Casanas-Roux F, Donnez J. Histology study of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993, 53: 984-8.
51. Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2003;76:223-231.
52. Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Saurí A, García-Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24:1025-1035.
53. Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Saurí A, García-Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Identification and quantification of Dopamine Receptor 2 un human eutopic endometrium: a novel molecular target for endometriosis therapy. *Biol of Reprod* 2010; 83, 866-873.
54. Ohba T, Mizutani H, Maeda T, Matsuura K, Okamura H. Evaluation of endometriosis in uterosacral ligaments by transrectal ultrasonography. *Hum Reprod* 1996; 11:2014-2017.
55. Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, tesone M, Meresman G. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008;23:2701-2708.
56. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:319-328.

57. Oosterlynck DJ, Vandeputte M, Cornillie FJ, Koninckx PR, Waer M. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil. Steril* 1991; 56: 45-51.
58. Operative Laparoscopy Study Group. Postoperative adhesion development after operative laparoscopy: evaluation at early second-look procedures. *Fertil Steril* 1991;55:700.
59. Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996;2:385-96.
60. Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliot PJ, Pien CS et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:4420-4427.
61. Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 2001;16:561-566.
62. Ozawa Y, Murakami T, Tamura M, Terada Y, Yaegashi N, Okamura K. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis xenografts via antiangiogenic activity in severe combined immunodeficiency mice. *Fertil Steril* 2006;86(suppl 4):1146-1151.
63. Parazzini F. Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod* 1999; 14:1332-1334.
64. Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, Sauer MV, Kitajewski J, Zimmermann RC. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor

- 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology*, 2005; 146:1301-1311.
65. Pellicer A, Oliveira N, Gutiérrez A, Remohí J, Simón C. 1994. Implantation in endometriosis: Lessons learned from IVF and oocyte donation. In: Spinola P and Coutinho EM (eds). *Progress in Endometriosis 1994*. Parthenon Publishing Group, Carnforth, UK. 177-183.
66. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995; 10 (suppl. 2):91-97.
67. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simón C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 1998; 70: 425-31.
68. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189(2):824-31.
69. Pittaway DE. Serum markers of endometrium and endometriosis. In: Diamond MP, Osteen KG; eds. *Endometrium and dysfunctional immune response*. Malden MA: Blackwell Science, 1997:31-41.
70. Pittaway DE, Fayeze JA. Serum CA-125 antigen levels increase during menses. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:75-76.
71. Plate KH. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nature Med* 2001; 7: 151-152.
72. Prentice A, Deary AJ, Goldbeck-Wood S, Farquhar C, Smith SK. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; Jul 18:CD000346.

73. Razzi S, Fava A, Sartini A, De Simone S, Cobellis L, Petraglia F. Treatment of severe recurrent endometriosis with an aromatase inhibitor in a young ovariectomised woman. *Br J Obstet Gynaecol* 2004; 111:182– 4.
74. Reese J, Binart N, Brown N, Ma WG, Paria BC, Das SK, Kelly PA, Dey SK. Implantation and decidualization defects in prolactin receptor (PRLR)-deficient mice are mediated by ovarian but not uterine PRLR. *Endocrinology* 2000; 141:1872-81.
75. Ricci E, Parazzini F, Motta T, Ferrari CI, Colao A, Clavenna A, Rocchi F, Gangi E, Paracchi S, Gasperi M y cols. Pregnancy outcome after cabergoline treatment in early weeks of gestation. *Reprod Toxic* 2002;16:791-793.
76. Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:343-352.
77. Rier S, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:145-54.
78. Robert E, Musatti L, Piscitelli G, Ferrari CI. Pregnancy outcome after cabergoline treatment with the ergot derived cabergoline. *Reprod Toxic* 1996;10:333-337.
79. Rogers MS, Xu H, Lui WT, Chu CY, Ng PS, Wang CC. Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Hum Reprod* 2009;24:608-618.
80. Rokitansky C. Ueber uterusdrüsen neubildung in uterus und ovarial sarcomen. *Zeitschrift Gesellschaft der Aerzte in Wien*. 1860;16:577-581.

