



PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLÒGIA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



**ESTABLECIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN
DE MODELO MURINO DE LA PATOLOGÍA GINECOLÒGICA
ENDOMETRIOSIS UTILIZANDO XENOGRAPTS
DE ENDOMETRIO HUMANO
PARA EL ESTUDIO DEL POTENCIAL PAPEL TERAPÉUTICO
DEL RNA DE DOBLE CADENA (PIC-PEI)”**

**Tesis Doctoral presentada por
PAULA CALVO HOYAS, Licenciada en Medicina**

DIRECTOR DE TESIS:

Profesor Antonio Pellicer Martínez

CO-DIRECTOR:

Dr. Raúl Gómez Gallego

VALENCIA, 2018

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

ESTABLECIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN
DE MODELO MURINO DE LA PATOLOGÍA GINECOLÓGICA
ENDOMETRIOSIS UTILIZANDO XENOGRAFTS
DE ENDOMETRIO HUMANO
PARA EL ESTUDIO DEL POTENCIAL PAPEL TERAPÉUTICO
DEL RNA DE DOBLE CADENA (PIC-PEI)”



VALENCIA, 2018

PAULA CALVO HOYAS

DIRECTOR DE TESIS:

Profesor Antonio Pellicer Martínez

CO-DIRECTOR:

Dr. Raúl Gómez Gallego



Antonio Pellicer Martínez, Catedrático 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: “Establecimiento y optimización de modelo murino de la patología ginecológica endometriosis utilizando xenografts de endometrio humano para el estudio del potencial papel terapéutico del RNA de doble cadena (plC-PEI)” ha sido realizado por Dña. Paula Calvo Hoyas 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, Marzo de 2018.

Director

A.Pellicer Martínez



Co-Director

R. Gómez Gallego





AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer al profesor Pellicer su confianza en mí ofreciéndome la oportunidad de participar en este grupo de trabajo de Endometriosis desde el primer año de residencia, en el que he estado trabajando durante 4 años, y gracias al cual he tenido la posibilidad de realizar esta tesis.

En segundo lugar quisiera dar las gracias al Dr. Raúl Gómez: investigador incansable, brillante científico y mejor persona. Es admirable tu afán investigador y tu talento para crear excelentes equipos. Gracias por tu ayuda, cercanía y disponibilidad incondicional, refleja tu entrega a la actividad investigadora y apoyo a los médicos jóvenes, por alentarnos a mejorar y abrirnos el camino para conseguir nuestros objetivos.

Y gracias en general a todo el equipo de trabajo de Endometriosis de La Fe: Jessica, Carmen María, Irene, Cris, Inma, Vicente, Toni, sobre todo a Ana y a mis compañeros de residencia en especial a Eli, que me han acompañado y animado durante estos años.

Por último quería dar las gracias a mi familia, a Jose, a Baloo y a mis amigos, por apoyarme en este momento y hacerme sentir con ganas y fuerzas de seguir formándome y alcanzar nuevas metas en mi profesión.

A todos, ¡GRACIAS!



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Concepto.....	18
1.2. Definición histórica de la endometriosis.....	18
1.3. Epidemiología:.....	18
1.3.1. Factores de riesgo asociados.....	19
1.3.2. Implicaciones sociales de la endometriosis:.....	19
1.4. Localización e histología de las lesiones.....	20
1.4.1. Localización de las lesiones:.....	20
1.4.2. Características histológicas macroscópicas:.....	20
1.4.2.1. Lesiones peritoneales:.....	20
1.4.2.1.1. Lesiones rojas (lesiones atípicas):.....	20
1.4.2.1.2. Lesiones negras (lesiones típicas):.....	21
1.4.2.1.3. Lesiones blancas:.....	21
1.4.2.2. Endometriosis ovárica:.....	22
1.4.2.2.1. Focos superficiales:.....	22
1.4.2.2.2. Endometriomas:.....	22
1.4.2.3. Endometriosis infiltrante profunda:.....	23
1.4.2.3.1. Compartimento anterior:.....	23
1.4.2.3.2. Pared pélvica lateral:.....	24
1.4.2.3.3. Compartimento posterior:.....	24
1.4.3. Características histológicas microscópicas:.....	24
1.4.3.1. Componente glandular:.....	25
1.4.3.2. Componente estromal:.....	25
1.5. Clasificación de la endometriosis.....	25
1.6. Etiopatogenia de la endometriosis.....	28
1.6.1. Hipótesis etiopatogénicas clásicas.....	28
1.6.1.1. Teoría de la implantación por menstruación retrógrada.....	28
1.6.1.2. Teoría de la metaplasia celómica.....	29
1.6.1.3. Teoría del trasplante mecánico.....	29
1.6.1.4. Teoría de la difusión linfática y hematógena.....	29
1.6.1.5. Teoría de los restos embrionarios müllerianos.....	29
1.6.1.6. Teoría de las células madre de la médula ósea.....	30
1.6.2. Factores asociados al desarrollo de la enfermedad.....	30
1.6.2.1. Alteraciones del sistema inmunológico.....	30
1.6.2.2. Influencia endocrina.....	31
1.7. Diagnóstico.....	33
1.7.1. Criterios Clínicos.....	33
1.7.1.1. Dolor pélvico crónico.....	33
1.7.1.2. Hemorragia uterina disfuncional.....	34
1.7.1.3. Esterilidad.....	34
1.7.1.4. Otros síntomas dependientes de la localización de los implantes.....	34
1.7.1.4.1. Síntomas urinarios:.....	34
1.7.1.4.2. Síntomas intestinales:.....	34
1.7.1.4.3. Síntomas pleurales y pulmonares:.....	35
1.7.1.4.4. Sintomatología de la pared abdominal:.....	35
1.7.2. Exploración física ginecológica.....	35
1.7.3. Técnicas diagnósticas no invasivas:.....	35

1.7.3.1. Técnicas de imagen.....	35
1.7.3.1.1. Ecografía transvaginal.....	35
1.7.3.1.2. Ecografía transrectal.....	36
1.7.3.1.3. Ultrasonografía endoscópica rectal.....	36
1.7.3.1.4. Resonancia magnética.....	37
1.7.3.2. Marcadores biológicos.....	38
1.7.3.2.1. Marcadores tumorales y polipéptidos.....	38
1.7.3.2.1.1. CA-125 en suero.....	38
1.7.3.2.1.2. CA 19.9 en suero.....	39
1.7.3.2.1.3. sICAM-1 (Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1) en suero.....	39
1.7.3.2.1.4. Proteína placentaria 14 en suero (PP-14).....	39
1.7.3.2.2. Marcadores inmunológicos.....	39
1.7.3.2.2.1. Citoquinas en suero.....	39
1.7.3.2.2.2. Anticuerpos antiendometriales en suero.....	40
1.7.3.2.2.3. Marcadores de estrés oxidativo.....	40
1.7.3.2.3. Marcadores en tejido endometrial.....	40
1.7.3.2.3.1. Aromatasa P 450.....	40
1.7.3.2.4. Receptores hormonales.....	40
1.7.3.2.5. Inmunohistoquímica de fibras nerviosas.....	40
1.7.4. Técnicas diagnósticas invasivas.....	41
1.7.4.1 Laparoscopia.....	41
1.8. Tratamiento de la endometriosis:.....	42
1.8.1 Tratamiento expectante:.....	42
1.8.2 Tratamiento quirúrgico.....	42
1.8.2.1 Cirugía conservadora laparoscópica o laparotómica.....	43
1.8.2.2 Cirugía agresiva o histerectomía.....	43
1.8.3. Tratamiento farmacológico:.....	44
1.8.3.1 Tratamiento médico sintomático: Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	44
1.8.3.2 Tratamientos farmacológicos hormonales de uso clínico:.....	45
1.8.3.2.1 Anticonceptivos orales combinados (ACO).....	45
1.8.3.2.2 Progestágenos.....	46
1.8.3.2.3 Danazol.....	47
1.8.3.2.4 Gestrinona.....	47
1.8.3.2.5 Análogos de la GnRH.....	47
1.8.3.3 Tratamientos farmacológicos hormonales experimentales:.....	48
1.8.3.3.1 Antagonistas de la GnRH:.....	48
1.8.3.3.2 Inhibidores de la aromatasa.....	48
1.8.3.3.3 Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs).....	49
1.8.3.3.4 Moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SPRMs).....	49
1.8.3.4 Tratamientos no hormonales experimentales:.....	49
1.8.3.4.1 Fármacos hipolipemiantes.....	50
1.8.3.4.2 Bifosfonatos.....	50
1.8.3.4.3 Fármacos Inmunomoduladores.....	51
1.8.3.4.4 Bloqueantes del Factor Nuclear Kappa (B FN-kB).....	51
1.9 Vasculogénesis y angiogénesis.....	52
1.9.1. Angiogénesis y endometriosis.....	53
1.9.2 Terapias antiangiogénicas:.....	54
1.9.2.1 Inhibidores selectivos de la COX-2.....	55
1.9.2.2 Té verde.....	56
1.9.2.3 Agonistas dopaminérgicos.....	56
1.9.2.4. Inhibidor de la fibrinólisis (Inhibidores PAI).....	57
1.10. Ácido polinosina-policitidílico (pIC o PolyI: C).....	58



1.11. Modelos animales para el estudio de la endometriosis.....	61
1.11.1. Modelos murinos heterólogos.....	61
1.11.2. Modelos murinos homólogos.....	62
1.11.3. Justificación de un diseño experimental con uso de modelo heterólogo murino y del compuesto pIC para valorar su efecto en endometriosis en el presente trabajo.....	63
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	67
3. OBJETIVO.....	71
3.1. Objetivo principal.....	71
3.2. Objetivo secundario.....	71
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	75
4.1.- Diseño del estudio.....	75
4.2.- Generación del modelo murino heterólogo de endometriosis.....	76
4.2.1 Preparación de los animales receptores.....	76
4.2.2 Obtención de tejido donante a partir de muestras de endometrio humano.....	77
4.2.3 Marcaje celular de endometrio mediante adenovirus recombinante.....	78
4.2.3.1 Amplificación del adenovirus recombinante Ad-mCherry y determinación de partículas víricas.....	81
4.2.3.2 Transfección adenoviral en fragmentos de endometrio.....	82
4.2.4 Implantación del tejido donante en receptores.....	83
4.2.5 Intervenciones farmacológicas.....	83
4.3 Determinación del efecto de pIC-PEI sobre tamaño de las lesiones endometriósicas.....	84
4.3.1 Determinación no-invasiva a lo largo del tiempo del tamaño de los implantes endometriósicos mediante cuantificación de la señal fluorescente emitida in vivo.....	84
4.3.2 Cuantificación de la señal inmunofluorescente para estimación del porcentaje de reducción del tamaño del implante endometriósico.....	84
4.4 Determinación del efecto de pIC-PEI sobre parámetros asociados a la angiogénesis mediante inmunofluorescencia.....	85
4.4.1 Procesos inmunohistoquímicos comunes.....	85
4.4.1.1 Uso de anticuerpos primarios para el análisis de los parámetros inmunofluorescentes de interés.....	88
4.4.2 Detección de la vascularización.....	89
4.4.3 Detección de la apoptosis.....	90
4.4.4 Detección de la proliferación.....	93
4.4.5 Cuantificación del marcaje inmunofluorescente.....	93
4.5.- Análisis estadístico.....	94
5. RESULTADOS.....	97
5.1.- Efectos del tratamiento sobre el número, tamaño y morfología de las lesiones.....	97
5.2.- Efectos del tratamiento sobre parámetros asociados a la angiogénesis evaluados mediante inmunofluorescencia.....	99
5.2.1 Vascularización.....	99
5.2.2 Proliferación celular.....	101
5.2.3. Apoptosis.....	103
6. DISCUSIÓN.....	107
7. CONCLUSIÓN.....	117
8. BIBLIOGRAFÍA.....	121



LISTADO DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

- ACO:** Anticonceptivos Combinados Orales
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
AEM: Agencia Estatal del Medicamento
AFS: American Fertility Society
AINE: Antiinflamatorio No Esteroideo
ARN: Ácido Ribonucleico
ASRM: American Society of Reproductive Medicine
FN-kB: Bloqueantes del Factor Nuclear KappaB
BHCG: Gonadotropina Coriónica Humana
BSA: Albúmina Sérica Bovina
°C: Grados centígrados
Cb2: Cabergolina
CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica
CFP: Cyan Fluorescent Protein
CO₂: Dióxido de carbono
Cols: colaboradores
COX-2: Ciclooxygenasa 2
DA: Dopamina
DAB: Diaminobenzamida
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente del ácido nucleico.
DMEM-F12: medio de cultivo celular
DrD2: Receptor tipo 2 de la Dopamina
E1: Estrona 1
17βE2: 17-β- estradiol
EGCG: Epigallocatequina galato
EMA: European Medicines Agency
ENZIAN: sistema de clasificación específico para la endometriosis infiltrativa profunda
EPA: Ácido Eicosapentaenoico
ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embriology
ESM o SEM: Erros estándar de la media
Et al: y colaboradores
FBS: Suero Fetal Bovino
FN-KB: Factor Nuclear KappaB
GFP: Green Fluorescent Protein
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
HEPES: Ácido 4- (2-hidroxietyl) -1-piperazinaetanosulfónico es un agente tampón químico orgánico
HRP:enzima peroxidasa de rábano
IF: inmunofluorescencia

IFE: índice fertilidad-endometriosis
IFN: interferón
Ig: inmunoglobulina
IHC : inmunohistoquímica
IL-6: Interleuquina 6
IL-Beta: Interleuquina-Beta
h: Hora
HMG-CoA: 3 hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A
HRP: Peroxidasa de rábano
kDa: kilodalton
M199: medio de cultivo celular
MIF: Factor Inhibidor de la migración de macrófagos
min: Minutos
MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha
MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein 2
MMP: Metaloproteasa matriz celular
NK: Natural killer
NU: Nude o atímico
NOD-SCID: Non-obese diabetic severe combined inmunodeficient
PAIs: Inhibidores de los activadores del plasminógeno
PAI-1, 2 y 3: Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1, de tipo 2 y de tipo 3
PBS: Phosphate Buffered Saline (tampón fosfato salino: 0,01M, ph 7,4, NaCl 0,14M)
PDTC: pirrolidina ditiocarbamato
PEI: polietilenimina
Pg: picogramos
PGE2: Prostaglandina E2
PIC: Poly I:C : Ácido polinosin-policitídico
PP-14: Proteína placentaria 14
RM: Resonancia Magnética
ROI: región de interés
SCID: Severe combined inmunodeficient
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
TA: Temperatura ambiente
TLR: Toll like receptor
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha.
TNP-A: Fármaco antiangiogénico
UFP: Unidad Formadora de Placa
uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
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
YFP: Yellow Fluorescent Protein



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.4.2.1.1: Imagen en la que se observan lesiones rojas en ligamento uterosacro. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate. ...	21
Figura 1.4.2.1.2: Imagen en las que se observan lesiones típicas en el peritoneo parietal. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.....	21
Figura 1.4.2.1.3: Imagen en la que se observa una lesión blanca. Servicio de Ginecología Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.....	22
Figura 1.4.2.2.2: Imagen que muestra endometrioma ovárico. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.....	22
Figura 1.4.2.3.1: Imagen que muestra un nódulo endometriósico en pared vesical. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.....	23
Figura 1.4.2.3.3: Imagen ecográfica en la que se observa un nódulo endometriósico en el tabique rectovaginal. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía de la doctora Susana Martínez Cuenca.....	24
Figura 1.5: Clasificación revisada de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) para el estadiaje de la endometriosis. 1997.....	26
Fig 1.6.2.2A: Mecanismos fisopatológicos de la endometriosis.....	32
Figura 1.7.3.1.3: Imagen ecográfica en la que se observa una endometriosis ovárica. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía de la doctora Susana Martínez Cuenca.....	37
Figura 1.7.3.1.4: Imagen de resonancia magnética donde se observa un nódulo endometriósico en la pared vesical. Servicio de Radiología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe.....	37
Figura 4.2.1: Ratón de la cepa Crl:CD1-Foxn1nu. Imagen sacada de la página web oficial de Charles River.....	76
Figura 4.2.3A: Ejemplos de proteínas fluorescentes empleadas.....	79
Figura 4.2.3B: Ejemplos de proteínas fluorescentes empleadas.....	79
Figura 4.2.3.1:: Proceso de construcción de vectores adenovirales. Imagen modificada de la página web www.vectorbiolabs.com	82
Figura 4.4.1A: Explicación fundamento inmunohistoquímica.....	86
Figura 4.4.1B: Fundamento de la amplificación de la señal basada en biotina-estreptavidina.....	87
Figura 4.4.1C: Inmunohistoquímica vs. Inmunofluorescencia. Se representa el fundamento de estas dos técnicas y diferencias entre ambas.....	88
Figura 4.4.2:: Esquema de la reacción de inmunofluorescencia.....	89
Figura 4.4.3A:: Representación gráfica del proceso de apoptosis o muerte celular programada:.....	91
Figura 4.4.3B: Fundamento TUNEL.....	92
Figura 5.1	89

FIGURAS

- Figura 5.2:** Se observa el efecto de Pic-PEI sobre las características macroscópicas de los implantes endometriales humanos en la pared peritoneal de ratones del grupo control (A, B), grupo pIC-PEI (C, D), y grupo con compuesto anti-VEGF (E, F) al final del período de tratamiento de 4 semanas.....99
- Figura 5.2.1:** Efecto de pICPEI sobre la vascularización de los implantes endometriósicos 101
- Figura 5.2.2A:** Proliferación de las células teñidas contra marcador de la proliferación celular Ki67 (color rojo). 102
- Figura 5.2.2C:** Representación de la proliferación celular, Cuantificación del área de la lesión positiva para el marcaje con Ki-67..... 102
- Figura 5.2.3A:** Marcado de las roturas de ADN inducidas por ADNasa I (color rosa) en los implantes de endometriosis obtenido después de sacrificar a los ratones tratados con placebo, anti-VEGF y pIC-PEI..... 103
- Figura 5.2.3B:** Se observa la apoptosis en los tres grupos, el porcentaje es mayor estadísticamente significativa en los dos grupos de tratamiento, siendo más acentuada en nuestro compuesto de estudio. 103





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). Así mismo, 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. Así mismo, 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, úterosacros, 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, sobre todo ligamentos uterosacros, 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 petequial y/o áreas de hipervascularización principalmente en peritoneo de ligamentos anchos y úterosacros.

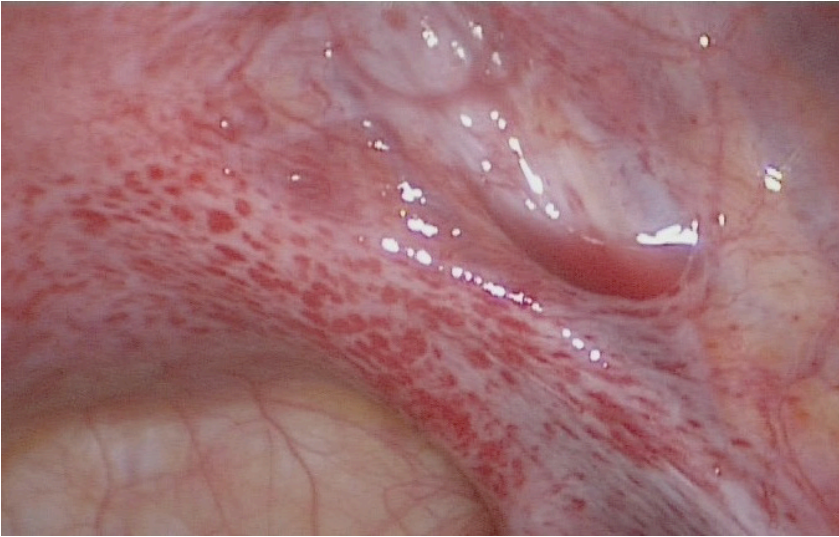


Figura 1.4.2.1.1:
Imagen en la que se observan lesiones rojas en ligamento uterosacro. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.

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.

Figura 1.4.2.1.2:
Imagen en las que se observan lesiones típicas en el peritoneo parietal. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.



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).

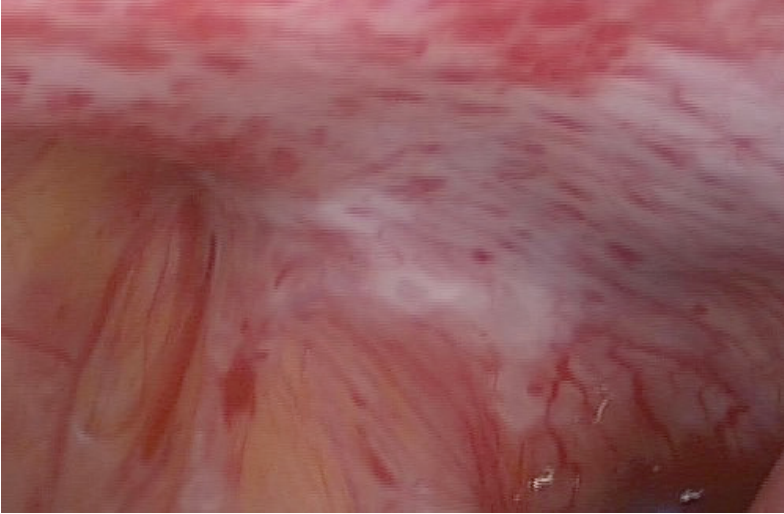


Figura 1.4.2.1.3:
Imagen en la que se observa una lesión blanca. Servicio de Ginecología Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.

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).



Figura 1.4.2.2.2:
Imagen que muestra endometrioma ovárico. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.

1.4.2.3. ENDOMETRIOSIS INFILTRANTE PROFUNDA:

La endometriosis se considera infiltrante cuando las lesiones alcanzan más de 5 mm de profundidad en el peritoneo y pueden estar situadas en el fondo de saco de Douglas, en el espacio vesicouterino y en otras regiones de la pelvis (Cornillie et al., 1990).

Vercellini y cols. (Vercellini et al., 2004) reservan este término para lesiones ubicadas en el retroperitoneo en regiones distintas de la endometriosis común y comprometiendo órganos como intestino, uréteres, vejiga o región rectovaginal, pudiendo provocar dolor severo. Puede dividirse en tres localizaciones anatómicas (Chapron et al., 2006):

1.4.2.3.1. COMPARTIMENTO ANTERIOR:

Nódulos localizados en pared vesical (Kovoor y cols, 2010) o ligamentos redondos. (Crispi y cols, 2012)

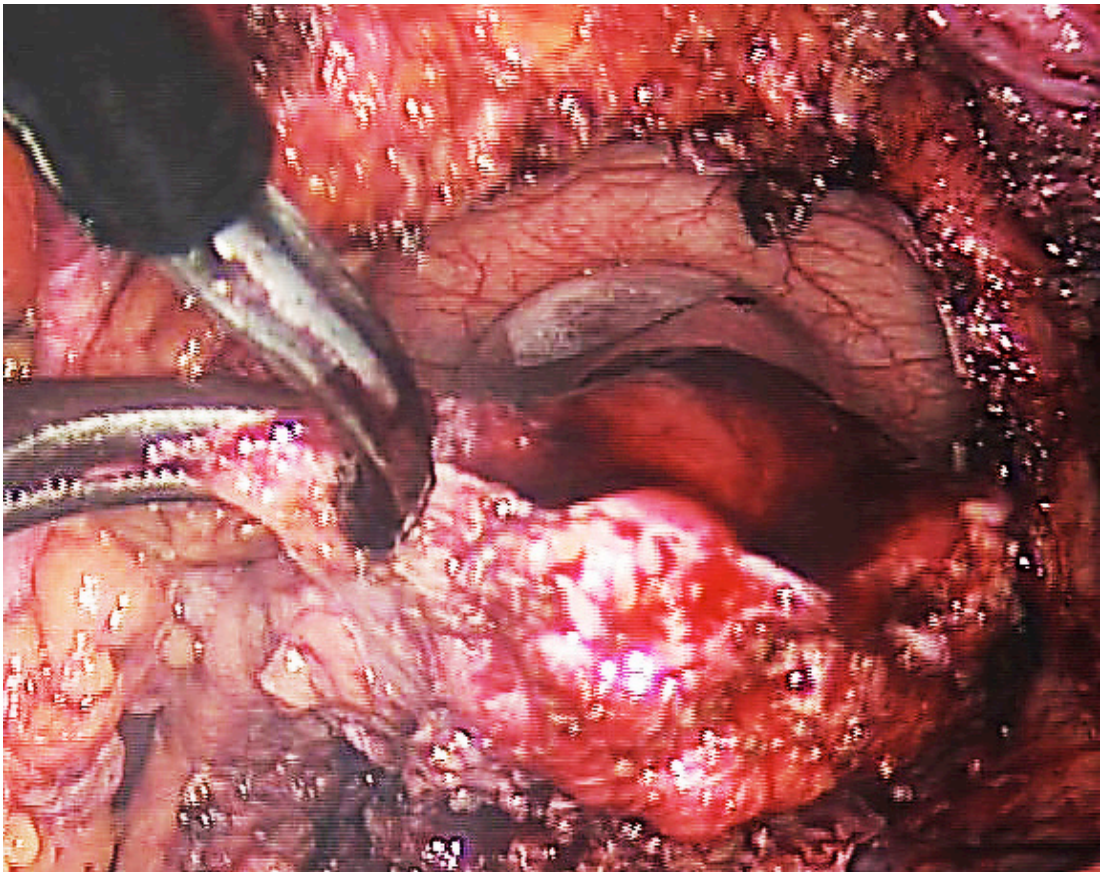


Figura 1.4.2.3.1: Imagen que muestra un nódulo endometriósico en pared vesical. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politènic La Fe, cortesía del doctor Vicente Payá Amate.