81. Rokwell LC, Pillai S, Olson CE, Koos RD. Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen induced uterine edema and implantation in rodents. *Biol Reprod*, 2002;67:1804-1810.
82. Rosenfel DL, Lecher BD. Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139: 105.
83. Ruffo G, Sartori A, Crippa S, Partelli S, Barugola G, Manzoni A, et al. Laparoscopic rectal resection for severe endometriosis of the mid and low rectum: technique and operative results. *Surg Endosc* 2012;26:1035-40.
84. Rychlik DF, Bieber EJ. Thoracic endometriosis syndrome resembling pulmonary embolism. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2001;8:445.
85. Saleh A, Tulandi T. Reoperation after laparoscopic treatment of ovarian endometriomas by excision and by fenestration. *Fertil Steril* 1999;72:322.
86. Sampson JA. Perforating hemorrhagic cysts (chocolate cyst) of the ovary: their importance and specially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type. *Arch Surg*, 1921;3:245.
87. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-9.
88. Sánchez-Fernández P y Cristóbal-García I. Tratamiento médico del dolor por endometriosis. En: García-Velasco JA. Cuadernos de Medicina Reproductiva. 1 ed. Vol. 17: Endometriosis en el siglo XXI. Madrid: ANARR; 2011.p. 61-70.
89. Sanfilippo JS, Wakin NG, Schikler KN, Yussman MA. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 39-43.

90. Sarkar C, Chakroborty D, Basu Mitra R, Banerjee S, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Circ Physiol* 2004; 287(4): H 1554-60.
91. Schade R, Andershon S, Suissa S, Haverkamp W, Garbe E. Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Eng J of Med*, 2007;356:29-38.
92. Schlaff WD, Dugoff L, Damewood MD, Rock JA. Megestrol acetate in the treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol* 1990;75:646.
93. Schutter MJ, Davelaar EM, Van Kamp GJ, verstraeten RA, Kenemans P, Verheijen HM. The differential diagnostic potential of a panel of tumor markers (CA 125, CA 15-3, and CA 72-4 antigens) in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:385-392.
94. Schweppe K, Wynn R: “Ultrastructural changes in endometriotic implants during the menstrual cycle”. *Obstet Gynecol*. 1981; 58: 465-469.
95. Scott R.B, TeLinde R. W. External endometriosis—the scourge of the private patient. *Ann Surg*. 1950; 131(5):697- 720.
96. Sebastian S, Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4600 –2.
97. Senger DR, Dvorak HF. Vascular permeability factor: a protein mediator that induces tumor vessel hyperpermeability and promotes endothelial cell growth. *Human Astrocytomas*. Edited by PM Black and L Lampson. London, Blackwell Scientific Publications 1993: 250-60.

98. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25; 219(4587):983-5.
99. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*. 1993 Sep; 12(3-4):303-24.
100. Serafini PC. El origen de la endometriosis. En: *Endometriosis en el siglo XXI*. Vol. 17. Num. 3: Cuadernos de Medicina Reproductiva. Madrid, 2011.p. 9-16.
101. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk- 1-deficient mice. *Nature* 1995; 376:62–6.
102. Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3112-3118.
103. Shippen ER, West WJ Jr. Successful treatment of severe endometriosis in two premenopausal women with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 2004; 81:1395– 8.
104. Simoens S, Hummelshoj L, D’Hooghe T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update* 2007;13:395-404.

105. Simon C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994; 9:725-729.
106. Somigliana E, Viganò P, Candiani M, Felicetta I, Di Blasio AM, Vignali M. Use of serum-soluble intercellular adhesion molecule-1 as a new marker of endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77:1028-1031.
107. Sookhai S, Wang JH, Mcourt M, O’Connell D, Redmond HP. Dopamine induces neutrophil apoptosis through a dopamine D-1 receptor-independent mechanism. *Surgery* 1999;126:314-22.
108. Soysal S, Soysal M, Ozer S, Gul N, Gezgin T. The effects of postsurgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2004; 19:160 –7.
109. Speroff L, Glass R.H. y N.G.K. Endometriosis. *Endocrinología ginecológica e infertilidad*. L. W. a. Wilkins. Madrid, España, Waverly Hispánica S.A. 1999; 1058-1073.
110. Speroff L, Fritz M.A. Endometriosis. En su: *Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad*. 2ª ed. Madrid, Lippincott Williams & Wilkins. 2006. pp. 1103-1133.
111. Stefansson H, Geirsson RT, Steinthorsdottir V, Jonsson H, Manolescu A, Kong A. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Hum Reprod* 2002; 17:555-559.