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 uterosacos (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 (Fernandez-Rey y cols, 2009), sigma, ciego y apéndice (Abrao y cols, 2010; Cirillo y cols, 2008).

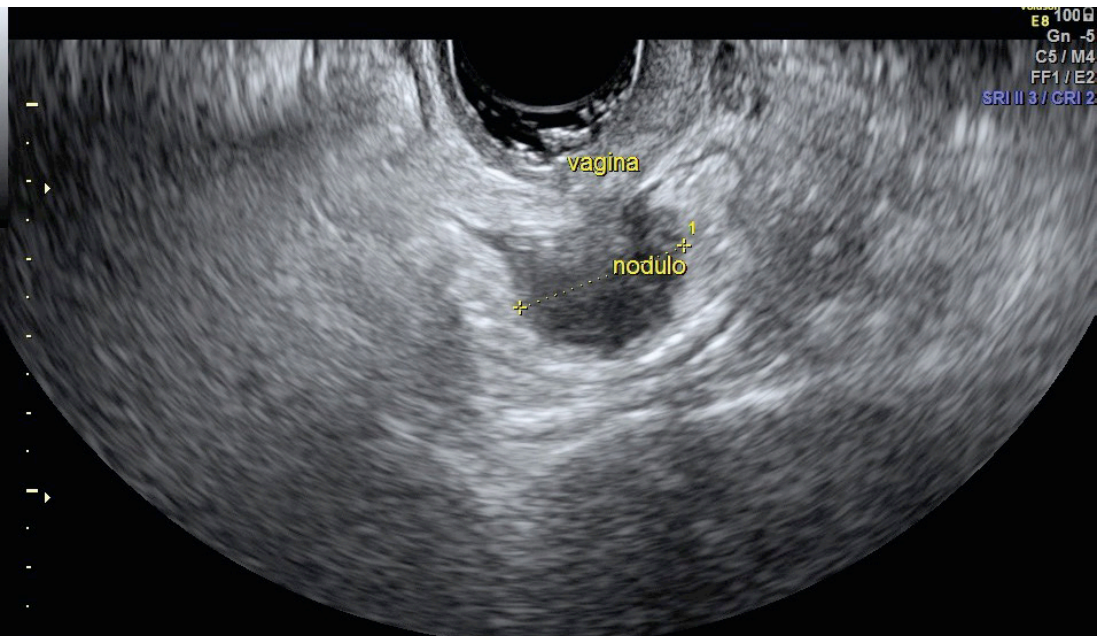


Figura 1.4.2.3.3 : Imagen ecográfica en la que se observa un nódulo endometriósico en el tabique rectovaginal. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía de la doctora Susana Martínez Cuenca.

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.

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 las 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.

La clasificación de la endometriosis es importante para especificar el diagnóstico, así como para que los profesionales empleen los mismos términos y sea posible estandarizar comparaciones y realizar estudios de investigación.

En el momento actual, pese a sus limitaciones y a la aparición de nuevos sistemas de clasificación que han sido o están siendo validados, la clasificación más ampliamente utilizada es la de la American Society for Reproductive Medicine (ASRM), revisada en el año 1996 (Adamson, 2011; Canis et al., 1997).

Según esta clasificación, la endometriosis puede dividirse en 4 estadios, asignando una puntuación en función del tamaño, profundidad y localización de los implantes endometriósicos además de la presencia de adherencias asociadas.

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 está entre 16 y 40), IV (severo, cuando la puntuación es mayor de 40) (Figura 1.5).



SOCIETAT 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 Pronóstico _____
 Grado IV (Severe) - >40
 Total _____

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	< 1/3 Cierre	1/3-2/3 Cierre	> 2/3 Cierre
	D Transparente	1	2	4
	Opaco	2	8	16
	I Transparente	1	2	4
	Opaco	4	8	16
TROMPA	D Transparente	1	2	4
	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 negras [(B) negras, depositos de hemosiderinas, azul]. Indicar el porcentaje total descrito como R ___% B ___% and N ___%. El total debe ser igual al 100%.

Endometriosis Adicional: _____

Patología asociada: _____



Figura 1.5: 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 compartimientos: (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 y cols, 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 y cols, 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 etiología y patogenia de la endometriosis no está completamente establecida a pesar de haber sido una de las patologías ginecológicas más investigadas (Vercellini et al., 2014). 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 (figura 1.6.2.2A). Entre las teorías más prevalentes 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.

Actualmente se trata de la teoría más aceptada. Defiende que la implantación de las células endometriales en la superficie peritoneal se produce por migración de dichas células a través de las trompas de Falopio a la cavidad abdominal (Sampson, 1927). Se ha hallado sangre menstrual en el líquido peritoneal hasta en el 90% de mujeres sanas con trompas de Falopio permeables que se someten a una laparoscopia durante el periodo perimenstrual (Halme et al., 1984). Además, se ha demostrado la existencia de células viables en el flujo menstrual y que estas pueden crecer en la cavidad peritoneal. Estas evidencias apoyarían la teoría.

Otro argumento a favor sería la asociación existente entre endometriosis y la obstrucción del flujo menstrual que se ha visto en algunas malformaciones müllerianas (Olive and Henderson, 1987), que presentan una alta prevalencia de endometriosis. Incluso un compromiso sutil para la menstruación anterógrada puede predisponer a la endometriosis, como se evidencia en mujeres con septo uterino (Nawroth et al., 2006) y estenosis cervical (Barbieri, 1998), en las que también se encuentra aumentada la prevalencia de esta enfermedad. Del mismo modo, la obstrucción yatrógena del tracto de salida del aparato genital en modelo animal, resulta en lesiones endometriósicas dentro de la cavidad peritoneal (D'Hooghe et al., 1994).

La distribución anatómica de las lesiones endometriósicas también apoya esta teoría. Los implantes superficiales se encuentran localizados con mayor frecuencia en el compartimento posterior de la pelvis y en la hemipelvis izquierda, lo que se explica por la acumulación del flujo menstrual retrógrado en el fondo de saco de Douglas por acción de la gravedad, y en la hemipelvis



izquierda debido al obstáculo que supone el sigma para la difusión del flujo menstrual que proviene de la trompa izquierda, aumentando el intervalo de tiempo para que los fragmentos endometriales implanten en estas zonas (Al-Fozan and Tulandi, 2003; Dmowski and Radwanska, 1984). El útero en retroversión también se ha correlacionado con el hallazgo de endometriosis al permitir el flujo de la sangre menstrual desde el compartimento anterior al posterior (Jenkins et al., 1986).

Sin embargo, aunque se ha demostrado que la menstruación retrógrada sucede en la mayoría de mujeres, solo un pequeño porcentaje de ellas desarrolla endometriosis, lo que sugiere que existen otros factores implicados.

1.6.1.2. TEORÍA DE LA METAPLASIA CELÓMICA.

La endometriosis se originaría mediante un proceso de metaplasia en las células epiteliales celómicas que recubren el peritoneo pélvico (Meyer, 1919). Esta teoría fue propuesta en 1898 por Iwanoff y elaborada por Meyer en 1924. Está basada en el hecho de que el epitelio genital representa distintos grados de diferenciación del epitelio celómico, por lo que su poder de diferenciación frente a estímulos externos sería elevado (Vercellini et al., 2014). Esta teoría explicaría la aparición de endometriosis en cualquier localización de la cavidad abdominal y en la pleura (Foster et al., 1981), así como su diagnóstico en etapa prepuberal en algunos casos (Laufer, 2000).

1.6.1.3. TEORÍA DEL TRANSPLANTE MECÁNICO.

El transplante 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.

Esta teoría es la más aceptada para explicar endometriosis en localizaciones alejadas del peritoneo. Se han hallado células endometriales en vasos sanguíneos y linfáticos (Halban, 1924; Sampson, 1925) que podrían desarrollar endometriosis en lugares a distancia y explicarían los casos de afectación torácica y otras localizaciones extraabdominales (Machairiotis et al., 2013).

1.6.1.5 TEORÍA DE LOS RESTOS EMBRIONARIOS MÜLLERIANOS.

Von Recklinghausen (Von Recklinghausen, 1896) and Russell (Russell, 1899) propusieron que la endometriosis podía provenir de restos celulares embrionarios, lo que justificaría la existencia de endometrio ectópico. Recientemente se ha observado endometrio ectópico en autopsias de fetos femeninos, hecho que apoya esta teoría (Signorile et al., 2010). Un argumento

que cuestionaría la teoría de los restos embrionarios es el momento de aparición de la endometriosis, ya que, teniendo en cuenta esta hipótesis, la endometriosis debería aparecer inmediatamente tras la menarquía; sin embargo, la incidencia de esta patología es mayor en fases más tardías de la edad fértil.

1.6.1.6 TEORÍA DE LAS CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA.

Se trata de la teoría más reciente. Defiende que las células madre circulantes provenientes de la médula ósea podrían diferenciarse en tejido endometrial en distintas localizaciones (Sasson and Taylor, 2008). Tanto esta teoría como las anteriores podrían explicar el extraño hallazgo de lesiones endometriósicas en varones (Giannarini et al., 2006).

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 α), "Macrophage Inflammatory Protein 2" (MIP-2), interleuquina 6 (IL-6), "Tumor Necrosis Factor alpha" (TNF α), 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). Así mismo, 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, invasión, proliferación celular, la neoangiogénesis y la innervación sensorial, simpática y parasimpática. Finalmente esto conllevaría a la progresión de la enfermedad (Falcone y Lebovic, 2011) (Figura1.6.2.2B).

Dada la importancia del sistema inmune en el desarrollo de la endometriosis, será uno de los pilares importantes en el que nos vamos a centrar en nuestro estudio con el fin de valorar si son modificables o no estas condiciones que se encuentran alteradas, sabiendo que son indispensables en la patogenia de esta enfermedad.

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 β -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 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2, 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.

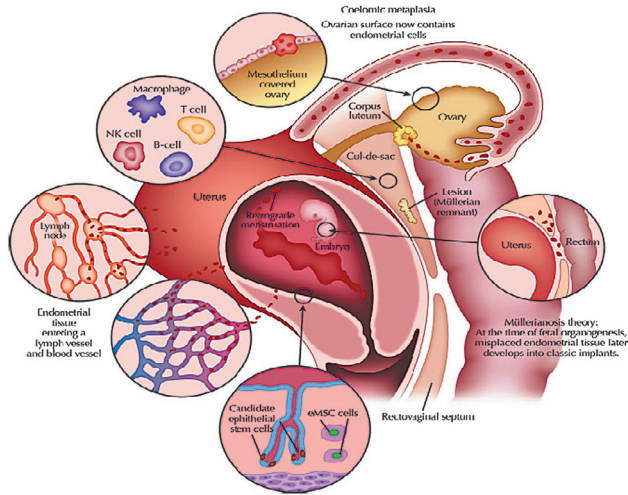


Fig 1.6.2.2A: Mecanismos fisiopatológicos de la endometriosis. Empezando desde abajo, en el sentido de las agujas del reloj: 1) Las células del epitelio endometrial, las células mesenquimales del estroma o las “stem-like cells” evitan los mecanismos de aclaramiento, y atacan e invaden localizaciones 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).

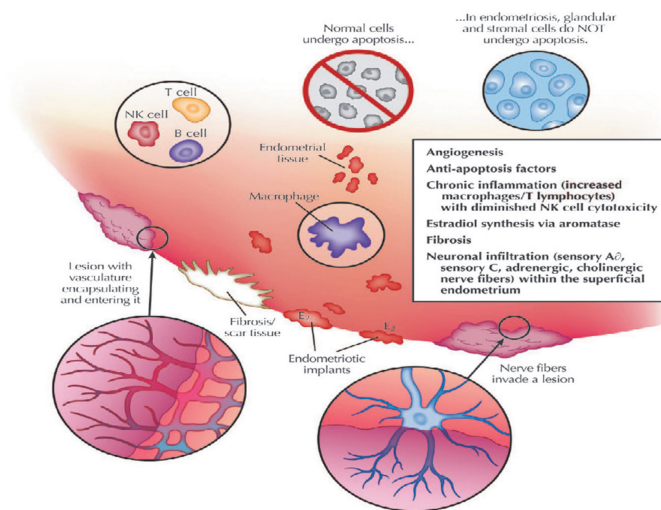


Fig 1.6.2.2B: Mecanismos moleculares que predisponen al desarrollo de la endometriosis. Tomado de Falcone, 2011.

1.7. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico suele ser tardío por la gran variedad clínica así como la posibilidad de evolución asintomática de la enfermedad, pudiendo demorarse varios años desde la aparición de los primeros síntomas (Spaczynski and Duleba, 2003).

Teniendo en cuenta que la endometriosis es una causa mayor de discapacidad y que afecta significativamente a la calidad de vida de las pacientes, este retraso en el diagnóstico puede empeorar el pronóstico de la enfermedad al suponer periodos de tiempo sin tratamiento, en los que la enfermedad puede progresar (Nnoaham et al., 2011).

La visión directa de las lesiones mediante laparoscopia asociada a estudio anatomopatológico se ha considerado como "gold standard" para el diagnóstico de endometriosis, pero se trata de un método invasivo y con costes asociados.

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), disquécia (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 (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).

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 (Wei y cols, 2009; Matsuzaki y cols, 2010).

La fecundación 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 cesáreas 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 sobre todo en el diagnóstico de la endometriosis profunda en el área de los úterosacos, tabique recto-vaginal o recto.

La endometriosis profunda es definida por la presencia de nódulos hipocogénicos con o sin contorno regular. En condiciones normales, la muscularis intestinal es hipocogénica, mientras que se distingue de la mucosa y de la submucosa porque estas son hiperecogénicas; la presencia de nódulos hipocogénicos 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).



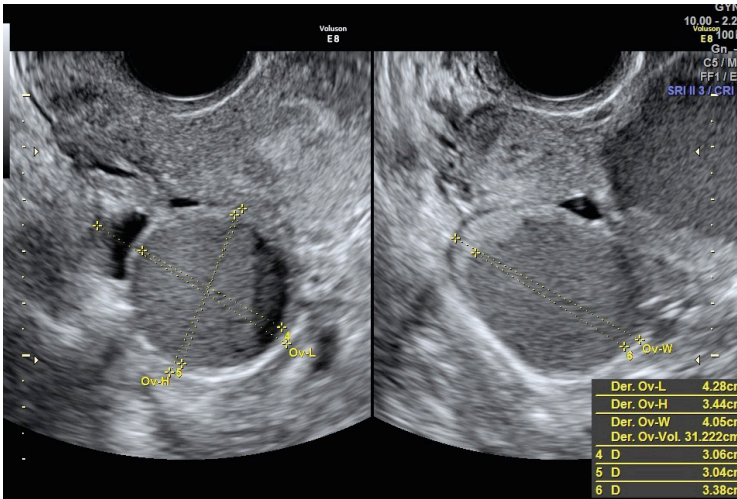


Figura 1.7.3.1.3: Imagen ecográfica en la que se observa una endometriosis ovárica. Servicio de Ginecología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, cortesía de la doctora Susana Martínez Cuenca.

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



Figura 1.7.3.1.4: Imagen de resonancia magnética donde se observa un nódulo endometriósico en la pared vesical. Servicio de Radiología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

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 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-13 y TNF- α) 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- α en líquido peritoneal resultaron discriminativos entre pacientes con o sin endometriosis.

En un estudio realizado por Martínez (Martínez 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. ANTICUERPOS ANTIENDOMETRIALES EN SUERO.

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

1.7.3.2.3. 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. INMUNOHISTOQUÍMIA DE FIBRAS NERVIOSAS

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).

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 aquellas 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 (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). Así mismo, 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.

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 a 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.

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 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 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 las 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 gonadotrofinas 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 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).

1.8.3.4 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 EXPERIMENTALES:

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 β , MMP13, MMP10 y MMP8), así como la disminución de la proliferación de fibroblastos o del MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos).

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 (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. (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 KAPPA (B FN-KB)

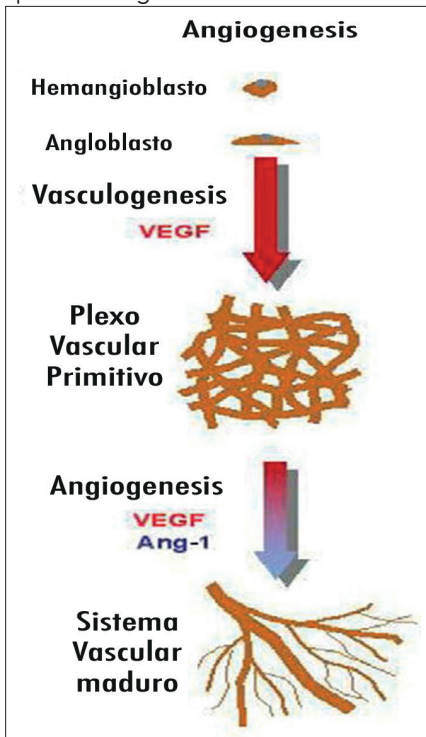
El FN-kB es un factor de transcripción que induce la expresión de muchos de los genes que participan en la respuesta inflamatoria (McKay y cols 1999), y algunos estudios han demostrado un papel importante en el proceso inflamatorio de las células del estroma endometrial en las mujeres con endometriosis (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 proteosoma, 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).

Todos estos compuestos farmacológicos comentados anteriormente para el tratamiento de la endometriosis han resultado ser poco efectivos o no selectivos para la enfermedad produciendo gran cantidad de efectos adversos y requieren ser estudiados previamente en modelos animales para valorar su eficacia. Por

otra parte, desde hace una década, una nueva rama de investigación surgió centrándose en bloquear la angiogénesis como punto diana para lograr la curación de esta enfermedad, antes de comentar los fármacos antiangiogénicos, nos detendremos un momento para explicar el proceso de angiogénesis y su papel en la endometriosis.

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:



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 en 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. Sin embargo, el factor más importante que 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, observando un aumento de la presencia de vasos sanguíneos (Healy y cols, 1998). Finalmente, se ha visto que la endometriosis crece sobre todo 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 de las dianas adecuadas sobre la que dirigir nuestro esfuerzo 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.

1.9.2 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), todo esto sugiere 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). Todo ello apunta hacia el hecho de que la inhibición de la angiogénesis en las lesiones podría resultar en su eliminación y con ello una terapia efectiva, no es de extrañar pues que se haya observado un interés creciente por los fármacos antiangiogénicos en la endometriosis en la última década.

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). 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, todos ellos han demostrado disminuir de forma significativa las lesiones endometriósicas asociada a la destrucción/eliminación de vasos sanguíneos (Nap y cols, 2004). Cabe mencionar eso sí que otros inhibidores de la angiogénesis que no actúan directamente a través de la vía VEGF tales como (TNP-A, Endostatina, Anginex) han mostrado igualmente efectos prometedores en modelos animales, remarcando todavía más el carácter angiogénico dependiente de las lesiones en cuanto a su desarrollo.

Desafortunadamente todos estos fármacos presentan un inconveniente, y son los efectos secundarios que se derivan de su acción, como flebitis, anorexia o astenia, y otros más graves inasumibles en pacientes con endometriosis y, por lo demás, sanas (Via y cols, 2000) como mayor incidencia de eventos hemorrágicos graves (L. Peng y cols, 2014) y un mayor riesgo significativamente estadístico de desarrollar perforación gastrointestinal (K.K. Ciombor y cols, 2014) debido a la inhibición entre otras de la cicatrización y la renovación endotelial posiblemente.

Otras sustancias y fármacos, 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:

1.9.2.1 INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA COX-2.

La ciclooxigenasa (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* (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 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).

1.9.2.2 TÉ VERDE.

La epigalocatequina 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 (Cao y cols, 1999; Tang y cols, 2001). Así mismo, varios estudios experimentales han demostrado que la EGCG presenta un potente efecto antiangiogénico en diversos tipos tumorales (Adhami y cols, 2004; Fassina y cols, 2004), que parecen asociados a un efecto inhibitorio 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).

1.9.2.3 AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

Los agonistas dopaminérgicos ejercen un efecto antiangiogénico al interferir la vía del VEGF/VEGFR2, concretamente a través de su receptor tipo 2, DrD2 (Basu y cols, 2001). Tras demostrarse que agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina y cabergolina eran capaces de revertir el proceso del incremento de la permeabilidad mediado por la sobreexpresión de VEGF/VEGFR2 en el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) (Gomez y cols, 2006), Novella-Maestre y cols decidieron experimentar estos fármacos en un modelo animal heterólogo de endometriosis tras probar la existencia de receptores de dopamina tipo 2 en tejido endometrial humano, tanto eutópico como endometriósico (Novella-Maestre y cols, 2010). En este trabajo se demostró que el uso de Cabergolina (Cb2), producía una disminución del tamaño de las lesiones activas muy discreto y una disminución significativa del índice proliferativo (Novella-Maestre y cols, 2009). Se comprobó que el uso de Cb2 se asociaba a una disminución en la expresión de factores proangiogénicos como VEGF y un aumento de la expresión de marcadores anti-angiogénicos como angiotensina 1.



Finalmente se confirmó que el nivel de fosforilación del VEGFR-2 fue significativamente menor en los ratones tratados, de acuerdo a los hallazgos encontrados en el modelo de SHO anteriormente (Gómez y cols, 2006).

En otro estudio posterior el grupo de Delgado-Rosas (Delgado-Rosas y cols, 2011) empleando el mismo modelo animal que Novella y cols, demostró que otro agonista dopaminérgico D2, la quinagolida era igualmente eficaz en la disminución de lesiones endometriósicas.

Tomando como punto de partida estos experimentos, el grupo del Dr Pellicer (Gomez y cols, 2011) realizó un estudio piloto en humanos, para contrastar el efecto de la quinagolida, sobre las lesiones endometriósicas. A raíz de los resultados obtenidos de este estudio se generó la hipótesis de trabajo que motivó la realización de otro estudio, trabajo de Gomez y cols. donde seleccionaron a un grupo de pacientes con hiperprolactinemia y endometriosis confirmada vía laparoscópica. Durante la laparoscopia inicial se extirparon todas las lesiones a excepción de unas lesiones rojas que se dejaron marcadas con hilo de sutura. Tras el fin de la cirugía se les suministró a las pacientes la quinagolida, como tratamiento de su patología basal. Tras cuatro meses de tratamiento se realizó una segunda laparoscopia exploradora con el objetivo de prevenir adhesiones y se aprovechó para extraer las lesiones que habían sido marcadas 4 meses antes. Puesto que se grabaron ambas cirugías se pudieron determinar mediante análisis de imagen el tamaño de las lesiones antes y después del tratamiento obteniéndose resultados muy interesantes: a nivel macroscópico se evidencia una importante disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas asociada a un incremento en la expresión del DrD2 (receptor de la dopamina tipo 2) en las mismas y una disminución de la expresión del VEGFR2 estadísticamente significativo.

1.9.2.4. INHIBIDOR DE LA FIBRINÓLISIS (INHIBIDORES PAI)

Los inhibidores de los activadores del plasminógeno o PAIs son un grupo de proteínas con actividad inhibitoria sobre la activación del plasminógeno.

Existen tres tipos de PAI, 1, 2 y 3 (Loskutoff DJ y col, 1983; Van Meijer M y Bachmann F, 1995). Siendo el primero de ellos el más relevante en el control de la fibrinólisis.

La actividad fibrinolítica en el tejido endometrial humano es esencial en el proceso de regeneración tisular durante la menstruación (Parrilla JJ y cols, 1972). La actividad plasmínica, regulada por el nivel de inhibidores, determinará la proteólisis de las proteínas de la matriz extracelular, la activación de procolagenasas, y la degradación de diversos componentes de la membrana basal. La progesterona produce una disminución de la actividad fibrinolítica del

endometrio mediante el estímulo de la degradación de Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y el aumento de PAI-1 (Casslen B y cols, 1995).

La cuantificación proteica, mediante técnicas de ELISA, ha evidenciado una mayor concentración de uPA y PAI-1 en endometrio de mujeres con endometriosis que en el endometrio de controles. Estos niveles son todavía mayores al estudiar muestras de tejido endometriósico (Bruse C y cols, 1998). La mayor concentración de uPA en el endometrio de mujeres con endometriosis podría llevar a una anormal degradación del tejido endometrial durante la menstruación.

El sistema fibrinolítico, por tanto, juega un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, como se observó en el trabajo desarrollado en la tesis de la Dra Ana Moreno, donde la inhibición del PAI-1 en un modelo murino inmunocompetente disminuye el tamaño la lesión endometriósica una vez esta se encuentra bien establecida, pero no la elimina completamente, además se observó un descenso de los depósitos de fibrina, de la vascularización y la proliferación.

Atendiendo a esta estrategia, pueden y deben existir otros compuestos con propiedades antiangiogénicas todavía no ensayadas que ofrezcan un potencial papel terapéutico en la endometriosis. De entre todos estos potenciales candidatos nos llamó la atención el pIC-PEI, que por las implicaciones que tiene en el desarrollo de esta tesis, merece un apartado para describir sus características.

1.10. ÁCIDO POLINOSINA-POLICITIDÍLICO (PIC O POLYI: C)

El ácido polinosina-policitidílico (pIC) es un ácido de doble cadena ARN sintético descrito hace más de 4 décadas (Field AK y cols, 1967), y conocido por poseer actividades antitumorales en roedores inmunocompetentes por medio de la inmunomodulación de la vía del interferón (Levy HB y cols, 1969).

pIC induce la secreción de interferón (IFN- β) e induce a las células natural killer (NK) y a linfocitos citotóxicos T para activar la inmunidad antitumoral (Huang YK 2013). También detiene directamente el crecimiento del tumor e induce la apoptosis de las células cancerosas humanas (Harashima 2012) mediada por macrófagos, citoquinas y quimiocinas.

Fisher y cols en 1972 revelaron que la regresión inducida por pIC del crecimiento del tumor también podría lograrse en ratones irradiados, se ha demostrado que la actividad antitumoral de poli I: C es equivalente en animales inmunocompetentes y completamente inmunosuprimidos (Kreider, J. W 1972). Este hallazgo sugirió que la actividad antitumoral de pIC podría ser ejercida por medio de efectos no inmunoestimulantes adicionales.

Por otra parte también se detectó que su acción antitumoral se llevaba a cabo en parte por su acción antiangiogénica, reflejándose desde hace décadas en numerosos estudios como el de Blumberg. N y cols en 1973, donde los autores



mencionan la posibilidad de que poly I: C actúe directamente sobre los vasos sanguíneos y afecte al suministro de sangre del tumor. Así pues, muchos de los cambios patológicos atribuidos a la toxicidad de pIC parecen ser efectos del agente sobre el endotelio vascular (Gresser, I y cols 1972), y también se evidenció en el estudio de S. Fischer y cols en 2009, que producía cambios en la permeabilidad vascular.

Esta potente actividad antitumoral y antiangiogénica en animales alentaron los ensayos clínicos, en los que pIC no mostró, sin embargo, ningún efecto detectable (Levine AS y cols 1979, Robinson RA y cols 1976).

Esta aparente paradoja, que causó durante un periodo de tiempo el abandono de su estudio, encontró sin embargo, una explicación mediante el estudio de Tormo y cols en 2009 donde los autores demostraron que pIC no mostraba aparente actividad cuando se administraba desnudo, en cambio, sí que se mostraba como elemento activo cuando se unía con PEI, por lo que los autores concluyeron, que no es que pIC no fuera efectivo, sino que para que tuviera un efecto notable debía encapsularse para que llegara a las células, pues de lo contrario era destruido antes de que pudiera ejercer sus acciones y expresar su efecto. Esto fue demostrado con un modelo de ratón de melanoma donde se reveló que mediante la complejación de pIC con un vehículo, tal como polietilénimina (PEI), el complejo pIC-PEI inducía la apoptosis selectiva en células malignas promoviendo la hiperactivación de la autofagia en ellas. Debido al hecho de que no había muerte tumoral cuando se administraba sin vehículo, en lugar de ser administrado en complejo pIC-PEI, se hizo evidente que con PEI, sí que presentaba actividad antitumoral (Alonso-Curbelo y cols 2010).

Posteriormente, varios ensayos clínicos utilizando pIC-PEI para el tratamiento de los cánceres malignos han sido recientemente lanzados de nuevo con resultados prometedores (Pollack IF y cols, Salazar AM y cols, 2014) desde el descubrimiento del vehículo en forma de liposomas o policonjugados, el cual fue indispensable para favorecer la captación endosómica y la liberación citosólica de pIC in vivo (Fujimura T y cols 2006) y poder ejercer sus acciones a nivel celular.

En otros estudios se observó que este compuesto, que activa la inmunidad celular para luchar contra la progresión del cáncer, se consideró un potente adyuvante para tratar el melanoma (Salem 2005), cáncer de pulmón metastásico (Forte G 2012) y cáncer de cuello uterino (Cui Z 2006).

Esta acción contra diversos cánceres se debe en mayor medida a su acción antiangiogénica quedando reflejada en el estudio Zhongying Guo y cols de 2011, donde en su experimento se observó la disminución de vasos sanguíneos en carcinoma hepatocelular. Además el hiltonol, un análogo de polyI: C ha sido estudiado en un ensayo clínico en fase II y se mostró efectivo como una terapia

adyuvante contra el melanoma, cáncer de próstata y cáncer de mama (Aranda F 2012 y Vacchelli E 2013).

Estudios posteriores revelaron que la supresión de la angiogénesis de manera selectiva por la estimulación del receptor de membrana celular Toll-like 3 podría justificar los efectos terapéuticos de pIC en el tumor de animales inmunodeprimidos (Kleinman ME y cols 2008, Bergé M y cols 2010).

Así pues, deducimos que utilizando el complejo pIC-PEI, para que pueda ser completamente activo y pueda ejercer los efectos antiangiogénicos ya conocidos en publicaciones anteriores, puede ser un compuesto efectivo también en otra enfermedad en la que no se ha estudiado como es la endometriosis y como posible tratamiento para estas pacientes, siendo muy importante elegir un compuesto con baja toxicidad.

En consonancia con esto, observamos un perfil tóxico favorable detectado en el estudio de Field, A. K y cols 1968 donde aparentemente, poly I: C presentó un grado de baja citotoxicidad, también se observó esta baja toxicidad en ensayos humanos preliminares (Lampson, G. P. y cols 1972). Además Freeman Al y cols en 1977, con un ensayo en humanos quedó de manifiesto que su toxicidad consistió en fiebre en 21 de 24 pacientes, ligera elevación de las enzimas hepáticas en 8 de los 24 pacientes y anomalías de laboratorio de la coagulación en 9 pacientes. Las anomalías de la coagulación aparecieron linealmente relacionadas con la dosis utilizada. Todas estas anomalías eran reversibles, y ninguna fue considerada severa o grave ni mucho menos potencialmente mortal.

Además del efecto negativo sobre la proliferación celular y la inducción de la apoptosis o muerte celular programada que se ha visto evidenciada en la literatura mencionada anteriormente, la capacidad antiangiogénica es una de las acciones más importantes que posee este compuesto sintético, que presenta según las publicaciones baja toxicidad, por lo que resulta ser un candidato muy prometedor para el tratamiento de la endometriosis donde nunca se ha evaluado, por lo que hace necesario previamente el ensayo en modelos preclínicos en animales donde testar su eficacia.

Debido a las similitudes en términos de aumento de la angiogénesis e inhibición de la apoptosis entre el cáncer y la endometriosis (Pollacco, J y cols 2012), nos hemos planteado la posibilidad de que pIC-PEI puede ser una herramienta terapéutica para tratar también esta última enfermedad.

Además nuestros hallazgos recientes sugieren que, cuando se usa para tratar tumores benignos como leiomiomas, también puede lograr efectos proapoptóticos y anti-angiogénicos específicos en la vasculatura patológica (García-Pascual CM y cols 2016).



Es una hipótesis fascinante que piC-PEI pudiera ser efectivo en el tratamiento de la endometriosis bloqueando la angiogénesis, pero para poder probarlo requiere como primer escalón estudios experimentales en animales. A continuación se explicarán los modelos animales óptimos y más utilizados en el estudio de esta enfermedad.

1.11. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ENDOMETRIOSIS

Existen numerosos grupos de investigación inmersos en el estudio de nuevas terapias, haciendo uso de modelos animales (Delgado-Rosas y cols, 2011; Becker CM y cols, 2006; Ricci AG y cols, 2011; Ozer H y cols, 2013). Dentro de estos, los más atractivos como veremos posteriormente son los modelos murinos que permiten el seguimiento no invasivo del desarrollo de la enfermedad.

A pesar de que la endometriosis sólo aparece de manera espontánea en algunos primates (entre ellos los humanos), puede ser inducida en roedores. Las ventajas que presentan los modelos en roedores son su bajo coste, el gran conocimiento de la biología de estos animales, la facilidad para inducir lesiones similares a la endometriosis, la posibilidad de usar animales transgénicos y la capacidad de realizar ensayos con un alto número de individuos. (Becker y cols, 2006; Fortin M y cols, 2004; Fortin M y cols, 2003).

Sin embargo también cuentan con una serie de inconvenientes, como son las diferencias en la fisiología de la reproducción (ausencia de ciclo menstrual entre otras), la lejanía filogenética con nuestra especie y la posibilidad de que los fármacos evaluados tengan distintos efectos en roedores que en humanos. En función de cómo induzcamos dicha enfermedad, hablaremos de modelos homólogos o heterólogos, los cuales describiremos a continuación.

1.11.1. MODELOS MURINOS HETERÓLOGOS

Los modelos heterólogos se obtienen al implantar, en un animal inmunodeprimido, una porción de biopsia endometrial de una donante de origen humano. Aunque la tasa de implantación ronda el 30%, esta puede elevarse al 100% cuando los implantes son cosidos o pegados.

Tradicionalmente, los ratones más ampliamente utilizados en este tipo de estudios han sido los atímicos (Nude-NU), que carecen de células T maduras. Sin embargo, a pesar de ser ratones inmunodeprimidos, los implantes no son capaces de progresar más allá de la cuarta semana, ya que a partir de la tercera semana se pueden observar linfocitos en el tejido extraño (Grummer R y cols, 2001). Con el fin de evitar estos problemas, se han empleado ratones con un sistema inmune todavía más deprimido, como son los ratones SCID (severe combined

immunodeficient) o los ratones (NOD)-SCID (non-obese diabetic severe combined immunodeficient), que carecen tanto de células T como de células B funcionales. En estos ratones severamente inmunodeprimidos, la tasa de implantación es mayor que en los ratones atímicos y los implantes son funcionales durante más de 4 semanas (Grummer R y cols, 2001) Posteriormente, se desarrollaron los ratones NOD/SCID/ γ Cnull(NOG) que son además deficientes en células NK. Con este modelo, el grupo de Matsuda-Sawada, consiguió inducir un ciclo menstrual de 28 días mediante el suministro de hormonas a ratonas ovariectomizadas (Matsuura-Sawada R y cols, 2005). Por otra parte, en 2004, Greenberg y Slayden utilizaron un ratón knockout [RAG-2/ γ (c)KO] deficiente tanto en linfocitos B y T como en células NK funcionales. En este modelo fueron capaces de inducir endometriosis y además mimetizar cuatro ciclos menstruales consecutivos mediante la administración de estrógenos y progesterona (Greenberg LH, Slayden OD, 2004). Este tipo de modelo se emplea principalmente para testar compuestos farmacéuticos y para estudiar la angiogénesis de las lesiones endometriósicas.

Entre las ventajas que presentan frente a los modelos homólogos se encuentran el uso de endometrio humano para el desarrollo de las lesiones y la capacidad para realizar estudios más o menos largos.

El empleo de modelos heterólogos se ha popularizado a raíz de la introducción de la monitorización no invasiva de los mismos gracias al uso de fluorescencia inducida por la infección del tejido previo a su implantación con virus modificado genéticamente a tal fin. La principal limitación de estos animales es que al carecer de sistema inmune completo no permiten evaluar en su total complejidad el papel que el sistema inmunitario pudiera tener sobre la endometriosis.

1.11.2. MODELOS MURINOS HOMÓLOGOS

Los modelos homólogos para endometriosis se obtienen al implantar una pequeña porción de cuerno uterino murino en la cavidad peritoneal o en el asa intestinal del mismo animal (autólogo) o de un individuo singénico. Generalmente los animales receptores son ovariectomizados y tratados con estrógenos exógenos a fin de permitir un aporte continuo de estradiol que no favorezca la viabilidad y crecimiento del implante a la vez que evita diferencias estrogénicas entre animales. Para estos estudios se pueden utilizar animales inmunocompetentes. Entre las ventajas con las que cuentan los modelos homólogos para endometriosis se encuentra la capacidad de emplearlos para estudios largos (ya que no presentan rechazo a los implantes) y la no dependencia de las donaciones de endometrio humano. Además la expresión



de citoquinas y quimoquinas de los implantes endometriósicos es similar a la de la endometriosis humana (Umezawa M y cols, 2012). Sin embargo, el principal inconveniente que presenta este tipo de modelo es lo poco fisiológico que resulta en comparación con el humano como por ejemplo que los roedores no menstrúan sino que tiene ciclos estrales de descamación, a diferencia de lo que ocurre en el humano.

Así pues resulta bastante complejo la interpretación de los resultados en estos modelos animales ya que la fisiología del tejido murino no refleja la fisiología del endometrio humano. Además el "pseudoendometrio" murino no suele separarse del miometrio para realizar los implantes. Teniendo en cuenta que las lesiones endometriósicas humanas carecen de tejido muscular, se impone de nuevo de manifiesto la escasa representatividad fisiológica entre el modelo humano homólogo y el humano.

1.11.3. JUSTIFICACIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL CON USO DE MODELO HETERÓLOGO MURINO Y DEL COMPUESTO pIC PARA VALORAR SU EFECTO EN ENDOMETRIOSIS EN EL PRESENTE TRABAJO.

Llegados a este punto ya contamos con todos los elementos necesarios para plantear el estudio de nuestro interés como son a) la existencia de modelos animales de endometriosis y b) una hipótesis de trabajo atractiva sustentada en la esperada efectividad selectiva sobre la vascularización patológica y a nivel celular, del que esperamos prometedoras acciones.

a) Elección de un modelo animal adecuado: Para llevar a cabo el estudio creemos que un modelo murino heterólogo es preferible al homólogo principalmente porque la fisiología se asemeja en mayor grado a la enfermedad humana por lo que los resultados obtenidos pueden ser más fácilmente interpretables y extrapolables. Así mismo, las metodologías de monitorización no invasiva están mejor desarrolladas en este modelo que en el homólogo con lo que la fiabilidad metodológica a la hora de llevar a cabo el experimento y con ello la obtención de resultados y conclusiones es mayor.

b) Una hipótesis de trabajo atractiva: Alentado por la eficacia del compuesto pIC-PEI y la existencia de una proliferación celular y vasculatura patológicamente desregulada en la endometriosis (Nap AW y cols 2004), se trataría de evaluar las capacidades terapéuticas del compuesto pIC-PEI en el tratamiento de esta enfermedad, así como obtener nuevas terapias menos tóxicas e igual de efectivas.

Nuestros esfuerzos y los resultados obtenidos en nuestros intentos por evaluar la eficacia del compuesto pIC-PEI en la endometriosis se describen a continuación.



2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

A thick, dark red horizontal bar located directly beneath the title text.



2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Planteamos que el compuesto pIC una vez complejo con PEI ejercerá acciones de destrucción de lesiones endometriósicas ectópicas y que estos efectos vendrán mediados por las acciones antiangiogénicas del compuesto manifestadas con un descenso de la vascularización y la proliferación celular y un incremento de la apoptosis.



3. OBJETIVO





3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar el potencial terapéutico del ácido polinosin-policitídílico, en el tratamiento de la endometriosis en un modelo animal murino heterólogo mediante la determinación de su efecto sobre el tamaño de las lesiones.

3.2. OBJETIVO SECUNDARIO

Evaluar si la acción de pIC-PEI cursa con afectación de parámetros asociados a la angiogénesis en las lesiones de los animales.



4. MATERIAL Y MÉTODO

A thick, dark red horizontal bar located below the title text, extending across the width of the text area.



4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO.

El diseño experimental creado para acometer nuestro objetivo se describe a continuación, a fin de que el lector pueda ubicar con mayor precisión la racionalidad de los protocolos experimentales que se desarrollan en este apartado:

Para evaluar la hipótesis de partida en el ámbito de nuestro proyecto se procedió a implantar fragmentos de endometrio humano previamente marcado con proteína fluorescente mCherry en tejido peritoneal de ratones hembra. Durante varias semanas se procedió al tratamiento mediante piC-PEI o placebo a las hembras receptoras determinándose a tiempo real los efectos sobre el tamaño de la lesión mediante monitorización no invasiva de la fluorescencia emitida por las lesiones marcadas. Al final del experimento se sacrificaron los animales y se procedió a extirpar las lesiones para valorar sobre éstas los efectos de piC-PEI o placebo sobre parámetros asociados a angiogénesis mediante inmunofluorescencia (IF).

En concreto nosotros utilizamos 30 ratones hembra (n=30) inmunodeprimidas, previamente ovariectomizadas y con tratamiento hormonal sustitutivo, sobre las que se asentó al menos 1 fragmento de tejido endometrial obtenido de mujeres sanas, previamente marcado con proteína fluorescente mCherry antes de su implantación.

Tras el obligado tiempo de recuperación de la cirugía implantatoria, que se prolongó una semana, se separaron los ratones hembra en grupos de 10 animales, generando un total de 3 grupos acorde al número de intervenciones farmacológicas a ensayar y que se corresponden a la administración de piC-PEI en nuestro grupo experimental, placebo en el grupo control y un compuesto anti-VEGF en el grupo control experimental a fin de determinar efectos comparativos sobre las terapias antiangiogénicas de referencia.

Durante el curso de 4 semanas se monitorizó de manera no invasiva el tamaño de los fragmentos implantados a partir de la cuantificación de la fluorescencia emitida por la proteína de marcaje.

La monitorización de la señal se obtuvo mediante un aparato IVIS acoplado a un aparato de anestesia inhalatoria.

La cuantificación de la señal inmunofluorescente se determinó mediante software asociado a un microscopio Nikon Eclipse E400.

Al finalizar la monitorización se procedió al sacrificio de los animales y obtención de las lesiones endometriósicas las cuales se sometieron a IF a fin

de identificar marcadores específicos de vascularización: anticuerpos contra una molécula de adhesión plaqueta-endotelio (PECAM) y alfa-actina del músculo liso (α -SMA; un marcador de la capa muscular presente en los vasos maduros) lo utilizamos para detectar la vascularización y estimar la neovascularización.

Las células proliferativas se detectaron por medios de inmunotinción contra Ki-67 y la apoptosis (TUNEL) se evaluó con el uso de macros específicos creado con Image Pro Plus (Media Cybernetics).

La existencia de diferencias significativas entre los tres grupos se evaluó estadísticamente mediante test no paramétricos atendiendo a la distribución homogénea o no de los datos obtenidos.

4.2.- GENERACIÓN DEL MODELO MURINO HETERÓLOGO DE ENDOMETRIOSIS.

4.2.1 PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES RECEPTORES.

La cepa que se utilizó como receptora de implantes endometriósicos humanos fue la $Crl:CD1-Foxn1^{nu}$, desarrollado a partir de la transferencia del gen nude de $Crl:NU-Foxn1^{nu}$ a un ratón CD-1[®] a través de una serie de cruces que comenzó en 1979 en los laboratorios Charles River, Wilmington, MA.

Este ratón carece de timo, no puede producir células T y, por lo tanto, es inmunodeficiente.

Al carecer de pelo como se observa en la imagen ilustrativa Figura 4.2.1, se trata de una cepa ideal para la monitorización de la señal fluorescente, puesto que carece de folículo piloso que absorbe la fluorescencia y por tanto entorpece la detección de señal de este tipo.



Figura 4.2.1: Ratón de la cepa $Crl:CD1-Foxn1^{nu}$. Imagen sacada de la página web oficial de Charles River.

Así pues, un total de 30 ratones hembra atímicos de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories International) se utilizaron en este estudio. Los ratones se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos, con un ambiente con horas controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad), temperatura (26°C) y humedad relativa (55 ± 10%), con libre acceso a comida (en formato pellet) y bebida.

Todas las manipulaciones se realizaron en campanas filtradas de flujo laminar.

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado de Animales en la Universidad de Valencia, de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por las legislaciones española y europea (Real Decreto 1201/2005, B.O.E. 252, 10 de Octubre de 2005 104 y el Convenio Europeo 1-2-3, 18 de marzo de 1986).

Para evitar variaciones en los niveles fluctuantes de las hormonas, los animales fueron ovariectomizados, dicha intervención se hizo bajo anestesia inhalatoria (5% isoflurano para inducción, y 2% para mantenimiento), previa administración de analgesia (buprenorfina, 0,1 mg/kg), con el fin de reducir al mínimo el sufrimiento animal.

Tras la ovariectomía estas ratonas fueron sometidas a tratamiento hormonal con el fin de mantener los niveles de hormonas en sangre estables, y que tuvieran efecto similar en todos los animales sobre los implantes, con un tratamiento durante 60 días con cápsulas de liberación retardada que contienen 18 mg de 17β-E2 (Innovador Research of America) colocado debajo de la piel del cuello de los ratones ovariectomizados.

Una semana después de la cirugía, dos fragmentos de endometrio humano marcados con mCherry (aproximadamente de 3-5 mm³ de tamaño) se fijaron en el peritoneo parietal de cada animal con el uso de un adhesivo de cianoacrilato de n-butil-éster (3M Animal Care).

Para realizar dicho trasplante, los animales fueron anestesiados mediante isoflurano y con la ayuda de unas pinzas se consiguió la implantación.