112. Stockwell J. Endometriosis: clinical assessment and medical management. *Adv Nurse Pract.* 2006; 14(1):43-5.
113. Stratton P, Craig W, Premkumar A et al. Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis. *Fertil Steril* 2003; 79:1078-1085.
114. Stratton P, Sinaii N, Segars J, Koziol D, Wesley R, Zimmer C. Return of chronic pelvic pain from endometriosis after raloxifene treatment: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2008;111:88-96.
115. Sung L, Mukherjee T, Takeshige T. Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:152-156.
116. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, Turing embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996 Dec 27; 87(7):1171-80.
117. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1998 Oct 16; 282(5388):468-71.
118. Surrey ES. The role of progestins in treating the pain of endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2006; 13(6):528-34.
119. Taff L, Jones S. Cesarean Scar endometriosis. A report of two cases. *J Reprod Med.* 2001;47:50-2.
120. Takayama K, Zeitoun K, Gunby RT, Sasano H, Carr BR, Bulun SE. Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase

- inhibitor. *Fertil Steril*. 1998;69:709 –13.
121. Tamura K, Sakurai T, Kogo H. Relationship between prostaglandina E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascular Pharmacol*. 2006;44:411-416.
122. Tan XJ, Lang JH, Liu DY, Shen K, Leng JH, Zhu L. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 2002; 78:148-53.
123. Tang FY, Meydani M. Green tea catechins and vitamina E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through supresión of IL-8 production. *Nutr Cancer*. 2001;41:119-125.
124. Tasuku H. Role of citokines in endometriosis. *Fétil Steril* 2001, 76:1-10.
125. Taylor RN, Lundeen SG, Giudice LC. Emerging role of genomics in endometriosis research. *Fertil Steril* 2002b; 78:694-698.
126. Te Linde RW, Scott RB. Experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 60: 1147-1173.
127. Telimaa S, Kauppila A, Ronnberg L, Suikkari AM, Seppala M. Elevated serum levels of endometrial secretory protein PP14 in patients with advanced endometriosis. Suppression by treatment with danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:866-871.
128. Thorner M, Schran H, Evans W, Rogol AD, Morris L., MacLeod R. A Broad Spectrum of Prolactin Suppression by Bromocriptine in Hyperprolactinemia Women: A Study of Serum Prolactim and Bromocriptine Levels after Acute and Chronic Administration of Bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;

- 50:1026-1033.
129. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1999 Dec 24; 286(5449):2511-4.
130. Tian XL, Kadaba R, You SA, Liu M, Timur AA, Yang L, y cols. Identification of an angiogenic factor that when mutates caused susceptibility to Klippel-Trenaunay Syndrome. *Nature* 2004;427:640-5.
131. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991 Jun 25; 266(18):11947-54.
132. Treloar SA, Wicks, J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V, et al. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J hum Genet*. 2005;77:365-76.
133. Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, et al. interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:1118-22.
134. Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, Tavmergen E, Zeng W, Arici A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;91:687-93.
135. Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene *Development*. 1996 Jul; 122(7):2251-9.

136. Uyttendaele H, Soriano JV, Montesano R, Kitajewski J Notch4 and Wnt-1 proteins function to regulate branching morphogenesis of mammary epithelial cells in an opposing fashion. *Dev Biol.* 1998 Apr 15;196(2):204-17
137. Vaisse C, Atger M, Potier B, Milgrom E. Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication. *DNA Cell Biol* 1990; 9:401-413.
138. Valle RF, Sciarra JJ. Endometriosis: treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2003;997:229-239.
139. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparatio of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994;174:83-93.
140. Vance M, Evans W, Thorner M. Bromocriptine. *Annals of Internal Medicine* 1984; 100:78-91.
141. Vercellini P, Frontino G, De Girgio O, Pietropaolo G, Pasin R, Crosignani PG. Continuous use of an oral contaceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrheal that does not respond to a cyclic pill regimen. *Fertile Steril.* 2003; 80:560.
142. Vercellini P, Somigliana E, Daguati R, Vigano P, Meroni F, Crosignani PG. postoperative oral contraceptive exposure and risk of endometrioma recurrence. *Am J obstet Gynecol.* 2008;198:1-5.
143. Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 1996; 65:299-304.