Para permitir una distribución homogénea del tejido humano, cada biopsia (n = 2) contribuyó al injerto de un fragmento por ratón.

4.2.2 OBTENCIÓN DE TEJIDO DONANTE A PARTIR DE MUESTRAS DE ENDOMETRIO HUMANO.

La muestra endometrial se obtuvo mediante aspirado intrauterino con cánula de Cournier transcervical (Prodimed, Neuilly-en-Thelle, Francia).

El uso de muestras de tejido humano fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario La Fe.

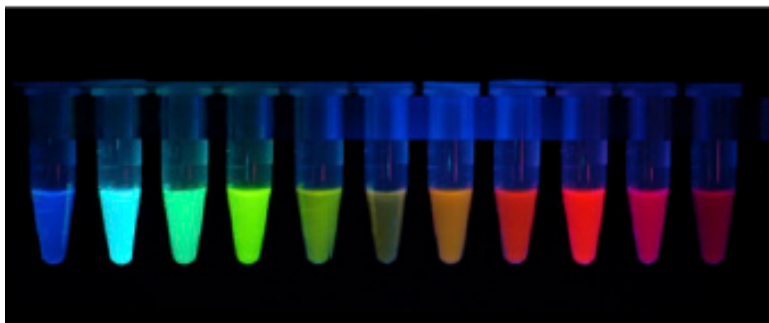
Todas las pacientes dieron su consentimiento por escrito para la obtención de biopsias de tejidos endometriales cuando estaban acabando fase proliferativa tardía o en fase secretora temprana, en pacientes que iban a someterse a un procedimiento esterilización tubárica definitiva. Eran mujeres entre 18 y 38 años, sin patología ni medicación, que no tomaban anticonceptivos hormonales en los últimos 3 meses. No se podía obtener muestra endometrial de las mujeres que no entendían o no firmaban el consentimiento informado y que no cumplían los requisitos descritos anteriormente.

Las muestras de endometrio recogidas de las pacientes (n=4) sometidas a esterilización tubárica definitiva, se cultivaron inmediatamente en medio de mantenimiento (medio M199; Gibco) que contiene un 10% de suero bovino fetal (FBS), antibiótico antimicótico solución (Gibco) y 10 mmol/L N-2-ácido hidroxietilpiperazina-N0-2-etanosulfónico (HEPES) y transportada en hielo al laboratorio.

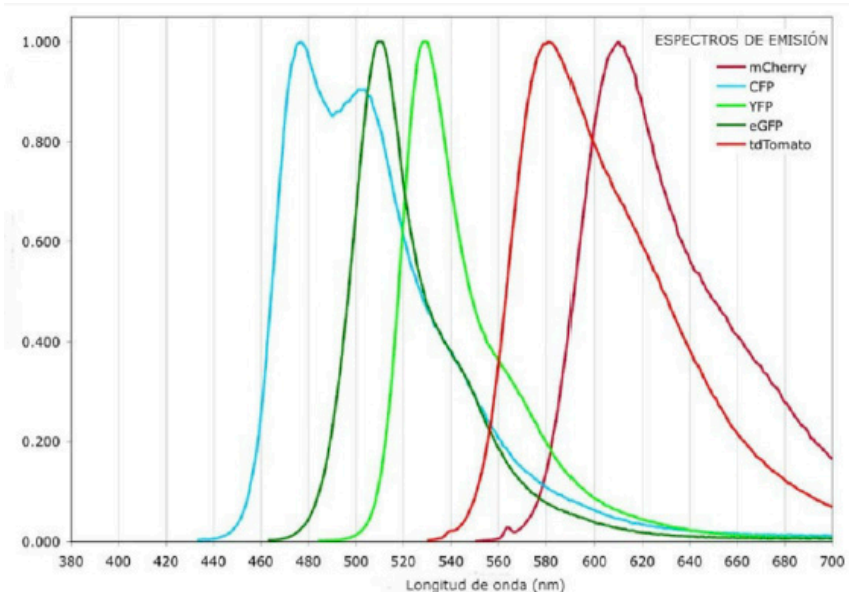
Las biopsias con aspecto laxo y/o gran cantidad de moco fueron descartadas (n = 2). Las biopsias con una apariencia óptima (n = 2) fueron colocadas en una Placa de Petri de 10 cm, cortadas en trozos de 5-10 mm³ con un bisturí, y perforadas cuidadosamente con una jeringa de 27 G para aumentar la cantidad de superficie del tejido expuesto. A continuación, las piezas de tejido se colocaron en placas de 96 pocillos (2-3 fragmentos por pocillo) y lavaron dos veces con medio M199 sin antibiótico.

4.2.3 MARCAJE CELULAR DE ENDOMETRIO MEDIANTE ADENOVIRUS RECOMBINANTE.

Una manera actual ampliamente utilizada para marcar células de interés para su posterior localización o seguimiento consiste en la introducción en las mismas de genes que codifican para proteínas fluorescentes, como es el caso de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green Fluorescent Protein), todas las derivadas de la misma (CFP, del inglés Cyan Fluorescent Protein; YFP, del inglés Yellow Fluorescent Protein) y mCherry entre otras.



A



B

Figura 4.2.3A-B: Ejemplos de proteínas fluorescentes empleadas.

- A) Se muestra la fluorescencia debida a distintas proteínas fluorescentes.
 B) Se muestran los espectros de emisión de 5 de las proteínas fluorescentes más empleadas en el campo de la investigación.

Existen básicamente tres técnicas de transferencia génica en células de mamífero:

- El método del fosfato cálcico: Se utiliza principalmente cuando se busca una expresión transitoria del gen de interés, aunque es muy ineficiente.
- La microinyección: Se basa en realizar una fertilización y, previamente a la fusión de los pronúcleos, inyectar la construcción de DNA en el pronúcleo masculino. Se utiliza principalmente para conseguir la expresión de una determinada proteína en todo un organismo.
- Empleo de virus como vectores: Se trata del método más eficaz para la transferencia de genes a células de mamíferos, y es el que se decidió emplear en la presente tesis doctoral, razón por la cual se procede a explicar con más detalle a continuación.

Como parte de su ciclo replicativo, los virus atacan a las células huéspedes introduciendo en las mismas su material genético.

Este material genético contiene instrucciones básicas sobre cómo producir más copias virales, secuestrando a la maquinaria celular. Bajo dichas instrucciones las

células huésped producen copias adicionales del virus que pueden infectar a nuevas células y así sucesivamente. Algunos tipos de virus, de hecho, introducen físicamente sus genes en el genoma de la célula huésped, donde residen hasta el momento de la muerte de dicha célula. Debido a estas particularidades, los virus pueden ser utilizados como vehículos para introducir genes de interés en células humanas, de animales o de plantas (Tom Maniatis 1982).

No obstante, dicha explotación de los virus como vectores de genes requiere de la modificación genética del genoma viral para eliminar todos aquellos genes responsables de la patogenicidad de los mismos. Dichos genes, son reemplazados por los genes de interés, es decir, aquellos genes que una vez dentro de la célula diana producen el efecto o efectos deseados (por ejemplo, la expresión de una proteína fluorescente por parte de la célula diana).

Actualmente, los dos tipos de virus más ampliamente utilizados como vectores son los retrovirus y los adenovirus, si bien otros virus pueden ser utilizados con tal fin (virus adeno-asociados, lentivirus, herpes virus, etc.). Los adenovirus son capaces de infectar células en división y células en no división y no integran sus genes en el genoma celular. Estas características determinan que se utilicen como vectores para introducir genes de interés en células en división y en no división cuando se desea una expresión transitoria de dichos genes en la célula diana. Los retrovirus, por su parte, sólo son capaces de infectar a células en división e integran sus genes en el genoma celular, por lo que su empleo como vectores lleva a una expresión estable del gen o genes de interés en la célula huésped.

En esta tesis doctoral se ha recurrido al empleo de un vector adenoviral de tipo 5, porque permite infectar células que no están en división y debido a su pequeño tamaño permite una tasa de infección más elevada que otros candidatos como los lentivirus cuya tasa de infección es casi nula. Estos vectores virales han sido empleados para conseguir el marcaje fluorescente de tejido endometrial humano en un modelo murino heterólogo, marcaje que posibilita su *seguimiento in vivo*. En el genoma del adenovirus ha sido introducido el gen que codifica para mCherry, una proteína fluorescente roja. mCherry es un fluoróforo (una proteína fluorescente) que se utiliza en biotecnología como marcador para seguir el flujo de fluidos, como un marcador cuando se etiqueta a moléculas y componentes celulares. mCherry y la mayoría de las proteínas fluorescentes rojas se derivan de la proteína drFP583 (comúnmente conocida como DsRed) aislada de las anémonas de mar *Discosoma*, mientras que otras proteínas fluorescentes en el rango verde son a menudo variantes de las medusas GFP. DsRed es un tetrámero que se excita de forma óptima a 558 nm y tiene un máximo de emisión a 583 nm. Sin embargo, la maduración de DsRed es lenta y continúa a través de una etapa



de cromóforo intermedio donde la mayor parte de la emisión de fluorescencia ocurre en la región espectral verde.

Mediante la extensa mutagénesis de la DsRed tetramérica, la proteína mCherry monomérica se obtuvo con un tamaño más pequeño y una maduración más rápida y una mayor fotoestabilidad. mCherry a veces se prefiere a otros fluoróforos debido a su color, así como su fotoestabilidad en comparación con otros fluoróforos monoméricos. La 'm' en el nombre denota su configuración de monómero, que puede ser de importancia en el diseño experimental (otras variantes pueden estar prefijadas con 'td' para tándem-dímero, por ejemplo).

El mCherry recombinante se expresa y purifica a partir de *E. coli* transformada. La proteína es un monómero de 28,8 kDa de 236 aminoácidos con un pico de excitación fluorescente y emisión a 587 nm y 610 nm, respectivamente. Es estable y resistente al photobleaching. Madura rápidamente lo que permite visualizarlo poco después de la traducción.

4.2.3.1 AMPLIFICACIÓN DEL ADENOVIRUS RECOMBINANTE AD-MCHERRY Y DETERMINACIÓN DE PARTÍCULAS VÍRICAS.

En primer lugar, se sembraron células HEK293 FT (Invitrogen) en frascos de cultivo T175 con medio DMEM-F12 conteniendo un 10% de FBS, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), 1 nM de piruvato sódico MEM (Invitrogen), 500 µg/ml de geneticina (Invitrogen) y 6 mM de L-Glutamina (Invitrogen). En dicho medio se incubaron durante 24-48 h a 37 °C hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. A continuación, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco con el adenovirus Ad-mCherry (1767, Vector Biolabs), a una concentración de 5-10 UFP/célula. Se incubaron las células durante 3-4 días a 37 °C, observando los efectos citopáticos, así como el grado de levantamiento de las células, dos veces al día.

Cuando el 80% de las células se habían despegado, la suspensión se transfirió a tubos limpios y se centrifugó a 100 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA), almacenándose el sobrenadante a -80 °C.

El pellet se resuspendió en un volumen final de 10 mL y se lisaron las células del mismo mediante tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación.

Finalizados estos tres ciclos, las células se centrifugaron a 800 g durante 10 min para precipitar los restos. Se descartó el pellet y se recolectó el sobrenadante, que se alicuotó y se guardó a -80 °C.

Para establecer la concentración de partículas víricas infectivas tras la amplificación del Ad-mCherry se empleó el *QuickTiter Adenovirus Titer ELISA Kit* (Cell Biolabs) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se suspendieron células HEK293 FT en medio de cultivo y se sembraron en una placa de 96 pocillos

en la que se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 1 h. A continuación, se prepararon diluciones seriadas de un control positivo Ad-β-galactosidasa y del Ad-mCherry amplificado en el paso anterior, y se añadieron a los pocillos de la placa, incubándola a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 días. Para asegurar la exactitud de las medidas, cada dilución se ensayó por duplicado. Tras dicha incubación, se desechó el medio y las células se fijaron añadiendo metanol frío e incubando 20 minutos a -20 °C. Posteriormente, se realizó un bloqueo de 1 h con 1% de BSA en PBS a TA y en agitación.

Finalizado dicho bloqueo, se realizó una incubación de 1 h a TA y en agitación con un anticuerpo frente a los hexones de los adenovirus. Seguidamente, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h a TA y en agitación. Por último, se añadió a los pocillos tetrametil bencidina atemperado y se incubó durante 5-10 min, deteniéndose la reacción con la solución de *stop* y midiendo la densidad óptica a 450 nm en cada uno de los pocillos. La concentración de partículas virales infectivas se determinó a partir de la curva estándar construída con los valores de absorbancia de las distintas diluciones del Ad-β-galactosidasa empleado como control positivo.

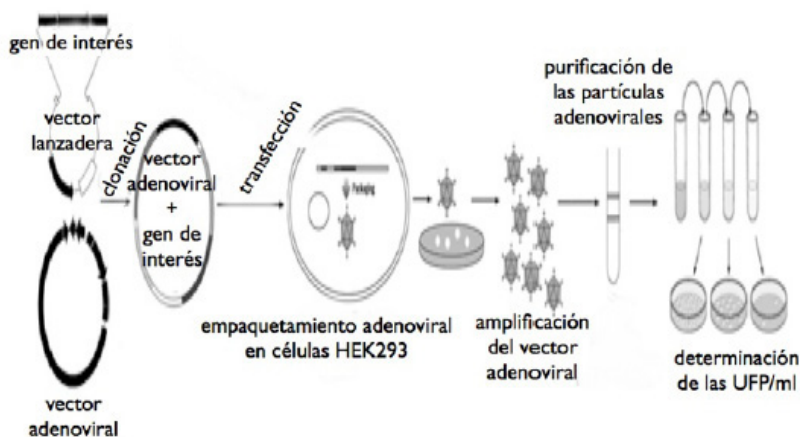


Figura 4.2.3.1: Proceso de construcción de vectores adenovirales. Imagen modificada de la página web www.vectorbiolabs.com

4.2.3.2 TRANSFECCIÓN ADENOVIRAL EN FRAGMENTOS DE ENDOMETRIO

Para realizar el marcaje los fragmentos endometriales se incubaron con Ad-mCherry en medio DMEM-F12 sin antibióticos (medio DMEM-F12 con un 10% FBS) a una concentración de 1 10⁸ UFP/ml (concentración que observamos en estudio piloto previo siendo la idónea para una mayor tasa de infección sin comprometer

la viabilidad el tejido implantado) durante 8 h a 37 °C, 5% de CO₂ y en agitación. Tras dicha incubación, el tejido se lavó con medio DMEM-F12 (1x10⁸ PFU / ml) diluido en DMEM F-12 dos veces que contiene 1% de antibióticos (estreptomicina y penicilina), fungizona (1 mg / ml) (Gibco) y 10% de FBS, y se comprobó el marcaje fluorescente del mismo con el uso de un microscopio invertido (Eclipse; Nikon), utilizado para seleccionar 40-50 fragmentos endometriales por cada biopsia que presentaron la señal óptima para el posterior injerto en el animal.

4.2.4 IMPLANTACIÓN DEL TEJIDO DONANTE EN RECEPTORES

La cirugía de implantación, consistió en fijar dos fragmentos de endometrio humano marcados con mCherry (aproximadamente de 3-5 mm³ de tamaño) en el peritoneo parietal de cada animal con el uso de un adhesivo de cianoacrilato de n-butil-éster (3M Animal Care).

Para realizar dicho trasplante, los animales fueron anestesiados mediante isoflurano, posteriormente se realizó una pequeña incisión en el abdomen para poder acceder al peritoneo de la pared abdominal y con la ayuda de unas pinzas se consiguió la implantación.

Tras lo cual se suturó la pared abdominal, el procedimiento transcurrió sin complicaciones en todas las ratonas.

4.2.5 INTERVENCIONES FARMACOLÓGICAS

Una semana después de la implantación de los fragmentos de endometrio humano, los animales se dividieron en tres grupos (n = 10 por grupo) y se administraron a través de la vena de la cola inyecciones de 100 µl de agua MilliQ que contenían a) 0,6 mg / kg del compuesto anti-VEGF CBO-P11 (grupo control positivo), b) 0.6 mg / kg de pIC-PEI (grupo experimental) o c) únicamente el agente acuoso vehiculante (agua miliQ) sin ningún tipo de compuesto activo (grupo control negativo).

Dichas administraciones se repitieron cada 72 horas durante un periodo de 4 semanas.

La dosis de pIC-PEI se determinó basándonos en sus efectos sobre el tratamiento del melanoma en un modelo de ratón en un estudio anterior (Tormo D y cols, 2009). El comportamiento de los animales y el peso se monitorizó diariamente, sin variaciones apreciables.

4.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE PIC-PEJ SOBRE EL TAMAÑO DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS

4.3.1 DETERMINACIÓN NO-INVASIVA A LO LARGO DEL TIEMPO DEL TAMAÑO DE LOS IMPLANTES ENDOMETRIÓICOS MEDIANTE CUANTIFICACIÓN DE LA SEÑAL FLUORESCENTE EMITIDA IN VIVO

El tamaño de la lesión durante el período de tratamiento se estimó indirectamente en función de la extensión e intensidad de la fluorescencia emitida por fragmentos marcados. Así el tamaño de las lesiones se aproximó como el producto entre el área de la señal fluorescente detectada in vivo y la intensidad de dicha señal fluorescente. La observación no invasiva de la fluorescencia se realizó con el uso de un espectro IVIS Sistema preclínico de imágenes in vivo (Perkin-Elmer) y un software acoplado a una máquina de anestesia de gas con isoflurano (XG-8 Gas Anesthesia System; Xenogen). El Xenogen XGI-8 Gas Anesthesia System está diseñado para funcionar con el sistema de imágenes IVIS®, una tecnología de Xenogen que permite a los investigadores utilizar imágenes in vivo en tiempo real para monitorizar y registrar la actividad celular dentro de un organismo vivo.

Este sistema suministra gas anestésico de isoflurano y permite a los investigadores controlar y monitorizar el gas proporcionando una dosificación adecuada en todo momento.

Las imágenes inmunofluorescentes se obtienen por medio de epiluminiscencia con un par de filtros de absorción/emisión máxima establecido a 587 nm y 610 nm, respectivamente. El campo de visión se ajustó a 10 cm hasta que se obtuvo la intensidad máxima, como se describió previamente (Okada S y cols, 2005). La fluorescencia se monitorizó comenzando el día después de colocar los fragmentos marcados; el proceso se repitió dos veces a la semana durante 4 semanas de observación.

4.3.2 CUANTIFICACIÓN DE LA SEÑAL INMUNOFLUORESCENTE PARA ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DEL TAMAÑO DEL IMPLANTE ENDOMETRIÓICO.

La estimación del tamaño a partir de la fluorescencia emitida se determinó siguiendo la metodología descrita previamente por Masuda H y cols (Masuda H y cols 2007). En síntesis, Se procedió a visualizar las imágenes de emisión de fotones sobre una paleta de falso color superpuestos en una imagen anatómica



en escala de grises con la intensidad óptica (flujo de fotones) expresado como la eficiencia radiante promedio en fotones /s/cm².

Las regiones de interés (ROIs) correspondientes a las lesiones fueron establecidas automáticamente por el software después de establecer manualmente un umbral de intensidad mínima.

La fluorescencia de fondo se restó de los ROI, y los datos obtenidos se normalizaron respecto al momento en el que la fluorescencia era máxima (por lo general en el día 7 después del trasplante), es decir, asignando el valor máximo en el punto de medición temporal donde la señal es más intensa normalizándose el resto de puntos de medición como porcentajes de pérdida de la señal.

Para analizar de forma objetiva la reducción total de superficie de tejido endometrial obtenido y tras la administración de los compuestos y así poder comparar con los 3 grupos de estudio, analizamos la superficie e intensidad de éstas antes y después del tratamiento, expresando el resultado en % de reducción o aumento de su superficie a lo largo del experimento, Para ello se representó el tamaño de las lesiones en función del tamaño inicial de las mismas (en %).

4.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE PIC-PEI SOBRE PARÁMETROS ASOCIADOS A LA ANGIOGÉNESIS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

Tras la monitorización de tamaño de las lesiones, los animales fueron sacrificados con el uso de inhalación de CO₂ y se extirpó la cavidad peritoneal a fin de tener acceso a las lesiones en las que determinar el efecto de las interacciones farmacológicas sobre parámetros asociados a angiogénesis.

Para ello, las lesiones se mantuvieron almacenadas a - 20°C y los fragmentos congelados se cortaron en secciones de 8 µm a intervalos de 50 µm y se adherieron a portas Superfrost Gold glass (Thermo Fisher Scientific), fijadas en acetona a - 20° C para el posterior análisis inmunofluorescente. Antes de proseguir con la secuencia temporal de nuestra experimentación quisiéramos hacer un inciso para describir las generalidades de las técnicas de análisis de inmunodetección que usamos en nuestro trabajo.

4.4.1 PROCESOS INMUNOHISTOQUÍMICOS COMUNES.

La inmunohistoquímica es una técnica empleada para la detección de antígenos (por ejemplo, proteínas) en secciones de tejido basada en la reacción antígeno-

anticuerpo. Su nombre deriva de las raíces “inmuno”, en referencia al empleo de anticuerpos, e “histo”, debido a que se aplica a secciones de tejido (a diferencia de la inmunocitoquímica en las que la tinción se aplica a las “citos”=células).

Aunque existen distintos métodos inmunohistoquímicos el más comúnmente empleado es aquel en el que se utilizan un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado (método indirecto). Brevemente, en este método, tras desenmascarar el antígeno y bloquear las uniones inespecíficas, las secciones tisulares se incuban con un anticuerpo que reconoce específicamente al antígeno de interés (anticuerpo primario). Dicho anticuerpo queda, por ello, unido únicamente en aquellos sitios de la sección tisular donde se encuentra el antígeno de interés. A continuación, se añade a las secciones un anticuerpo que reconoce la fracción constante de los anticuerpos de una determinada especie (aquella en la que ha sido producida el anticuerpo primario). Este segundo anticuerpo se conoce generalmente como anticuerpo secundario y se caracteriza por ir conjugado a una enzima, en general la peroxidasa de rábano (HRP).

Este anticuerpo se une a la fracción constante del anticuerpo primario empleado, formando una especie de *sandwich*.

El revelado se realiza mediante diaminobenzamida (DAB), que es convertida por la HRP en un precipitado marrón. El resultado es el marcaje marrón de aquellas zonas del tejido donde se encuentra la molécula de interés.

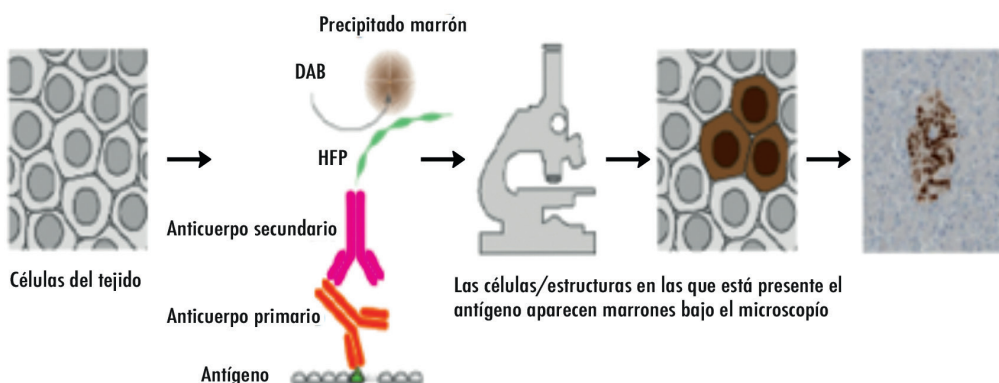


Figura 4.4.1A: Explicación fundamento inmunohistoquímica.

Con el objetivo de amplificar la señal, se puede sustituir el empleo de anticuerpos secundarios directamente conjugados a la enzima de revelado por el empleo de anticuerpos secundarios conjugados a moléculas de biotina y moléculas de estreptavidina conjugadas al enzima de revelado.

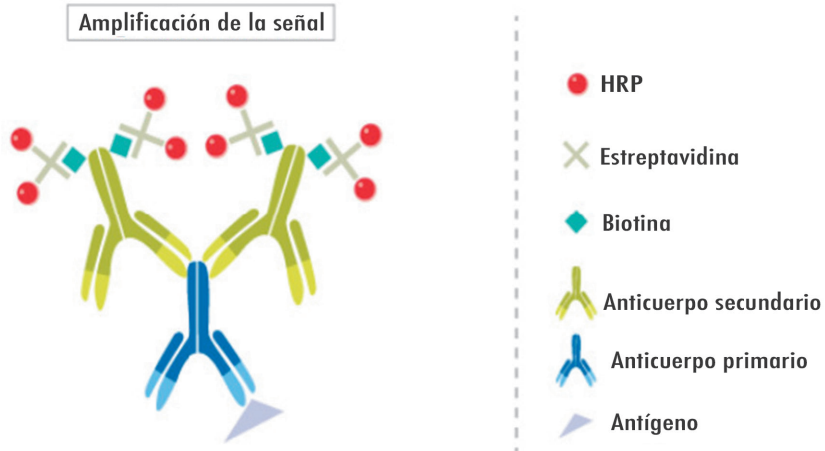
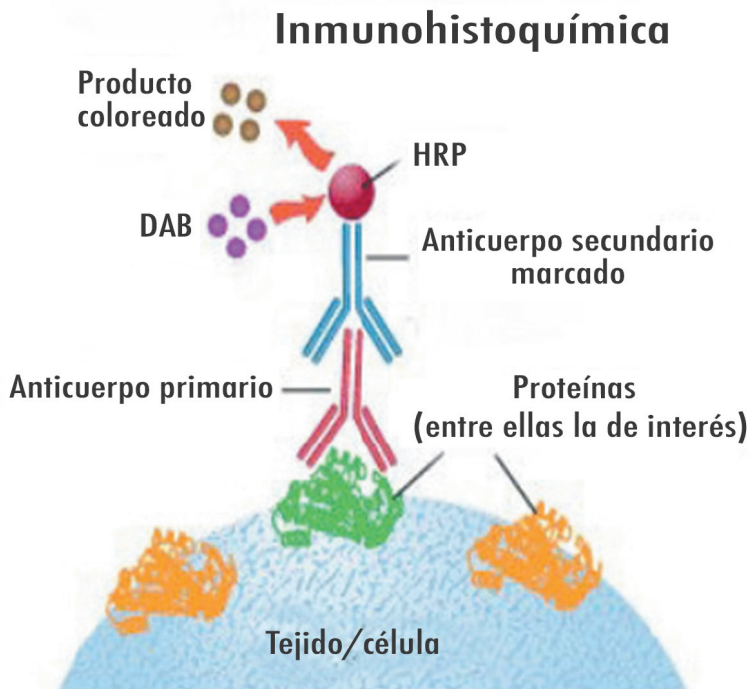


Figura 4.4.1B: Fundamento de la amplificación de la señal basada en biotina-estreptavidina

En el caso de emplear un anticuerpo primario o secundario conjugado a un fluorocromo en lugar de a un enzima como la HRP, la misma técnica pasa a denominarse inmunofluorescencia, que es la que utilizamos en esta tesis y la detección del antígeno requiere del empleo de microscopios de fluorescencia. La inmunofluorescencia se suele aplicar a secciones de tejido congelado, como en el caso de nuestra tesis.



Inmunofluorescencia

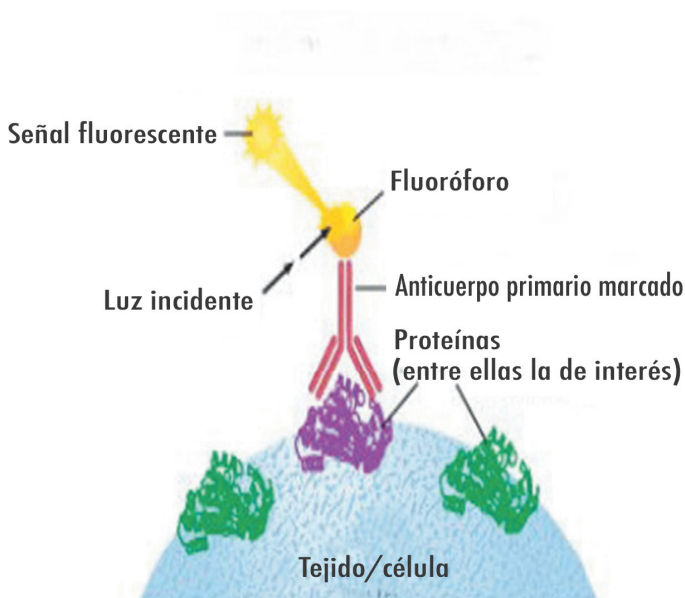


Figura 4.4.1C: Inmunohistoquímica vs. Inmunofluorescencia. Se representa el fundamento de estas dos técnicas y diferencias entre ambas.

4.4.1.1 USO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS INMUNOFLORESCENTES DE INTERÉS.

En esta tesis doctoral se han empleado anticuerpos primarios específicos para las siguientes moléculas de interés (antígenos):

- **Ki-67.** Proteína nuclear asociada y necesaria para la proliferación celular. Se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero no en las células en reposo (G0).
- **α -SMA.** Actina citoplasmática presente en la pared de los vasos maduros y en la lámina muscular y en la lámina propia de la mucosa intestinal.
- **PECAM (CD31).**: molécula de adhesión plaqueta-endotelio, marcador específico de neovascularización.
- **Anti-TdT:** molécula que reconoce TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal), una ADN polimerasa que se une a los extremos 3-OH' libres para detectar la presencia de fragmentos de ADN que aparecen en las células apoptóticas.

Si bien la detección de apoptosis, no es una inmunofluorescencia al uso ya que no se reconocen aminoácidos de proteínas sino fragmentos de ADN libre, hemos

preferido incluirla en este apartado a fin de facilitar la lectura y comprensión por parte del lector.

A continuación se procede a detallar el proceso que se siguió en esta tesis doctoral para detectar en las secciones tisulares las moléculas de interés anteriormente expuestas.

4.4.2 DETECCIÓN DE LA VASCULARIZACIÓN

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. Así, mediante la detección simultánea de pericitos y vasos sanguíneos se puede determinar la fracción de vasos maduros e inmaduros.

En cuanto a los vasos, pueden reconocerse mediante detección del marcador endotelial PECAM o CD31 usando para ello un anticuerpo monoclonal específico. En nuestro caso usamos el anticuerpo (BD 553370) de Pharmingen diluido 1:50 al cual se le acopló un sistema de revelado fluorescente de color verde. Tras el revelado, todos los vasos, tanto los maduros como los inmaduros, eran identificados mediante dicho 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 α -actina del músculo liso (α -SMA), el cual estaba directamente marcado con el fluorocromo Cy3 (C6198. 1:200; Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, MO) de color rojo. De esta forma, sólo los vasos maduros mostrarían una tinción doble endotelial verde, y roja para los pericitos.

El protocolo general de procesamiento de los criocortes respecto a la vascularización que se llevó a cabo tal y como se esquematiza a continuación implicó: hidratación del corte, bloqueo de uniones inespecíficas, incubación con anticuerpo primario, bloqueo secundario, incubación con el anticuerpo secundario específico, incubación con PECAM (CD31) y α -SMA (Sigma Aldrich), lavados y montaje.

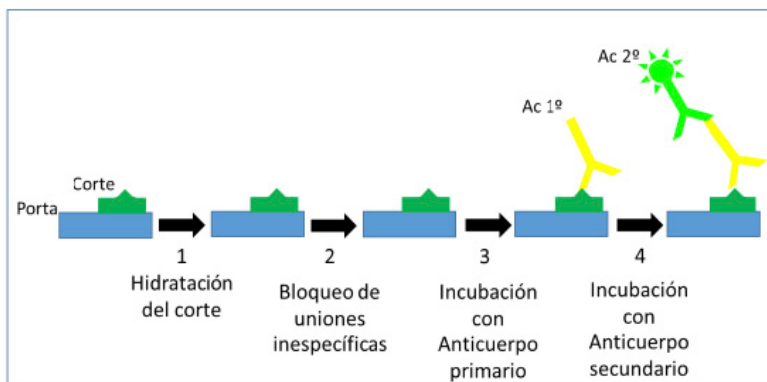


Figura 4.4.2: Esquema de la reacción de inmunofluorescencia.

El protocolo específico de marcaje se detalla a continuación:

Se fijaron las secciones en acetona atemperada a -20°C y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente (TA).

Tras lavar 3 veces con PBS, se procedió a realizar el bloqueo de la biotina endógena con "Avidin/Biotin Blocking kit" (vector Biolabs), durante 15 minutos a TA primero con Avidin y posteriormente con Biotin en las mismas condiciones.

Posteriormente se procedió al bloqueo endógeno con blocking serum solution (su composición era de 2% suero de conejo, 5% BSA en PBS), y se incubó una hora a TA.

Después se procedió a retirar el tampón de bloqueo y se incubaron a las muestras con un anticuerpo primario antimouse biotinilado PECAM (BD553370) a una concentración de 1:50, este anticuerpo primario se incubó a 4°C durante toda la noche.

Tras lavar con PBS se procedió a la incubación con anticuerpos secundarios: Anticuerpo Rabbit-Anti Rat biotinilado a una concentración de 1:500 (vectorlabs, Burlingame, CA) diluído en el mismo tampón diluyente de anticuerpos durante 30 minutos a TA.

A partir de este momento se trabajó en oscuridad.

Se procedió a la detección del anticuerpo secundario incubando el tejido con el fluorocromo Streptavidin Alexa Fluor488 (Molecular probes, USA) diluído a una concentración 1:1500 durante 20 minutos a TA.

Posteriormente se procedió a lavar de manera abundante los cortes con PBS (5 lavados de 3 minutos cada uno) a fin de eliminar los restos de fluorocromo que pudieran interferir con el siguiente marcaje de pericitos.

Para su reconocimiento se procedió a incubar las muestras con el anticuerpo primario α -SMA de ratón antihumano (Sigma C6198) en tampón diluyente (1% de BSA en PBS) a una concentración 1:200 30 minutos a TA.

Por último, los cortes fueron lavados en PBS y contrateñidos con medio de montaje con DAPI o 4',6-diamino-2-fenilindol (es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ácido nucleico) (ProLong® Gold Antifade Reagent. Invitrogen, P36931) el cual proporciona un marcaje nuclear bajo el láser ultravioleta.

Así la fluorescencia emitida por estos anticuerpos fué: verde para PECAM, y roja para α -SMA.

4.4.3 DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que ocurre en los organismos multicelulares. Se desencadena por eventos bioquímicos que llevan



a cambios en las características celulares y finalmente a la muerte celular. Entre los cambios celulares característicos de la apoptosis se encuentran el encogimiento celular, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN cromosómico.

A diferencia de la necrosis, que es una forma de muerte celular traumática en respuesta a un daño celular agudo, la apoptosis es un proceso altamente regulado y controlado fundamental en ciertos procesos del desarrollo como lo es la separación de los dedos de las manos y de los pies. Durante la apoptosis, se producen fragmentos celulares llamados cuerpos apoptóticos que son engullidos rápidamente por células fagocíticas evitando el daño que estos podrían causar en las células circundantes.

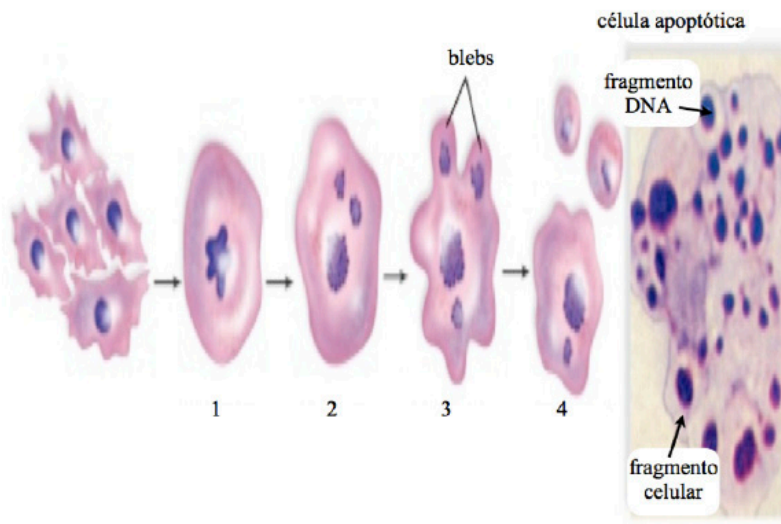


Figura 4.4.3A: Representación gráfica del proceso de apoptosis o muerte celular programada:

- 1) La célula se redondea y el núcleo se colapsa.**
- 2) La cromatina se condensa y el núcleo se fragmenta.**
- 3) La membrana plasmática forma vesículas y se forman ampollas.**
- 4) Fragmentos celulares tienen DNA fragmentado**

Una técnica ampliamente utilizada para identificar células en apoptosis es el TUNEL (del inglés Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling). Mediante esta técnica es posible detectar la fragmentación del ADN consecuencia de las cascadas de señalización apoptótica. El ensayo aprovecha la presencia de mellas en el ADN de las células apoptóticas que pueden ser identificadas mediante el enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal o TdT, un enzima que cataliza la adición de dUTPs marcados a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del ADN.

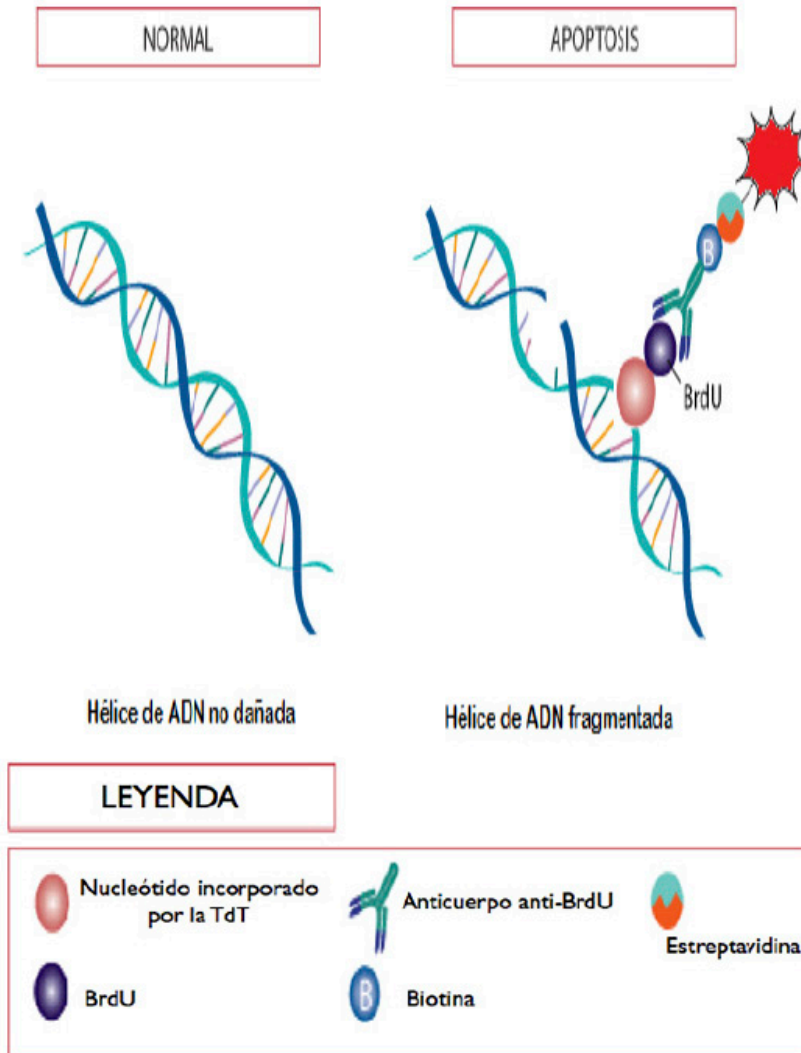


Figura 4.4.3B: Fundamento TUNEL.

En esta tesis doctoral, el análisis de la apoptosis se realizó empleando el *kit Apoptag Isol Dual Fluorescence Apoptosis Detection Kit*.

Los cortes se incubaron con el mix de TUNEL durante 60 min a 37°C en oscuridad y en cámara húmeda. Este mix consiste en una mezcla de dos soluciones: solución de marcaje, que contiene TMR-dUTP; y solución enzimática, que contiene el enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT). Durante esta incubación la TdT añade moléculas de TMR-dUTP a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del ADN. Finalizada esta incubación, se realizaron dos lavados con PBS, y se montaron las muestras con el medio de montaje *ProLong Gold antifade reagent* con DAPI (Life technologies), tras lo cual se

dejaron 18 h a TA. La detección del marcaje se realizó mediante un microscopio de fluorescencia.

4.4.4 DETECCIÓN DE LA PROLIFERACIÓN

La proliferación celular fue detectada mediante un anticuerpo capaz de unirse al núcleo y los cromosomas de las células que presentan actividad proliferativa. Se procedió de la misma manera que con los anticuerpos anteriores, en este caso se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón frente al antígeno nuclear Ki67 (MIB-1, dilución 1:100 DakoCytomation, DAKO M7240), el cual solo se expresa durante las fases de actividad celular (G1, S, G2 y mitosis), pero no durante la fase G. Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario (vectorlabs, Burlingame, CA) compatible con el primario marcado con fluorocromo Alexafluor 568. Tras los pertinentes lavados al igual que con las inmunofluorescencias de los anteriores casos, se procedió al montaje con DAPI para su posterior visualización.

4.4.5 CUANTIFICACIÓN DEL MARCAJE INMUNOFLUORESCENTE.

Las dos principales secciones transversales obtenidas de cada implante fueron consideradas como representativas de la muestra.

Se seleccionaron al azar cuatro campos de alta potencia y fueron fotografiados por corte transversal con el uso de un sistema de análisis de imágenes vinculado a un microscopio Nikon Eclipse E400 .

Por lo tanto, un total de 16 imágenes (2 implantes por 2 secciones transversales por 4 campos de alta potencia) por ratón se usaron para la determinación de cada parámetro de interés.

El marcaje obtenido de la inmunofluorescencia se cuantificó haciendo uso del programa Image Pro Plus.

- La proliferación celular se determinó mediante la cuantificación del porcentaje de área marcado por el Ki67 respecto al total del tejido analizado.
- La apoptosis se determinó mediante la cuantificación del porcentaje de área marcado (células apoptóticas) respecto al total del tejido analizado.
- Para visualizar vasos maduros e inmaduros, se crearon con el uso de Adobe Photoshop CS3 imágenes superpuestas correspondientes a la detección simultánea de PECAM y α -SMA. El área de interés para cada parámetro inmunofluorescente 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 inmunofluorescencia. 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 marcados con PECAM y α -SMA (PECAM+/ α -SMA+) y los que eran inmaduros marcados con PECAM pero no con α -SMA (PECAM+/ α -SMA-) respecto al total en cada uno de los campos visuales analizados. Se utilizó para su representación las siguientes formulas:

Madurez= [número de Vasos (PECAM+/ α -SMA+) / Vasos Totales] x 100

Inmadurez=[número de vasos (PECAM+/ α -SMA-) /Vasos totales] x 100

4.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa IBM SPSS Statistics. Los resultados se expresaron como la media \pm Error estándar de la media (ESM o SEM por su acrónimo en inglés).

Un test de análisis de varianza (ANOVA) seguida de un análisis post hoc de Tukey se utilizó para discernir los efectos de pICPEI en el tamaño de la lesión.

Se realizó un Test de Wicoxon para muestras pareadas para determinar las diferencias en el tamaño de las lesiones.

Test no paramétricos de Kruskall-Wallis seguido test de Mann-Whitney se usaron para comparar las diferencias en vascularización, proliferación celular, madurez de los vasos sanguíneos y apoptosis entre los diferentes grupos de estudio.

En todos los casos, se rechazó la hipótesis nula cuando p-valor<0,05.





5. RESULTADOS





5. RESULTADOS

5.1.- EFECTOS DEL TRATAMIENTO SOBRE EL NÚMERO, TAMAÑO Y MORFOLOGÍA DE LAS LESIONES.

Con el objetivo de establecer un modelo murino heterólogo no invasivo de endometriosis, 30 ratonas de la cepa Crl:CD1-*Foxn1*^{nu} se sometieron a ovariectomía y posterior tratamiento hormonal, recibiendo un fragmento de endometrio humano implantado en el peritoneo.

Se detectaron las cantidades de fluorescencia proporcionadas por los fragmentos endometriales, y su posible alteración con la administración de compuesto Anti-VEGF, nuestro compuesto de estudio pIC-PEI y un tercer grupo control con agente acuoso vehiculante (agua miliQ).

Tras su sacrificio una vez finalizada la monitorización no invasiva se procedió a observar el tamaño de cada implante.

La señal fluorescente de los implantes en todos los grupos fueron similares al comienzo del experimento (Figura 5.1).

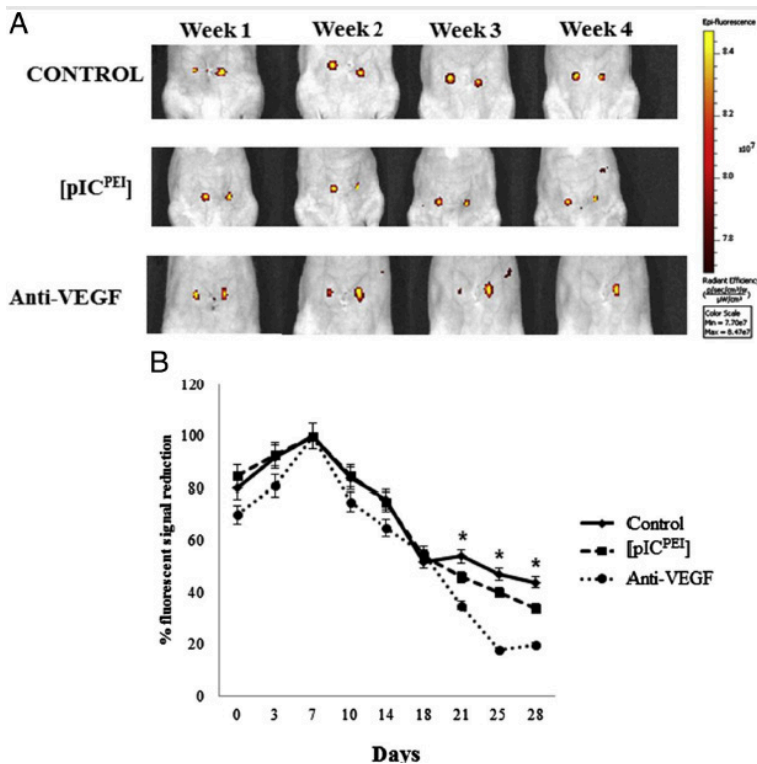


Figura 5.1

RESULTADOS

Como se observa en la figura 5.1 la intensidad general aumentó en todos los grupos, alcanzando un pico una semana después de la implantación (a los siete días), también detectamos que tanto en las ratonas del grupo tratado como en las ratonas del grupo control se registró una disminución de la señal fluorescente a lo largo del tiempo a partir del pico comentado que progresivamente continuó hasta el final del experimento.

No obstante, al comparar el registro de fluorescencia entre las ratonas de ambos grupos, se observó que en las ratonas del grupo tratado, a diferencia de las ratonas del grupo control, se daba una disminución pronunciada de la señal fluorescente entre día 7 y día 28 de estudio.

El descenso de la señal en el grupo anti-VEGF fue más prominente que en el grupo de tratamiento con pIC-PEI, las diferencias significativas del grupo control se convirtieron evidentes solo al comienzo de la tercera semana.