144. Verhelst J, Abs R, Maiter D, Van den Bruel A, Vandeweghe M, Velkeniers B, Mockel J, Lamberigts G, Petrossians P, Coremans P y cols. Cabergoline in the treatment of hyperprolactinemia: a study of 455 patients. *Journal of Clin Endocrin and Metab.* 1999;81:2518-2522.
145. Verheul HM, Hoekman K, Jorna AS, Smit EF, Pinedo HM. Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 2000; 5(Suppl 1):45–50.
146. Via LE, Gore-Langton RE, Pluda JM. Current clinical trials administering the antiangiogenesis agent SU5416. *Oncology* 2000; 14: 1312-23
147. Viganó P, Somigliana E, Gaffuri B, Santorsolo R, Busacca M, Vignali M. Endometrial release of soluble intercellular adhesion molecule 1 and endometriosis: relationship to the extent of the disease. *Obstet Gynecol* 2000; 95:115-119.
148. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KD Rand Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269:26988–95.
149. Walter A, Hentz J, Magtibay P, Cornella J, Magrina J. Endometriosis: Correlatoin between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1407-1413.
150. Wass JA, Williams J, Charlesworth M, Kingsley DP, Halliday AM, Doniach I, Rees LH, McDonald WI, Besser GM. Bromocriptine in Management of large Pituitary Tumours. *British Medical Journal* 1982; 284:1908-1911.
151. Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM, Patel A, Maniscalco WM. Differential expression of VEGF mRNA splice variants in newborn and adult hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999; 276:858–67.

152. Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I, Scanlon MF. A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. *N Engl J Med* 1994; 331:904-909.
153. Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, Merrill MJ, Zimonjic DB. Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12. *Hum Genet.* 1996; 97(6):794-7.
154. Weir E, Mustard C, Cohen M, kung R. Endometriosis: what is the risk of hospital admission, readmission, and major surgical intervention? *J Minim Invasive Gynecol* 2005; 12:486-93.
155. Wick MM. Levodopa and dopamine analogs: dihydroxy and trihydroxybenzylamines as novel quinol antitumor agents in experimental leukemia in vivo. *Cancer Treat Rep.* 1981; 65(9-10):861-7.
156. Wild RA, Shivers CA, Medders D. Detection of antiendometrial antibodies in patients with endometriosis: methodological issues. *Fertil Steril* 1992;58:518-521.
157. Wild RA, Hirisave V, Podczaski ES, Coulam C, Shivers CA, Satyaswaroop PG. Autoantibodies associated with endometriosis: can their detection predict presence of the disease? *Obstet Gynecol* 1991;77:927-931.
158. Wu MH, Yang BC, Hsu CC, Lee YC, Huang KE. The expression of soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 70:1139-1142.
159. Wulff C, Wilson H, Rudge JS, Wiegand SJ, Lunn SF, Fraser HM. Luteal angiogenesis: prevention and intervention by treatment with fascular endothelial growth factor trap. *J Clin End Met,* 2001;86:3377-3386.

160. Yamauchi N, harada T, Taniguchi F, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Tumor necrosis factor-alpha induced the release of interleukin-6 from endometriotic stromal cells by the nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *Fertil Steril* 2004;82:1023-1028.
161. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407(6801):242-8.
162. Yantiss RK, Clement PB, Young RH. Endometriosis of the intestinal tract: a study of 44 cases of a disease that may cause diverse challenges in clinical and pathologic evaluation. *Am J Surg Pathol* 2001;25:445.
163. Ye C, Ito K, Komatsu Y, Takagi H. Extremely high levels of CA 19-9 and CA 125 antigen in benign mucinous ovarian cystadenoma. *Gynecol Oncol* 1994; 52:267-271.
164. Ylikorkala O, Makila UM. Prostacyclin and thromboxane in gynecology and obstetrics. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;152(3):318-29.
165. Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Tsutsumi O, Yano T, y cols. Concentrations of interferon-gamma-induced proteína-10 (IP-10), an antiangiogénica substance, are decreased in peritoneal fluid of women with advanced endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:60-5.
166. Zanettini R, Antonini A, Gatto G, gentile R, tesei S, Pezzoli G. Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson’s disease. *N Eng J of Med*, 2007;356:39-46.

167. Zimmermann RC, Hartman T, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. *Microv Research* 2001;62:15-25
168. Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J, Ferin M. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J Clin Endo Metab*, 2001;86:768-772.
169. Zimmermann RC, hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vasculr endothelial growth vactor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest*, 2003;112:659-669.