Al final del período de estudio, después de 28 días de tratamiento, se cuantificó la disminución en la intensidad de la señal fluorescente para cada grupo: para el grupo control $60 \pm 5.27\%$, para el grupo de tratamiento con pIC-PEI $65 \pm 6.73\%$ y por último para el grupo control positivo con anti-VEGF $80 \pm 3.21\%$, en comparación con el punto en el que la intensidad de señal fue máxima (el día 7). (Fig. 5.1).

Así pues, a raíz de estos datos podemos observar que la diferencia en intensidad fluorescente entre el grupo control y el grupo de tratamiento con pIC-PEI, aunque notable, no fue estadísticamente significativa al final del periodo de tratamiento.

Para evaluar de manera macroscópica las lesiones endometriósicas, en casi todos los animales, ambas lesiones fueron recuperadas después tratamiento. Tras el sacrificio de los animales se procedía a visualizar el peritoneo de la cavidad abdominal donde se había realizado el injerto.

Como podemos observar en la figura 5.2 en las fotografías A y B la apariencia de los implantes recuperados del grupo de control era rojizo debido a que se producía la vascularización después de la implantación y había sido aceptado por el tejido del animal.

Casi la mitad de los implantes de animales tratados con anti-VEGF aparecieron de color blanco o rosa pálido, lo que sugiere una reducción en la vascularización como se observa en la misma figura en las fotografías E y F. Por último en el grupo de tratamiento con nuestro compuesto de estudio, se observó una mezcla de rojo, rosa e implantes blancos en animales tratados con pIC-PEI ilustrado en las fotografías C y D de la figura 5.2 que se muestra a continuación.



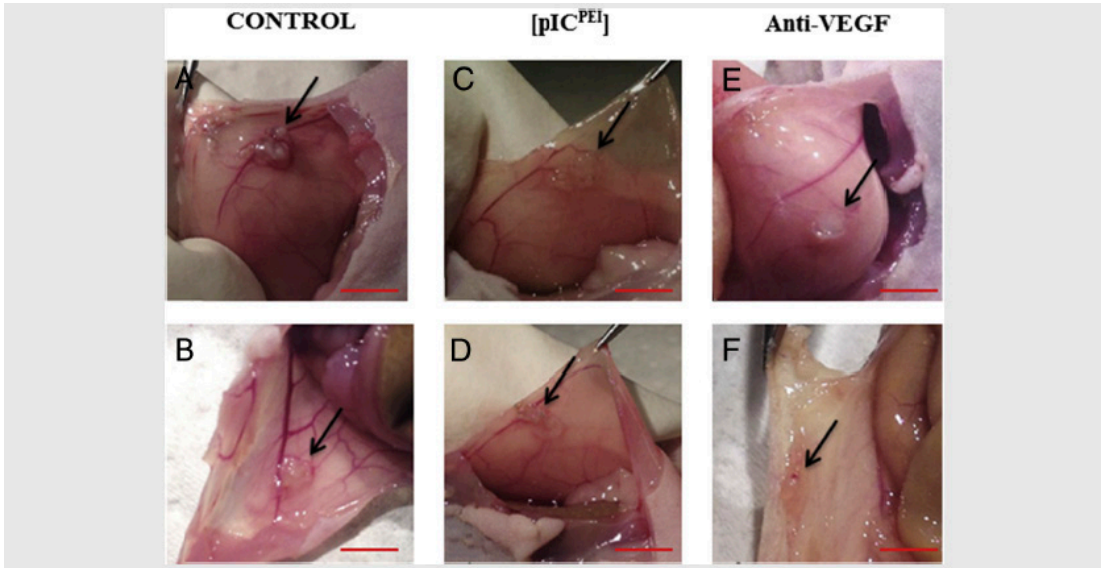


Figura 5.2: Se observa el efecto de Pic-PEI sobre las características macroscópicas de los implantes endometriales humanos en la pared peritoneal de ratones del grupo control (A, B), grupo pIC-PEI (C, D), y grupo con compuesto anti-VEGF (E, F) al final del período de tratamiento de 4 semanas.

5.2.- EFECTOS DEL TRATAMIENTO SOBRE PARÁMETROS ASOCIADOS A LA ANGIOGÉNESIS EVALUADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

Por último, nos propusimos determinar el o los mecanismos posibles que podrían estar implicados en la disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas como consecuencia de la acción del pIC-PEI. Concretamente, realizamos un estudio de proliferación, apoptosis y vascularización en las lesiones.

5.2.1 VASCULARIZACIÓN

Analizamos la vascularización de las lesiones combinando una inmunofluorescencia frente a α -SMA (actina citoplasmática presente en la pared de los vasos maduros) y también se utilizó el marcador endotelial PECAM (CD31, representando los vasos inmaduros), para poder estudiar los cambios a nivel de la densidad vascular y distinguir la neoangiogénesis en los 3 grupos de estudio.

Como se puede observar en la Figura 5.2.1, se detectaron vasos maduros (color rojo) e Inmaduros (color verde) en las lesiones de las ratonas de todos los grupos.

En cuanto a la cuantificación de la densidad vascular y madurez en las

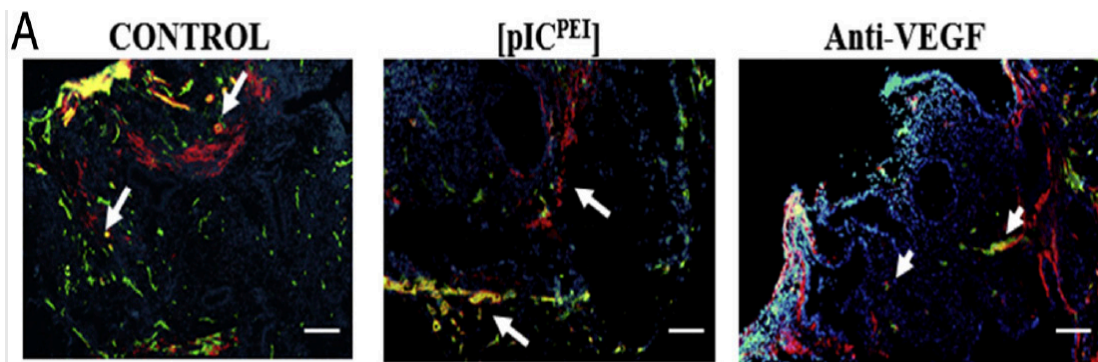
lesiones endometriósicas se observó que la administración de pIC-PEI se asoció con una marcada disminución de la densidad vascular, en las lesiones de las ratonas del grupo tratado con Pic-PEI y ANTI-VEGF se detectó un menor marcaje por α -SMA. Este hecho refleja una menor cantidad de vasculatura madura en las lesiones de estos grupos, si bien, las diferencias observadas no resultaron estadísticamente significativas para nuestro compuesto pIC-PEI en comparación con el grupo control (11.90+/- 0.6% vs. 8.76+/- 0.8%). Mientras que en el grupo de ratonas que recibía tratamiento con anti-VEGF (control positivo) causó una disminución significativa en este parámetro (4.301+/- 0.77%; P <.05).

Sin embargo, sí detectamos una disminución significativa respecto al grupo control en el número de vasos inmaduros teñidos de color verde (marcaje PECAM) que permanecen en los animales tratados con pIC-PEI en comparación con los tratados en el grupo control, como se puede observar en la Figura 5.2.1.

Por tanto nuestro compuesto de estudio repercute tanto en los vasos maduros existentes en la lesión como en la neoangiogénesis. Este patrón queda mejor reflejado en el diagrama de barras de la Figura 5.2.1 B y C , donde en la Figura 5.2.1B se representa el porcentaje de tinción de PECAM (verde) frente al área total de la lesión, siendo mucho menor en los grupos de tratamiento respecto al control.

Por otra parte tal y como se ilustra en la Figura 5.2.1 C, queda reflejado el porcentaje de vasos inmaduros con la siguiente fórmula ya comentada en el apartado 4.4.5 de material y métodos, vasos (PECAM +/ α -SMA -) dividido por el número total de vasos (PECAM+) observándose en este caso una reducción significativa del porcentaje de vasos inmaduros en la lesión endometriósica del grupo tratado con PIC-PEI comparando con las ratonas del grupo control.

Así pues, solo se detectó significancia estadística comparando con el grupo control cuando hablamos de la angiogénesis de novo y menor efecto sobre los vasos preexistentes maduros, ejerciendo mayor efecto inhibiendo la formación de vasos sanguíneos en la lesión endometriósica.



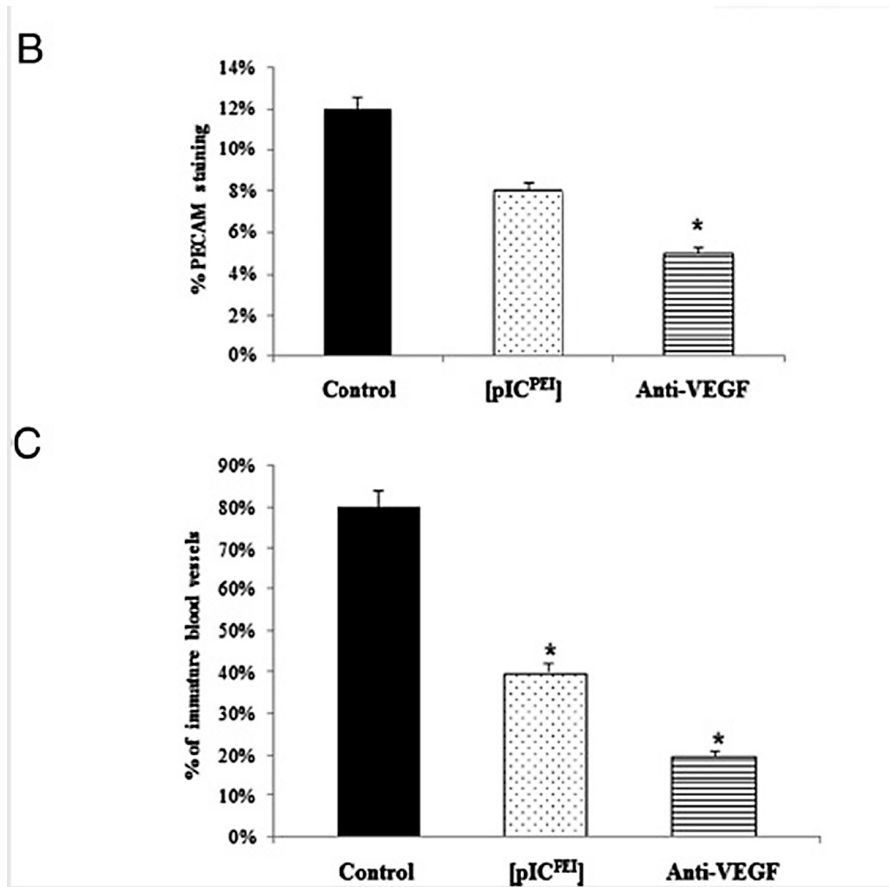


Figura 5.2.1: Efecto de pICPEI sobre la vascularización de los implantes endometriósicos.

(A) Patrón de tinción inmunofluorescente para PECAM (un marcador de vascularización, tinción en verde) y α -SMA (un marcador de la capa muscular de los vasos maduros, teñido de rojo) en los implantes endometriósicos obtenidos después de matar a los ratones tratados con control, anti-VEGF o pICPEI.

(B) Se representa la neovascularización mediante el porcentaje de tinción de PECAM (verde) frente al área total.

(C) Porcentaje de vasos inmaduros

5.2.2 PROLIFERACIÓN CELULAR.

Para estudiar la proliferación en las lesiones, se realizó una inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal frente al antígeno nuclear Ki67, siendo un marcador de proliferación celular. Detectamos proliferación en las lesiones de las ratonas

de los tres grupos, si bien ésta era significativamente menor en las lesiones de las ratonas del grupo tratado con PIC-PEI y ANTI-VEGF que en las lesiones de las ratonas del grupo control, como puede observarse en la 5.2.2A.

Tras el análisis cuantitativo realizado con el sistema de análisis Image-Pro Plus se observa que los porcentajes de proliferación de células Ki67 teñidas nuclearmente (color rojo) en las lesiones endometriósicas de los animales tratados con pIC-PEI y anti-VEGF (1.4± 0.85% y 1.5± 0.9%, respectivamente) fueron significativamente menores que en el grupo control (4.3± 0.6%), siendo una diferencia estadísticamente significativa (P <0.05).

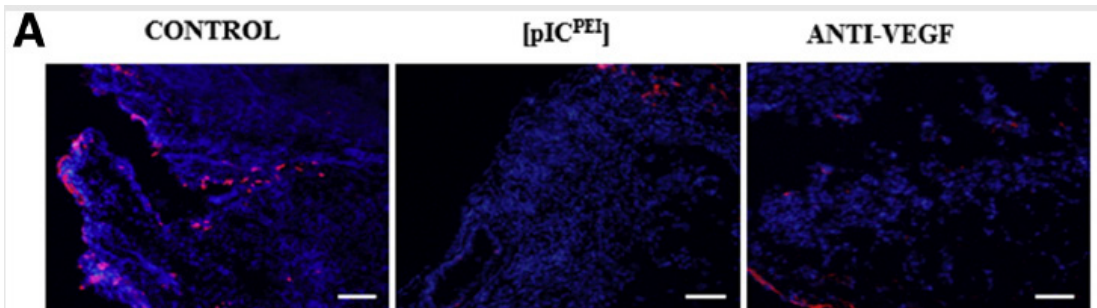


Figura 5.2.2A: Proliferación de las células teñidas contra marcador de la proliferación celular Ki67 (color rojo).

En el diagrama de barras de la 5.2.2C plasmamos la diferencia estadísticamente significativa respecto a la cuantificación del área de la lesión positiva para el marcaje con Ki-67 comparando los 3 grupos de estudio, siendo el menor porcentaje de marcaje para nuestro compuesto pIC-PEI.

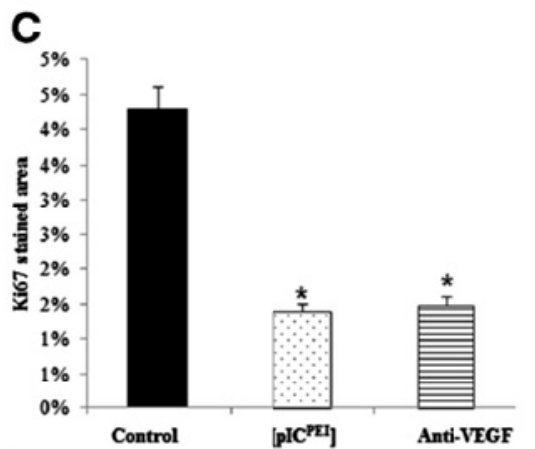


Figura 5.2.2C: Representación de la proliferación celular, Cuantificación del área de la lesión positiva para el marcaje con Ki-67.



5.2.3. APOPTOSIS

El análisis de la apoptosis en las lesiones se realizó mediante la técnica TUNEL. Se detectaron pocas células en apoptosis en las lesiones de las ratonas del grupo control, en cambio, sí se observó este fenómeno en las células de las ratonas del grupo tratado, existiendo diferencias entre los grupos estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Los porcentajes de tejido teñido apoptótico fueron significativamente mayores en las lesiones endometriósicas de animales tratados con pIC-PEI y anti-VEGF (1.5+- 0.7% y 1.3+- 0.9%, respectivamente) en comparación con el grupo control (0.5+-0.4%), como podemos observar en la figura 5.2.3A donde las células apoptóticas se representan en la figura emitiendo fluorescencia rosa.

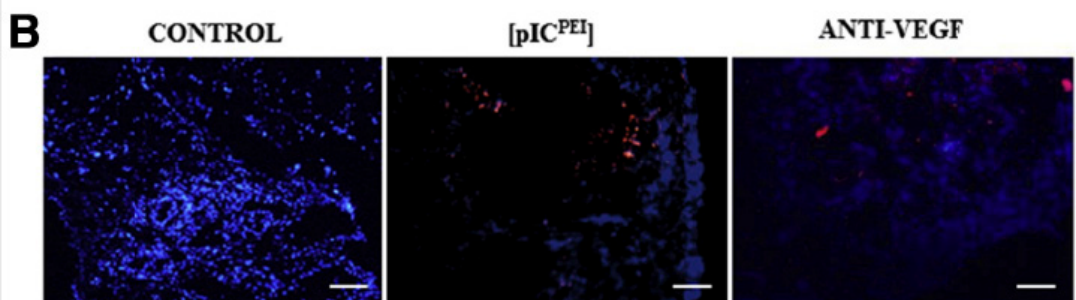


Figura 5.2.3A: Marcado de las roturas de ADN inducidas por ADNasa I (color rosa) en los implantes de endometriosis obtenido después de sacrificar a los ratones tratados con placebo, anti-VEGF y pIC-PEI.

En el diagrama de barras de la figura 5.2.3B que se muestra a continuación plasmamos la diferencia estadísticamente significativa respecto a la cuantificación del área de la lesión donde se detecta este fenómeno de muerte celular programada comparando los 3 grupos de estudio, siendo el mayor porcentaje de marcaje para nuestro compuesto pIC-PEI.

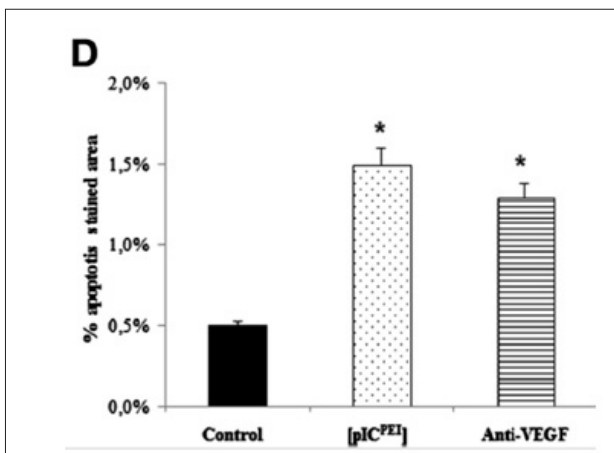


Figura 5.2.3B: Se observa la apoptosis en los tres grupos, el porcentaje es mayor estadísticamente significativa en los dos grupos de tratamiento, siendo más acentuada en nuestro compuesto de estudio.



6. DISCUSIÓN





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 empeora la calidad de vida de la paciente (D'Hooghe T y cols, 2006) y genera 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).

Los agentes angioestáticos 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). Pero estos compuestos debido a sus 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 la 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 permitieran en un futuro su uso terapéutico en humanos.

Los fármacos anti-VEGF / VEGFR2 ejercen efectos no selectivos sobre los vasos normales, pueden inducir la regresión de los capilares y por lo tanto interferir en procesos imprescindibles tales como la cicatrización de heridas en la que de manera fisiológica se requiere angiogénesis (Kamba T, 2007), por lo que presenta efectos secundarios importantes al ser no selectivo.

En un esfuerzo por superar estas limitaciones, se ha tratado de investigar compuestos con efectos más selectivos en la vasculatura patológica, como agentes que alteran los vasos sanguíneos (Feng D 2013), la quinagolida (agonista de dopamina) (Gomez y cols 2011, Delgado-Rosas y cols 2011) observándose que induce la desaparición o disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas peritoneales en mujeres hiperpolactinélicas con endometriosis, no se evidenció una reducción significativa de la neovascularización y neoangiogénesis en las lesiones endometriósicas y ocasiona a nivel molecular un aumento de los genes implicados en la fibrinólisis y una disminución de genes implicados en procesos inflamatorios.

Por ello, había que buscar compuestos que fuesen capaces de inhibir el sistema angiogénico de manera efectiva pero de una forma no tóxica y pensamos en el compuesto pIC-PEI que añadía su acción proapoptótica, descrita en neoplasias malignas, por ejemplo en el melanoma (Tormo D 2009) y recientemente, se observó que pIC-PEI fue capaz de promover actividad apoptótica en enfermedad benigna, como el leiomioma (García-Pascual CM y cols 2016).

Gracias al estudio de Tormo y cols en 2009 en un modelo de ratón de melanoma reveló que mediante la complejación de pIC con un vehículo, tal como polietilenimina (PEI), el complejo pIC-PEI inducía la apoptosis de manera selectiva en células malignas promoviendo la hiperactivación de la autofagia en ellas. Debido al hecho de que no había muerte tumoral cuando se presentaba sin vehículo en lugar de ser administrado en complejo pIC-PEI, se hizo evidente que



con el vehículo PEI, sí que presentaba actividad antitumoral (Alonso-Curbelo y cols 2010).

Este compuesto conocido desde hace muchos años, ha sido ensayado para comprobar su toxicidad en varios grupos de estudio, en el estudio de Field, A. K y cols 1968 donde aparentemente, poli I: C presentó un grado de baja toxicidad, también se observó esta baja toxicidad en ensayos humanos preliminares (Lampson, G. P. y cols 1972). Además se observó en un estudio en humanos que este compuesto presentaba un perfil tóxico favorable (Freeman Al y cols 1977) para el tratamiento en la práctica clínica habitual.

Por lo tanto, nuestra hipótesis fué que pIC-PEI podría contener propiedades antiangiogénicas de poly I: C (Kleinman ME y cols 2008 , Bergé M y cols 2010) y ejercer al mismo tiempo efectos proapoptóticos y antiproliferativos sobre el tejido endometriósico, por lo tanto representa un triple efecto terapéutico, hasta ahora no evaluado, para esta enfermedad.

Así pues, el objetivo del presente trabajo fue evaluar, por primera vez, el efecto del tratamiento con pIC-PEI sobre el tamaño de las lesiones endometriósicas, la vascularización, apoptosis y la proliferación celular.

Para poder evaluar sus efectos en esta enfermedad, lo hemos estudiado en un modelo animal heterólogo de ratón con el fin de adaptar las condiciones fisiológicas del experimento al ser humano.

Así mismo quisimos que los efectos sobre el tejido endometrial implantado en el peritoneo de los animales pudieran monitorizarse a tiempo real y de manera no invasiva. Con ello perseguimos por un lado detectar posibles sesgos en la respuesta debidos por ejemplo a la no implantación del tejido ectópico o su falta de viabilidad inicial que pudieran confundir el efecto real de la respuesta ejercida por los medicamentos. Quisimos que fuera no invasivo de manera que la respuesta no estuviera sujeta a sesgos de manipulación como por ejemplo los necesarios para observar el crecimiento del tejido. En este sentido nos propusimos utilizar un modelo de monitorización de las lesiones a partir de su previo marcaje mediante fluorescencia de manera similar al desarrollado por Fortin en 2006 con algunas modificaciones como por ejemplo el tipo de proteína fluorescente empleada para marcaje, en nuestro caso m-Cherry mucho más potente que el GFP usado en estudios previos (Fortin y cols 2006).

Además el uso de este modelo tiene la particularidad de que permite la estimación del tamaño de las lesiones de un modo mucho más sensible, controlado y objetivo en comparación con los usos convencionalmente basados en la medición directa del implante mediante calipers y que está sujeto a una gran variabilidad debido a lo grosero de dichas mediciones.

En este sentido no es difícil intuir que es harto complicado delimitar específicamente el tamaño individual de las lesiones una vez incluidas en el tejido hospedador. Así mismo aún en el caso de que se pudiera delimitar fehacientemente los límites del tejido huésped/hospedador y pudiera ser extirpado milimétricamente; aún con esto, el margen de error de las mediciones con los calipers se estima en varios mm. Puesto que las lesiones a implantar raramente sobrepasan los 5-10 mm³ de volumen no es difícil preveer que el más mínimo error de 1-2 mm³ en la medición con los calipers pudiera enmascarar los efectos reales o la ausencia de estos que las drogas a ensayo pudieran tener en el modelo.

Por el contrario desde el momento en que el tamaño de la lesión pasa a depender de la estimación de la intensidad de la fluorescencia, y esta puede medirse objetivamente en el rango de lo, por así llamarlo, microscópico, las posibles variaciones debidas a la toma de medidas se minimizan evitándose con ello que las diferencias inherentes al tratamiento queden enmascaradas.

Para poder determinar la tasa de cambio en el tamaño de las lesiones, iniciamos nuestra experimentación determinando los niveles de intensidad de fluorescencia de partida, eso es justo tras el momento en que las lesiones habían sido implantadas y antes de iniciar los tratamientos. Observamos que durante las posteriores mediciones que se sucedieron pudimos determinar tempranamente que incluso en los animales que no recibían más tratamiento que el puro vehículo (placebo) la señal iba extinguiéndose paulatinamente con el tiempo.

Este comportamiento era congruente con estudios previos en modelos animales similares a éste (Fortin y cols 2006, Garcia-Pascual y cols, 2016) y se debe a la expresión episomal de los adenovirus conteniendo la proteína fluorescente (Wang X y cols 2000). De hecho al no integrarse en el genoma del huésped, la expresión dentro del plásmido se va diluyendo y silenciando a lo largo del tiempo (Nelson JE y cols, 1997).

La limitación de nuestro estudio y otros similares con este tipo de modelos desarrollados mencionados es que la fluorescencia no puede monitorizarse más allá de 4-6 semanas debido a la expresión transitoria del Ad-virus utilizado para el marcado del tejido (Fortin M, Liu B y cols 2010). De hecho, la fluorescencia disminuyó progresivamente, incluso en el grupo control, hasta el punto de que casi el 60% se había perdido tras 4 semanas de estudio.

Para conocer cuando las lesiones implantadas en el peritoneo de los animales quedan, por así decirlo, "establecidas", nos basamos en estudios previos de Donnez (Donnez J y cols, 1998) donde muestra que en los modelos heterólogos se produce una revascularización total del tejido implantado por parte de la vasculatura del hospedador en torno a 5 días tras su implantación .



Por lo que para maximizar los efectos sobre los neovasos, comenzamos el tratamiento con pIC-PEI el día después de la cirugía de implantación para interferir con la revascularización que tiene lugar durante los períodos iniciales de injerto (Eggermont J 2005).

En nuestro estudio se observó una mayor disminución del tamaño de los implantes endometriósicos en los animales, aunque no fue estadísticamente significativa, además comienza a detectarse mayor disminución en la fluorescencia a partir de la tercera semana de estudio, nuestra expectativa de que el uso prolongado de pIC-PEI podría dar lugar a efectos más drásticos sobre el tamaño de la lesión se basa en la experiencia previa de los efectos de los compuestos con un perfil angiogénico moderado similar, como el agonista de la dopamina quinagolida. De hecho, cuando quinagolida fue analizado durante un corto período de tiempo (3 semanas) en un modelo animal murino heterólogo de endometriosis, solo se detectaron discretos efectos en el tamaño de la lesión (Delgado-Rosas y cols 2011). Sin embargo cuando el estudio se prolonga a un periodo con mayor duración temporal (4 meses) en humanos, el agonista de la dopamina fue capaz de inducir una contracción importante de las lesiones endometriósicas (Gómez R y cols 2011).

Sin embargo, ampliar la extensión del tiempo de estudio no fue posible, lo que impidió probar esta hipótesis en este modelo de ratón. Más específicamente, la expresión episomal transitoria del Adenovirus requerido para el marcaje (Suo G y cols 2009) y la presencia de células NK que conducen al rechazo de xenoinjertos (Kawahara T y cols 2010) no permiten mayor extensión del tiempo de estudio más allá de 4-5 semanas en este modelo de ratón.

Además de la falta de mantenimiento de los efectos antiangiogénicos a lo largo del tiempo, la carencia de un sistema inmune completo en este modelo podría ser una limitación adicional para que esta droga ejerza un efecto más notable. De hecho, la actividad antitumoral de pIC-PEI se atribuyó originalmente a su capacidad para estimular el sistema inmune de una manera dependiente del interferón (Field AK y cols 1967, Levy HB y cols 1969).

Dado el papel del sistema inmune en la endometriosis (Herington JL y cols 2011, Berkkanoglu M y cols 2003), la función inmunológica defectuosa en nuestro modelo inmunodeprimido podría haber causado que pIC-PEI no pueda inducir una regresión más drástica de la lesión endometriósica.

Respecto a los efectos sobre la vascularización, los resultados obtenidos fueron que pIC-PEI redujo moderadamente la densidad de vasos sanguíneos, como se muestra por una notable, aunque no estadísticamente significativa, disminución en este parámetro.

Se observa que puede interferir en el proceso de neovascularización en

lesiones endometriales, como se observó por el menor número de neovasos en animales tratados con pIC-PEI en comparación con animales del grupo control.

Conociendo que los vasos inmaduros son mucho más susceptibles a efectos pro/antiangiogénicos que los vasos maduros (Benjamin LE y cols 1999), nuestros resultados sugieren que pIC-PEI es capaz de inhibir parcialmente el crecimiento de vasos recién formados (inmaduros), pero no aquellos del tipo maduro rodeado por α -SMA, que son menos susceptibles a los efectos antiangiogénicos.

Esta declaración proviene de la observación en un estudio anterior donde pIC puede interferir con el brote angiogénesis de neovasos, como se muestra en el anillo aórtico y formación de vasos (Guo Z y cols 2012). Estos hallazgos también coinciden con otro estudio reciente ya mencionado donde pIC-PEI es capaz de disminuir significativamente la densidad de los vasos de los tejidos en el leiomioma en el que la vascularización comprende en gran medida vasos inmaduros que carecen de α -SMA (Aitken E y cols 2006).

Nosotros especulamos que los efectos antiangiogénicos generales de pIC-PEI no fueron tan evidentes en los injertos porque la vascularización del tejido endometrial comprende una mezcla de ambos vasos maduros (rodeados de α -SMA) y vasos inmaduros (Delgado Rosas y cols 2011, Hull ML y cols 2003, Dabrosin C y cols 2002).

Dado que los efectos del bloqueo de VEGF en la neovascularización global fueron más agudos que los ejercidos por nuestro compuesto, es probable que pIC-PEI proporcione un efecto antiangiogénico menos potente que la inhibición tradicional de VEGF.

De estos datos se deduce que posiblemente el pIC-PEI sea capaz de inhibir la neoformación de vasos de manera moderada sin afectar a los vasos ya maduros o estables. Este cuadro es consistente con el papel clásico que tienen los inhibidores de la angiogénesis: son capaces de inhibir los vasos en neoformación que son más sensibles al estímulo antiangiogénico pero no aquellos maduros que no son sensibles a estas acciones.

Por otro lado, para analizar la proliferación celular realizamos otra inmunofluorescencia frente al marcador de proliferación Ki67, y observamos que en concordancia con nuestra hipótesis se promovió una menor proliferación en las ratonas del grupo tratado frente al grupo control, hecho que coincide cuando detectamos la apoptosis en los implantes de los tres grupos, aplicando la técnica del TUNEL donde se observa un aumento estadísticamente significativo de la muerte celular en el grupo tratado con pIC-PEI comparado con el grupo control.

Es ampliamente conocida la interacción entre la inhibición de la angiogénesis y la apoptosis en tejidos en proliferación (Via LE y cols 2000, Kamba T y cols, 2007,



García-Pascual y cols 2013, Pauli SA y cols 2005) a pesar de no ser entendido a nivel molecular.

Aunque la restricción del suministro de nutrientes provocado por agentes antiangiogénicos conduce a la apoptosis en las células de los tejidos (García-Pascual y cols 2013), también se ha publicado un efecto inverso, con inducción de apoptosis en células endoteliales conduciendo a eventos antiangiogénicos (Pauli SA y cols 2005).

Curiosamente, el efecto de pIC-PEI en el aumento de la apoptosis se observó igual o de mayor magnitud que el ejercido por el inhibidor de VEGF.

Dado que los efectos antiangiogénicos ejercidos por pIC-PEI fueron inferiores a los que ejerce el bloqueo de VEGF, razonamos que una parte importante de los efectos proapoptóticos ejercidos por pIC-PEI no fueron mediados por factores antiangiogénicos dependientes como la restricción del suministro de nutrientes, sino a través de efectos directos en el tejido endometriósico.

Esta especulación es compatible con estudios que muestran que pIC induce la apoptosis en cultivos de endotelio humano (Guo Z y cols, 2012) y en células tumorales de origen maligno (Tormo D y cols 2009, Guo Z y cols, 2012). Recientemente se ha observado también que pIC-PEI induce un claro efecto apoptótico incluso en cultivos primarios de tumores benignos, como leiomiomas (García-Pascual y cols 2016).

Quedaría por confirmar en otros estudios si esta apoptosis inducida por pIC-PEI en enfermedades benignas, como endometriosis y leiomiomas, es impulsado por el mismo mecanismo molecular descrito en tejidos malignos (Kleinman ME y cols 2008, Bergé M y cols 2010, Tormo D y cols 2009, Guo Z y cols 2012).

Muchos estudios informan de que parte de sus acciones están mediadas por un receptor celular llamado Toll-like 3. El receptor Toll-like 3 (TLR3) es un miembro de la familia de los receptores Toll-like, son proteínas transmembrana.

Además, se descubrió que los agonistas de TLR3 promueven la inhibición del crecimiento tumoral en varios modelos murinos y humanos de células cancerígenas a través de 2 mecanismos: disminuye la proliferación e induce la muerte celular apoptótica; en modelos de ratones en cáncer de mama y de pulmón, la activación de TLR3 provocaba quimioatracción de linfocitos citotóxicos al crecimiento del tumor (Conforti R 2010 y Zhu X 2007), inducción de la secreción de interferón (IFN) y citoquinas/quimiocinas inflamatorias y mejora la respuesta inmune antitumoral (Salaun B 2011 y Matsumoto M 2008).

Muchos estudios han plasmado los efectos apoptóticos de agonistas de TLR3 en varios tipos de tumores, incluidos los de mama, melanoma, cabeza y cuello,

próstata, carcinoma renal, colon, células cancerosas cervicales y de pulmón (Estornes.Y y cols, 2013).

La expresión de TLR3 en el tejido del carcinoma hepatocelular, según los informes, ejerce un efecto sinérgico sobre la apoptosis e inhibición de la proliferación celular, y además se observó un efecto sobre la angiogénesis (Chew V 2012 y Yuan MM 2015), proceso indispensable para el desarrollo de enfermedades cancerosas y como hemos comentado anteriormente de la endometriosis.

TLR3 es activado por pIC-PEI quien inicia una respuesta protectora contra el virus con dicho RNA, estudios posteriores revelaron que la supresión de la angiogénesis por la estimulación del receptor Toll-like 3 podría justificar los efectos terapéuticos de pIC en el tumor de animales inmunodeprimidos (Kleinman ME y cols 2008, Bergé M y cols 2010).

En resumen, es éste un estudio de prueba de un concepto muy novedoso en el que se aborda por fin una hipótesis sugerida empíricamente por algunos autores pero que nadie se había aventurado a contrastar funcionalmente sobre lesiones endometriósicas in-vivo.

Nosotros creamos un modelo de ratón de endometriosis con el uso de tejido endometrial humano transgénico diseñado para expresar la proteína fluorescente mCherry con el fin de investigar los efectos de tratamiento con pIC-PEI.

El efecto de pIC-PEI cursó con efectos muy drásticos sobre la vascularización, proliferación celular y la apoptosis lo que garantiza el estudio de esta opción de tratamiento para dicha enfermedad.

También se observó una disminución del tamaño de la lesión endometriósica aunque las diferencias encontradas respecto al grupo control no fueron significativas.

Las limitaciones del modelo animal (estudio a corto plazo) han podido ocasionar que no se puedan apreciar o reflejar los posibles efectos estadísticamente significativos sobre el tamaño de la lesión que es posible que hubieran sido evidentes con un periodo temporal mayor de estudio.

A tenor de nuestros hallazgos, cabría esperar resultados prometedores en un estudio a largo plazo más potente, administrando cantidades mayores y durante más tiempo y se podría incluso plantear ensayos clínicos en humanos.





7. CONCLUSIÓN





7. CONCLUSIÓN

- La obtención, marcaje fluorescente y posterior implantación de tejido endometrial humano en ratones permite la reproducción fiel de la endometriosis así como la monitorización no invasiva del desarrollo de la enfermedad en un modelo inmunodeprimido.
- El pIC-PEI en un modelo murino heterólogo no disminuye el tamaño de la lesión endometriósica.
- El pIC-PEI provoca aumento de la apoptosis, disminución de la neovascularización y disminución de la proliferación celular en los implantes.
- Si estudios posteriores, con evaluación de tamaño de la lesión a largo plazo confirman nuestros hallazgos, el uso del pIC-PEI podría incorporarse como arma terapéutica de uso clínico para tratar la endometriosis en el futuro.



8. BIBLIOGRAFÍA





8. BIBLIOGRAFÍA

A

Abou-Setta AM, al-Inany HG, Farquhar CM. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 4. Art. No.: CD005072. 2006.

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.

Adamson D. Surgical Management of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003; 21:223.

Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 2010;94:1609-15.

Adamson, G.D. Endometriosis classification: an update. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2011. 23, 213–220.

Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Oral consumption of Green tea polyphenols inhibits insuline-like growth factor-I-induced signalling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64:8715-8722.

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

Aitken E, Khaund A, Hamid SA, Millan D, Campbell S. The normal human myometrium has a vascular spatial gradient absent in small fibroids. *Hum Reprod* 2006;21:2669–78.

Alcázar JL1, Errasti T, Jurado M. Blood flow in functional cysts and benign ovarian neoplasms in premenopausal women. *J Ultrasound Med.* 1997 Dec;16(12):819-24.

Al-Fozan, H., Tulandi, T. Left lateral predisposition of endometriosis and endometrioma. *Obstet. Gynecol.* 2003. 101, 164–6.

Al-Jefout M, G. Dezarnaulds, M. Cooper, N. Tokushige, G.M. Luscombe, R. Markham I.S. Fraser. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study. *Human Reproduction*, Volume 24, Issue 12, 1 December 2009,

Alonso-Curbelo D, Soengas MS. Self-killing of melanoma cells by cytosolic delivery of dsRNA: wiring innate immunity for a coordinated mobilization of endosomes,

autophagosomes and the apoptotic machinery in tumor cells. *Autophagy* 2010;6:148–50.

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.

Aranda F, Vacchelli E, Obrist F, Eggermont A, Galon J, Sautes-Fridman C, Cremer I, Henrik Ter Meulen J, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial Watch: Toll-like receptor agonists in oncological indications. *Oncoimmunology*. 2014; 3: e29179.

Azem, F., Lessing, J.B., Geva, E., Shahar, A., Lerner-Geva, L., Yovel, I., Amit, A. Patients with stages III and IV endometriosis have a poorer outcome of fertilization-embryo transfer than patients with tubal infertility. 1999. *Fertil. Steril.* 72, 1107–9.

B

Bachmann F. The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects. *Thromb Haemost* 1995; 74: 172–9

Badawy SZ, Cuenca V, Stitzel A, Jacobs RD, Tomar RH. Autoimmune phenomena in infertile Patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 63: 271–275.

Balasz 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;12:2046–50.

Banerjee SK, Ballard KD, Wright JT. Endometriomas as a Marker of Disease Severity. *J Minimally Invasive Gynecol.* 2008; 5: 538–540.

Barbieri R. Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:565–67.

Barbieri RL, Evans S, Kistner RW. Danazol in the treatment of endometriosis: analysis of 100 cases with a 4-year follow-up. *Fertil Steril* 1982; 37:737.

Barbieri RL, Niloff JM, Bast RC, Scaetzl E, Kistner RW, Knapp RC. Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1986; 45:630–34.

Barbieri RL, Hornstein MD. Medical therapy for endometriosis. En: Wilson EA, ed. *Endometriosis*. Alan R. Liss. Nueva York, 1987: 111–140.

Barbieri, R.L. Stenosis of the external cervical os: an association with endometriosis in women with chronic pelvic pain. 1998. *Fertil. Steril.* 70, 571–3.

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.



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.

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.

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; 18:1686-92.

Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ. A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol.* 2006 Jun; 168(6):2074-84.

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103:159-65.

Berge M, Bonnin P, Sulpice E, Vilar J, Allanic D, Silvestre JS, et al. Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2010;177:3192-201.

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.

Bergqvist I: "Hormonal regulation of endometriosis and the rationales and effects of gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment: a review". *Hum Reprod* 1995; 10: 446-452.

Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:48-59.

Berube S, Marcoux S, Langevin M, Maheux R, and The Canadian Collaborative Group of Endometriosis. Fecundity of infertile women with minimal or mild endometriosis and women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998; 69:1034.

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; 131bv(4):367-72.

Bischoff, F.Z., Simpson, J.L. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. 2000. *Hum. Reprod. Update* 6, 37–44.

Blumberg, N. Tumor angiogenesis factor speculations on an approach to cancer chemotherapy. 1974, *Yale Journal of Biology and Medicine* 47, 71–81.

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.

Boyle Dy McCluggage G. Peritoneal stromal endometriosis: a detailed morphological análisis of a large series of cases of a common and under-recognised form of endometriosis. 2009, *J. Clin. Pathol.*

Brenner C, Wohlgemuth S. Scar endometriosis. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:538.

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.

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.

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.

Bruner-Tran KL, Osteen KG, Duleba AJ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(7):2489–94.

Bruse C, Bergqvist A, Carlstrom K, Fianu-Jonasson A, Lecander I, Astedt B. Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril*. 1998 Nov;70(5):821–6.

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.

Bussaca M, Somigliana G, Bianchi S, Post-operative Ngr. Analogue treatment alter conservative surgery for syntomatic endometriosis stage IIIIV; a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001; 16:2399.

Buzdar AU. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial: an update. *Clin Breast Cancer* 2004; 5 Suppl 1:S6–12.



C

- Cakmac H, Basar M, Seval-Celik Y, Osteen KG, Duleba AJ, Taylor HS, Lockwood CJ, Arici A. *Reprod Sci.* 2012 Jan 19. In press.
- 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.
- Canis, M., Donnez, J.G., Guzick, D.S., Halme, J.K., Rock, J. a., Schenken, R.S., Vernon, M.W., 1997. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil. Steril.* 67, 817–821.
- Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 1999;398:381.
- Casslen B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert ME, Lund LR. Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (uPA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the uPA receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995b; 80: 2776-83
- Ceccaroni, M., Clarizia, R., Cosma, S., Pesci, A., Pontrelli, G., Minelli, L., 2011. Cyclic sciatica in a patient with deep monolateral endometriosis infiltrating the right sciatic nerve. *J. Spinal Disord. Tech.* 24, 474–8.
- 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.
- Celik O, Hascalik S, Elter K, Tagluk ME, Gurates B, Aydin NE. Combating endometriosis by blocking proteasome and nuclear factor-kappaB pathways. *Hum Reprod.* 2008 Nov;23(11):2458-65.
- 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.
- Chapron C, Fauconnier A, Vieira M, Barakat H, Dousset B, Pansini V, Vacher-Lavenu MC, Dubuisson JB. Anatomical distribution of deeply endometriosis: surgical implications and proposition for a classification. *Hum Reprod* 2003;18:157-61
- 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* 2001; 9:115-119.
- Chapron, C., Chopin, N., Borghese, B., Foulot, H., Dousset, B., Vacher-Lavenu, M.C., Vieira, M., Hasan, W., Bricou, A., 2006. Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution. *Hum. Reprod.* 21, 1839–45.

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.

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.

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; 26:423-38.

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.

Chew V, Tow C, Huang C, Bard-Chapeau E, Copeland NG, Jenkins NA, Weber A, Lim KH, Toh HC, Heikenwalder M, et al. Toll-like receptor 3 expressing tumor parenchyma and infiltrating natural killer cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(23):1796-807.

Ciombor KK, Berlin J2. Targeting metastatic colorectal cancer - present and emerging treatment options. *Pharmgenomics Pers Med.* 2014 Jul 8;7:137-44.

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.

Conforti R, Ma Y, Morel Y, Paturel C, Terme M, Viaud S, Ryffel B, Ferrantini M, Uppaluri R, Schreiber R, Combadière C, Chaput N, André F, et al. Opposing Effects of Toll-like Receptor (TLR3) Signaling in Tumors Can Be Therapeutically Uncoupled to Optimize the Anticancer Efficacy of TLR3 Ligands. *Cancer Research.* 2010; 70: 490-500.

Cornillie, F.J., Oosterlynck, D., Lauweryns, J.M., Koninckx, P.R., 1990. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil. Steril.* 53, 978-83.

Cramer DW, Missmer SA. the epidemiology of endometriosis. *Ann N y Acad Sci* 955:11,2002

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;23:1910-16.



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.

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.

Crosignani PG, Luciano A, Ray A, Bergqvist A. Medroxyprogesterone acetate versus leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain. *Hum Reprod*. 2006;21(1):248-323.4.

Cui Z, Qiu F. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) as a potent peptide vaccine adjuvant: therapeutic activity against human cervical cancer in a rodent model. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55: 1267-79.

D

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.

D'Hooghe T, Hummelshoj L. Multidisciplinary centres/networks of excellence for Endometriosis management and research: a proposal. *Hum Reprod* 2006;21: 2743-8.

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.

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.

Daftary GS, Taylor HS. EMX2 gene expresión in the female reproductive tract and aberrant expresión in the endometrium of patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2390-6.

Danenberg 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.

Davis GD, Thillet E, Lindemann J. Clinical characteristics of adolescent endometriosis. *J Adolesc Health*. 1993 Jul;14(5):362-8.

Delgado-Rosas F, Gomez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simon C, Pellicer A. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction*. 2011 Nov; 142(5):745-55.

Dmowski W., Radwanska E. Current concepts on pathology, histogénesis and etiology of endometriosis. *Acta Obstet Ginecol (suppl)*. 1984; 123-29

Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F: "Three dimensional architectures of peritoneal endometriosis". *Fertil Steril* 1991; 57: 980-983.

Donnez J, Pirard C, Smets M, Jadoul P, Squifflet J. Pre-and post-surgical management of endometriosis. *Semin ReprodMed* 2003;21:235.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor in endometriosis. *Hum. Reprod*. 1998; 13:1686-90.

Donnez J, Spada F, Squifflet J, Nisolle M. Bladder endometriosis must be considered as bladder adenomyosis. *Fertil Steril* 2000;74:1175.

Dunselman GA, Bouckaert PX, Van Wersch JW, Brommer EJ, Evers JL. Fibrinolytic properties of peritoneal fluid in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1988; 26: 302-7

E

Eggermont J, Donnez J, Casanas-Roux F, Scholtes H, Van Langendonck A. Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertil Steril* 2005;84:492-9.

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.

Eskenazi B, Warner M, Bonsignore L, Olive D, Samuels S, Vercellini P. Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:929-35.

Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24:235-58.

Estornes Y, Micheau O, Renno T, Lebecque S. Dual role of TLR3 in inflammation and cancer cell apoptosis. In: Siregar Y, editor. *Oncogene and Cancer - from Bench to Clinic*. Novi Sad (Croatia). INTECH; 2013. p. 247-70.

Evers JL, Dunselman GA, Van der Linden PJ. Markers for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 7:715-739.

F

Falcone T, Lebovic DI. Clinical Management of endometriosis. *Obstet and Ginecol* 2011; 118:691-705

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;10:4865-73.

Fedele L, Bianchi S, Bocciolone L, Di Nola G, Parazzini F. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1992;79:767.

Fedele L, Bianchi S, Raffaelli R, Portugese A. Pre-operative assessment of bladder endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12:2519-2522.

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.

Fedele L, Berlanda N. Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2004; 9(1):167-77.

Feng D, Menger MD, Laschke MW. Vascular disrupting effects of combretastatin A4 phosphate on murine endometriotic lesions. *Fertil Steril* 2013; 100:1459-67.

Fernandez-Rey CL, Alvarez-Gonzalez SA, Diaz-Solis P, Blanco-Gonzalez A, Costilla-Garcia S. Small bowel obstruction secondary to ileal endometriosis multisection computer tomography evaluation. *Rev Esp Enferm Dig* 2009;101:872-4.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: Therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29(Suppl16):10-14

Field AK, Tytell AA, Lampson GP, Hilleman MR. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;58:1004-10.

Fischer S, Nishio M, Peters SC, Tschernatsch M, Walberer M, Weidemann S, Heidenreich R, Couraud PO, Weksler BB, Romero IA, Gerriets T, Preissner KT. Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB J*. 2009 Jul;23(7):2100-9.

Fisher JC, Cooperband SR, Mannick JA. The effect of polyinosinicpolycytidylic acid on the immune response of mice to antigenically distinct tumors. *Cancer Res* 1972;32:889-92.

Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):15-8.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267(16):10931-4.

Forte G, Rega A, Morello S, Luciano A, Arra C, Pinto A, Sorrentino R. Polyinosinic-polycytidylic acid limits www.impactjournals.com/oncotarget 32903 Oncotarget tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer. *J Immunol*. 2012; 188: 5357-64.

Fortin M, Lepine M, Merlen Y, Thibeault I, Rancourt C, Gosselin D, Hugo P, Steff AM: Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of endometriosis. *Mol Ther* 2004, 9:540–47

Fortin M, Lepine M, Page M, Osteen K, Massie B, Hugo P, Steff AM: An improved mouse model for endometriosis allows noninvasive assessment of lesion implantation and development. *Fertil Steril* 2003, 80(Suppl 2):832–8

Foster DC, Stern JL, Buscema J, Rock JA, Woodruff JD. Pleural and parenchymal pulmonary endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1981 Nov;58(5): 552-6.

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.

Freeman AI, Al-Bussam N, O'Malley JA, Stutzman L, Bjornsson S, Carter WA. Pharmacologic effects of polyinosinic-polycytidylic acid in man. *J Med Virol* 1977;1:79–93.

Fujimura T, Nakagawa S, Ohtani T, Ito Y, Aiba S. Inhibitory effect of the polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma. *Eur J Immunol* 2006;36:3371–80.

G

Gagne D, Rivard M, Page M, Lepine 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.

García-Pascual CM, Zimmermann RC, Ferrero H, Shawber CJ, Kitajewski J, Simón C, Pellicer A, Gómez R. Delta-like ligand 4 regulates vascular endothelial growth factor receptor 2-driven luteal angiogenesis through induction of a tip/stalk phenotype in proliferating endothelial cells. *Fertil Steril.* 2013 Dec;100(6):1768-76.e1

García-Pascual CM, Ferrero H, Juárez I, Martínez J, Villanueva A, Pozuelo-Rubio M, Soengas M, Tormo D, Simón C, Gómez R, Pellicer A. Evaluation of the antiproliferative, proapoptotic, and antiangiogenic effects of a double-stranded RNA mimic complexed with polycations in an experimental mouse model of leiomyoma. *Fertil Steril.* 2016 Feb;105(2):529-38.

Gargett C, Weston G, Rogers P. Mechanisms and regulation of endometrial angiogenesis. *Reprod Med Rev* 2002; 10: 45- 61.

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

Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis therapy. *Semin Oncol* 2004;31:2-11.

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.

Giannarini, G., Scott, C.A., Moro, U., Grossetti, B., Pomara, G., Selli, C., 2006. Cystic endometriosis of the epididymis. *Urology* 68, 203.e1-3.

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.

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.

Gomez R, Gonzalez-Izquierdo M, Zimmermann RC, Novella-Maestre E, Alonso-Muriel I, Sanchez-Criado J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Low-dose dopamine agonist 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.

Gomez R, Ph.D., Antonio Abad, M.D., Francisco Delgado, Ph.D., Silvia Tamarit, M.D., Carlos Simon, M.D. and Antonio Pellicer, M.D. Effects of hyperprolactinemia treatment with the dopamine agonist quinagolide on endometriotic lesions in patients with endometriosis-associated hyperprolactinemia. *Fertility and Sterility* Vol. 95, No. 3, March 1, 2011

Greenberg LH, Slayden OD. Human endometriotic xenografts in immunodeficient RAG-2/gamma(c)KO mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jun;190(6):1788-96

Gresser, I. Antitumor effects of interferon. In: "Advances in Cancer Research" (G. Klein, S. Weinhouse, and A. Haddow, Eds.), Vol. 16, p. 97. Academic Press, New York, 1972.

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.

Grummer R, Schwarzer F, Bainsczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler

AE, Winterhager E. Peritoneal endometriosis: Validation of an invivo model. *Hum Reprod.* 2001 Aug;16(8):1736-43.

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.

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.

Guo Z, Chen L, Zhu Y, Zhang Y, He S, Qin J, et al. Double-stranded RNA-induced TLR3 activation inhibits angiogenesis and triggers apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 2012;27:396-402.

H

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;95:1574-78.

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.

Halban, J. *Wien. klin. Wchnschr.* 1924;37:1205.

Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F., Raj, S.G., Talbert, L.M., 1984. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* 64, 151-4.

Harashima N, Inao T, Imamura R, Okano S, Suda T, Harada M. Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61: 667-76.

Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N. Low dose oral contraceptive pill for dismenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril* 2008;90:1583.

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.

Hemmings R, Bissonnette F, Bouzayen R. results of laparoscopic treatments of ovarian endometriomas: laparoscopic ovarian fenestration and coagulation. *Fertil Steril* 1994;70:527.



Herington JL, Bruner-Tran KL, Lucas JA, Osteen KG. Immune interactions in endometriosis. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7:611–26.

Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterisation of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 216–22

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.

Hornstein MD, Thomas PP, Gleason RE, Barbieri RL. Menstrual cyclicity of CA 125 in patients With endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58:279–283.

Huang YK, Zheng Z, Cheng CX, Wang LY, Li YR, Qiu F. The antitumor effect of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid as an adjuvant. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62: 237–44.

Huges E, Fedorkow D, Collins J, Vandekerckhove P. Ovulation suppression for endometriosis, *Cochrane Database Syst Rev* 2003:CD0000155.

Hull M. Louise, Escareno Claudia Rangel, Godsland Jane M., Doig John R., Johnson Claire M., Phillips Stephen C., Smith Stephen K., Tavare Simon, Print Cristin G., and Charnock-Jones D. Stephen. Endometrial peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment. *The American Journal of Pathology*, Vol. 173, No. 3, September 2008

Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BD, et al. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2889–99.

I

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.

Jacobson, T.Z., Duffy, J.M., Barlow, D., Farquhar, C., Koninckx, P.R., Olive, D., 2002 and 2010. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. *Cochrane database Syst. Rev.* CD001398.

J

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.

Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 355–58

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.

K

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.

Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer* 2007;96:1788-95.

Kawahara T, Douglas DN, Lewis J, Lund G, Addison W, Tyrrell DL, et al. Critical role of natural killer cells in the rejection of human hepatocytes after xenotransplantation into immunodeficient mice. *Transpl Int* 2010;23:934-43.

Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., Hummelshoj, L., Prentice, A., Saridogan, E., Koninckx, P., Matorras, R., Mueller, M., Garcia-Velasco, J., 2005. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum. Reprod.* 20, 2698-2704.

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.

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.

Kitawaki J, Kusuki I, Koshiha 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.

Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008;452:591-7.

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.

Koninckx P, Martin D. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction, or possibly adenomyosis externa. *Fertil Steril.* 1992;58:924-28.



Kovoor, E., Nassif, J., Miranda-Mendoza, I., Wattiez, A., 2010. Endometriosis of bladder: outcomes after laparoscopic surgery. *J. Minim. Invasive Gynecol.* 17, 600–4.

Kreider, J. W., and Benjamin, S. A. Tumor immunity and the mechanism of poly I:C inhibition of tumor growth. *J. Nat. Cancer Inst.* 49, 1303 (1972).

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.

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.

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.

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.

L

Lampson, G. P., Nemes, M. M., Field, A. K., Tytell, A. A., and Hilleman, M. R. The effect of altering the size of poly C on the toxicity and antigenicity of poly I:C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141, 1068 (1972).

Larsen WJ. *Human embryology* England: Churchill Livingstone, 1993: 167-204.

Laschke MW, Menger MD. and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):331-42.

Laufer, M., 2000. Premenarcheal Endometriosis Without an Associated Obstructive Anomaly: Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Fertil. Steril.* 74, S15.

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.

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.

Levine AS, Sivulich M, Wiernik PH, Levy HB. Initial clinical trials in cancer patients of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid stabilized with poly-L-lysine, in

carboxymethylcellulose [poly(ICLC)], a highly effective interferon inducer. *Cancer Res* 1979;39:1645–50.

Levy HB, Law LW, Rabson AS. Inhibition of tumor growth by polyinosinicpolycytidylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;62:357–61.

Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1278-86.

Lindsay FC. Medical and endocrine modulatory treatment. En: Shaw RW. *Endometriosis Current Understanding and Management*. Blackwell Science Ltd., Oxford, 1995; 187-205.

Liu B, Wang NN, Wang ZL, Hong SS, Li JT, Ding HJ, et al. Improved nude mouse models for green fluorescence human endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36:1214–21.

López Lopes E, López Martínez C (2009). Actualización en el tratamiento de la endometriosis con Análogos de la GnRH.

Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence DA. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2956-60

Luciano AA. Danazol treatment of endometriosis-associated pain. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006; 13(6):523-4.

M

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.

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.

Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril*. 2008 Jul;90(1): 148-55.

Machairiotis, N., Stylianaki, A., Dryllis, G., Zarogoulidis, P., Kouroutou, P., Tsiamis, N., Katsikogiannis, N., Sarika, E., Courcoutsakis, N., Tsiouda, T., Gschwendtner, A.,



- Zarogoulidis, K., Sakkas, L., Baliaka, A., Machairiotis, C.. Extrapelvic endometriosis: a rare entity or an under diagnosed condition? . 2013, *Diagn. Pathol.* 8, 194.
- 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.
- Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertil Steril.* 2010 Oct;94(5):1894-9.
- Mansour G, Aziz N, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertil Steril.* 2009 Jul;92(1):61-7.
- 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.
- Martinez S, Garrido N, Coperias JL, Pardo F, Desco J, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Hum Reprod.* 2007; 22(3):836-42.
- Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, et al. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1925-30.
- Matalliotakis I, Panidis D, Vlassis G, Neonaki M, Goumenou A, Koumantakis E. Unexpected increase of CA19-9 tumour marker in patients with endometriosis. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998; 19:498-500.
- Mathur S, Peress MR, Williamson HO. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp. Immunol.* 1982; 50: 259-66.
- Matorras R, Rodriguez F, Pijoan JI, Etxanojauregui A, Neyro JL, Elorriaga MA, Rodriguez-escudero FJ. Women who are not exposed spermatozoa and infertile women have similar rates of stage I endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76:923-928.
- Matsumoto M, Seya T. TLR3: interferon induction by doublestranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60 (7):805-12.
- Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K. Reproduction of menstrual changes in

transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Hum Reprod.* 2005 Jun;20(6):1477-84.

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;82:1309-15.

Matsuzaki, S., Darcha, C., Maleysson, E., Canis, M., Mage, G., 2010. Impaired down-regulation of E-cadherin and beta-catenin protein expression in endometrial epithelial cells in the mid-secretory endometrium of infertile patients with endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 3437-45.

McKay LI, Cidlowski ja. Molecular control of immune inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptorsignaling pathways. *Endocr Rev* 1999;20:435-59.

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; 98:482-89.

McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod* 2000;6:45-55.

Meyer, R., 1919. The status of adenomyosis and adenomyoma, with a discussion of seroepithelial adenomyosis and sarcomatose adeno-myometritis. *Zel Gynaecol* 43, 745-50.

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.

Moen MH. Is a long period without childbirth a risk factor for developing endometriosis?. *Hum Reprod*, 1991;6:1404.

Moghissi KS. Medical treatment of endometriosis. *ClinObstet Gynecol.* 1999 Sep; 42(3):620-32.

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.

Muneyyirci-Delale O, Karacan M. Effect of norethindrone acetate in the treatment of symptomatic endometriosis. *Int J Fertil Womens Med*, 1998; 43:24.

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.



N

- 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.
- 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
- Nawroth, F., Rahimi, G., Nawroth, C., Foth, D., Ludwig, M., Schmidt, T., 2006. Is there an association between septate uterus and endometriosis? *Hum. Reprod.* 21, 542-4.
- Nelson JE, Kay MA. Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8902-7.
- 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.
- 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.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59:681-84.
- Nisolle, M., Paindaveine, B., Bourdon, A., Berlière, M., Casanas-Roux, F., Donnez, J., 1990. Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women. *Fertil. Steril.* 53, 984-8.
- Nnoaham, K.E., Hummelshoj, L., Webster, P., D'Hooghe, T., de Cicco Nardone, F., de Cicco Nardone, C., Jenkinson, C., Kennedy, S.H., Zondervan, K.T., 2011. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil. Steril.* 96, 366-373.e8.
- Nothnick WB, Curry TE, Vernon MW. Immunomodulation of rat endometriotic implant growth and protein production. *Am J Reprod Immunol.* 1994 Mar-Apr;31(2-3):151-62.
- Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2003;76:223-31.
- Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, et al. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24:1025-35.

O

Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, et al. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J* 2005; 19:1839–41.

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;23:2701–708.

Olive, D.L., Henderson, D.Y., 1987. Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet. Gynecol.* 69, 412–5.

Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:319–28.

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.

Oosterlynck DJ1, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M, Koninckx PR. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1993 Apr;59(4):778-82.

Operative Laparoscopy Study Group. Postoperative adhesion development after operative laparoscopy:evaluation at early second-look procedures. *Fertil Steril* 1991;55:700.

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;20:4420-27.

Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 2001;16:561-66.

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):1146-151.

Ozer H, Boztosun A, Açmaz G, Atilgan R, Akkar O.B, Kosar M.I. The efficacy of bevacizumab, sorafenib and retinoic acid on rat endometriosis model. *Reprod Sci.* 2013 Jan; 20(1):26-32.



P

Parrilla JJ, Aznar J, Díez E. Actividad fibrinolítica del endometrio. *Tokoginecol Pract* 1972; 31: 391

Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, et al. 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;146:1301–11.

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.

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. 177-83.

Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohí, J., Simón, C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. , 1998, *Fertil. Steril.* 70, 425–31.

Peng L, Bu Z, Zhou Y, Ye X, Liu J, Zhao Q. Hemorrhagic events in cancer patients treated with aflibercept: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014 Sep;35(9):9419-27.

Pittaway DE, Fayez JA. Serum CA-125 antigen levels increase during menses. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:75-76.

Pollack IF, Jakacki RI, Butterfield LH, Hamilton RL, Panigrahy A, Potter DM, et al. Antigen-specific immune responses and clinical outcome after vaccination with glioma-associated antigen peptides and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in children with newly diagnosed malignant brainstem and nonbrainstem gliomas. *J Clin Oncol* 2014;32:2050–8.

Pollacco J, Sacco K, Portelli M, Schembri-Wismayer P, Calleja-Agius J. Molecular links between endometriosis and cancer. *Gynecol Endocrinol* 2012;28:577–81.

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.

R

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.

- Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA, Meresman GF, Baranao RI. Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci.* 2011 Jul;18 (7):614-22.
- Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:343-52
- Rier S, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2003;21:145-54.
- Robinson RA, DeVita VT, Levy HB, Baron S, Hubbard SP, Levine AS. A phase III trial of multiple dose polyribonucleoside-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1976;57:599-602.
- 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;24:608-18.
- Rokitansky C. Ueber uterusdrüsen neubildung in uterus und ovarial sarcomen. *Zeitschrift Gessellschaft der Aerzte in Wien.* 1860;16:577-81
- Ruffo, G., Sartori, A., Crippa, S., Partelli, S., Barugola, G., Manzoni, A., Steinasserer, M., Minelli, L., Falconi, M., 2012. Laparoscopic rectal resection for severe endometriosis of the mid and low rectum: technique and operative results. *Surg. Endosc.* 26, 1035-40.
- Russell, W., 1899. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of müllerian origin. *Bull. John Hopkins Hospi.* 10, 8 - 10.
- Rychlik DF, Bieber EJ. Thoracic endometriosis syndrome resembling pulmonary embolism. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2001;8:445.

S

- Salaun B, Zitvogel L, Sselin-Paturel C, Morel Y, Chemin K, Dubois C, Massacrier C, Conforti R, Chenard MP, Sabourin JC, et al. TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(5):1607-14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3490
- Salazar AM, Erlich RB, Mark A, Bhardwaj N, Herberman RB. Therapeutic in situ autovaccination against solid cancers with intratumoral poly-ICLC: case report, hypothesis, and clinical trial. *Cancer Immunol Res* 2014;2:720-4.
- Saleh A, Tulandi T. Reoperation after laparoscopic treatment of ovarian endometriomas by Excision and by fenestration. *Fertil Steril* 1999;72:322.
- Salem ML, Kadima AN, Cole DJ, Gillanders WE. Defining the antigen-specific



T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J Immunother*. 2005; 28: 220-8.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-9

Sampson, J., 1925. Heterotopic or misplaced endometrial tissue. *Br J Obs. Gynaecol* (10), p. 649.

Sánchez-Fernandez 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.

Sasson, I.E., Taylor, H.S., 2008. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1127, 106–15. doi:10.1196/annals.1434.014

Schlaff WD, Dugoff L, Damewood MD, Rock JA. Megestrol acetate in the treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol* 1990;75:646.

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.

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.

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.

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.

Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N. Ovarian steroid regulation Of vascular endotelial 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.

Shippen ER, West WJ Jr. Successful treatment of severe endometriosis in two premenopausal Women with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 2004; 81:1395–8.

Signorile, P.G., Baldi, F., Bussani, R., D'Armiento, M., De Falco, M., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A., 2010. New evidence of the presence of endometriosis in the human fetus. *Reprod. Biomed. Online* 21, 142–7.

- Simoens S, Hummelshoj L, D'Hooghe T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update* 2007;13:395-404.
- Simón, C., Gutiérrez, A., Vidal, A., de los Santos, M.J., Tarín, J.J., Remohí, J., Pellicer, A., 1994. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum. Reprod.* 9, 725-9.
- 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; 77:1028-31.
- Somigliana E, Vercellini P, Viganò P, Benaglia L, Crosignani PG, Fedele L. Non-invasive diagnosis of endometriosis: the goal or own goal?. *Hum Reprod.* 2010 Aug;25(8):1863-8.
- 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.
- Speroff L, Fritz MA. Endometriosis. En su: *Endocrinología ginecológica, clínica y esterilidad*. 2º ed. Madrid, Lippincott William and Wilkins 2006. Pp 1103-33
- Speroff L, Glass LH, NJK. Endometriosis. *Endocrinología ginecológica e infertilidad*. L. W. a. Wilkins. Madrid, España. Waverly Hispánica SA 1999; 1058-63
- Stockwell J. Endometriosis: clinical assessment and medical management. *Adv Nurse Pract.* 2006; 14(1):43-5.
- Stratton P, Berkley KJ. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update.* 2011 May-Jun;17(3):327-46.
- 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; 79:1078-85.
- 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.
- Sung, L., Mukherjee, T., Takeshige, T., Bustillo, M., Copperman, A.B., 1997. Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14, 152-6.
- Suo G, Sadarangani A, Lamarca B, Cowan B, Wang JY. Murine xenograft model for human uterine fibroids: an in vivo imaging approach. *Reprod Sci* 2009;16:827-42.



Surrey ES. The role of progestins in treating the pain of endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006; 13(6):528-34.

T

Taff L, Jones S. Cesarean Scar endometriosis. A report of two cases. *J Reprod Med*. 2002;47:50-2.

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.

Tamura K, Sakurai T, Kogo H. Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial Growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascular Pharmacol*. 2006;44:411-416.

Tang FY, Meydani M. Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. *Nutr Cancer*. 2001;41:119-25.

Tasuku H. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001, 76:1-10.

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.

Tokushige N, Robert Markham, Peter Russell Ian S. Fraser. Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Human Reproduction*, Volume 21, Issue 11, 1 November 2006

Tom Maniatis , *Molecular cloning: A laboratory manual*, 1982

Tormo D, Checinska A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, et al. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 2009;16:103-14.

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.

Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, et al. interleukin-6 secretion is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from Women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:1118-22.

U

Umezawa M, Saito Y, Tanaka-Hattori N, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. Expression

profile of extracellular matrix and adhesion molecules in the development of endometriosis in a mouse model. *Reprod Sci.* 2012 Dec;19 (12):1365-72.

V

Vacchelli E, Eggermont A, Sautes-Fridman C, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2013; 2: e25238.

Valle RF, Sciarra JJ. Endometriosis: treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2003;997:229-39.

Van Meijer M, Pannekoek H. Structure of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 1995; 9: 263-76

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.

Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Pietropaolo G, Pasin R, Crosignani PG. Use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhea that does not respond to a cyclic pill regimen.. *Fertil Steril.* 2003;80(3):560.

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.

Vercellini, P., Frontino, G., Pietropaolo, G., Gattei, U., Daguati, R., Crosignani, P.G., 2004. Deep endometriosis: definition, pathogenesis, and clinical management. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.* 11, 153-61.

Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E., Fedele, L., 2014. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 261-75.

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.

Via LE, Gore-Langton RE, Pluda JM. Current clinical trials administering the antiangiogenesis agent SU5416. *Oncology* 2000; 14: 1312-23

Vigano P, Somigliana E, Gaffuri B, Santorsolo R, Busacca M, Vignali M. Endometrial Release of soluble intercelular adhesión molecule 1 and endometriosis: relationship to the Extent of the disease. *Obstet Gynecol* 2000; 95:115-119.

Von Recklinghausen, F., 1896. Adenomyomas and cystadenomas of the wall of



the uterus and tube: their origin as remnants of the Wolffian body. *Wien Klin Wochenschr* 8:530.

W

Walter A, Hentz J, Magtibay P, Cornella J, Magrina J. Endometriosis: Correlation between Histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1407-1413.

Wang X, Zeng W, Murakawa M, Freeman MW, Seed B. Segregation of the adenovirus enhancer sequence by conditional genome rearrangement abrogates late viral gene expression. *J Virol*. 2000 Dec;74(23):11296-303.

Wang N, Hong S, Tan J, Ke P, Liang L, Fei H, Liu B, Liu L, Liu Y, Yu B. A red fluorescent nude mouse model of human endometriosis: advantages of a non-invasive imaging method. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 May;176:25-30.

Wang G, Natsuko Tokushige, Peter Russell, Sylvia Dubinovsky, Robert Markham, Ian S. Fraser, MD. Hyperinnervation in Intestinal Deep Infiltrating Endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009 Nov-Dec;16(6):713-9.

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.

Wei, Q., St Clair, J.B., Fu, T., Stratton, P., Nieman, L.K., 2009. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil. Steril*. 91, 1686-91.

Wood DH, Yochmowitz MG, Salmon YL, Eason RL, Boster RA. Proton irradiation and endometriosis. *Aviat Space Environ Med*. 1983 Aug;54(8):718-24.

Y

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;82:1023-28.

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.

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.

Yiu Juan Lin, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1278-86. Epub 2005 Nov 23.

Ylikorkala O, Makila UM. Prostacyclin and thromboxane in gynecology and obstetrics. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;152(3):318-29.

Yuan MM, Xu YY, Chen L, Li XY, Qin J, Shen Y. TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis. *BMC Cancer*. 2015; 15: 245.

Z

Zhu X, Nishimura F, Sasaki K, Fujita M, Dusak JE, Eguchi J, Fellows-Mayle W, Storkus WJ, Walker PR, Salazar AM, Okada H. Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigenderived peptide epitopes in murine CNS tumor models. *Journal of Translational Medicine*. 2007; 5: 1-15



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA