



Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Programa de Doctorado 3139 Medicina



**“Evaluación estandarizada del potencial antiangiogénico del agonista dopaminérgico en el tratamiento de la endometriosis”**

**Taqua Blanca Ruiz**

Dirigida por:

**Prof. Antonio Cano Sánchez**

**Dr. Raúl Gómez Gallego**

**Valencia, Junio 2018**





Imagen de portada:

Cortesía de Julia Larotonda

© JULIARO

<https://www.juliaro.com/>



Doctorado en Medicina



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

 Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

**“Evaluación estandarizada del potencial antiangiogénico del agonista dopaminérgico en el tratamiento de la endometriosis”**

**Taqua Blanca Ruiz**

**Valencia, 2018**

Dirigida por:

**Prof. Antonio Cano Sánchez**

**Dr. Raúl Gómez Gallego**





## Facultat de Medicina i Odontologia

**Antonio Cano Sánchez**, 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 programa Miguel Servet en INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: **“Evaluación estandarizada del agonista dopaminérgico en el tratamiento de la endometriosis”** ha sido realizado íntegramente por **Dña. Taqua Blanca Ruiz** bajo su supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL** ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia, a 27 de Julio de 2018.

Profesor Antonio Cano Sánchez

Dr. Raúl Gómez Gallego





## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi profesor Antonio Cano. Por ser el punto inicial en mi carrera profesional, mi primera referencia en un mundo nuevo. Por haber sabido transmitirme ilusión por mi profesión y por el campo de la investigación. Por confiar en mí, y darme la oportunidad de desarrollar este trabajo**

**A Raúl Gómez. Investigador tenaz y trabajador incansable. Por haber estado siempre en el lugar correcto en el momento adecuado. Por aclararme tantas dudas, acompañarme y estar siempre disponible. Por animarme cada vez que lo necesitaba. Trabajar contigo ha sido una experiencia maravillosa. No tengo palabras para describir mi agradecimiento.**

**Al magnífico equipo técnico de investigación del Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico de Valencia. Por todo el trabajo que desarrolláis, por ser el pilar fundamental sobre el que se sustenta toda investigación.**

**A Reyes Balanzá y a mis compañeros del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Dr. Peset. Por acogerme desde los inicios, por ser mi segunda familia. Con vosotros me he formado como profesional y he crecido como persona.**



**A Sergio Sánchez, por su aportación indispensable y desinteresada en este trabajo.  
Por dedicarme parte de tu tiempo y conocimiento.**

**A todas aquellas personas que, de una forma u otra, habéis contribuido a que este  
trabajo sea una realidad. No puedo nombraros a todos. Una palabra, una sonrisa,  
una mirada...**

**Y cómo no, a mi familia. Por ser como son y estar siempre disponibles. Por hacer  
del hogar un lugar de paz y descanso, tan necesario en ciertos momentos. Por  
apoyar mis ilusiones y ayudarme a conseguirlas. Por todos esos momentos mágicos  
que me regalais a diario.**

**Y, muy especialmente, a mi padre, que se fue para siempre, dejando el sabor  
amargo de su ausencia y el consuelo de su memoria. Que Dios lo acoja junto a Él.**

**Gracias a Dios, por haberos puesto a todos en mi camino.**





## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>Concepto y generalidades</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2</b>	<b>Epidemiología</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3</b>	<b>Etiopatogenia</b> .....	<b>23</b>
1.3.1	Teoría de la implantación por menstruación retrógrada .....	23
1.3.2	Teoría de la metaplasia celómica.....	24
1.3.3	Teoría de las células progenitoras que se originan en la médula ósea.....	25
1.3.4	Teoría del trasplante mecánico .....	25
1.3.5	Teoría de la difusión hematógena y linfática.....	26
1.3.6	Teoría de los restos embrionarios Mülllerianos .....	26
<b>1.4</b>	<b>Factores moleculares en la etiopatogenia de la endometriosis</b> .....	<b>27</b>
1.4.1	Supervivencia de las células endometriales .....	27
1.4.2	Alteración del ambiente hormonal: dependencia estrogénica y resistencia a la progesterona.....	28
1.4.3	Alteraciones del sistema inmunológico .....	29
1.4.4	Adhesión e invasión de las células endometriales.....	29
1.4.5	Neuroangiogénesis, vasculogénesis y crecimiento.....	30
1.4.6	Inflamación .....	31
<b>1.5</b>	<b>Clasificación</b> .....	<b>33</b>
1.5.1	Localización de las lesiones.....	33
1.5.2	Características histológicas macroscópicas .....	33
1.5.2.1	Endometriosis ovárica .....	34
1.5.2.2	Endometriosis peritoneal .....	35
1.5.2.3	Endometriosis profunda .....	36
1.5.3	Características histológicas microscópicas .....	36
1.5.4	Sistemas de clasificación.....	37
<b>1.6</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	<b>40</b>
1.6.1	Anamnesis.....	40
1.6.2	Exploración física ginecológica .....	42
1.6.3	Exploraciones complementarias.....	42
1.6.3.1	Ecografía .....	42
1.6.3.2	Ecoendoscopia.....	43
1.6.3.3	Resonancia magnética.....	44
1.6.3.4	Marcadores bioquímicos .....	44
1.6.3.5	Otras pruebas complementarias .....	45
1.6.3.6	Laparoscopia.....	45
<b>1.7</b>	<b>Tratamiento</b> .....	<b>46</b>
1.7.1	Tratamiento expectante .....	46
1.7.2	Tratamiento quirúrgico.....	47
1.7.3	Tratamiento farmacológico .....	49
1.7.3.1	Antiinflamatorios no esteroideos (AINE).....	49
1.7.3.2	Tratamientos hormonales de uso clínico .....	50
1.7.3.2.1	Anticonceptivos orales combinados (ACO) .....	51



1.7.3.2.2	Gestágenos .....	52
1.7.3.2.3	Agonistas de la GnRH .....	53
1.7.3.2.4	Danazol .....	54
1.7.3.2.5	Gestrinona .....	54
1.7.4	Nuevas terapias en el tratamiento de la endometriosis.....	55
1.7.4.1	Tratamientos hormonales experimentales .....	55
1.7.4.1.1	Antagonistas de la GnRH .....	55
1.7.4.1.2	Inhibidores de la aromataasa .....	56
1.7.4.1.3	Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs).....	57
1.7.4.1.4	Moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SPRMs).....	57
1.7.4.2	Tratamientos no hormonales experimentales .....	57
1.7.4.2.1	Fármacos hipolipemiantes .....	58
1.7.4.2.2	Bifosfonatos.....	59
1.7.4.2.3	Fármacos inmunomoduladores.....	60
1.7.4.2.4	Bloqueantes del factor nuclear KappaB (FN-kB) .....	60
1.7.4.2.5	Terapias antiangiogénicas .....	61
1.7.4.2.5.1	Inhibidores selectivos de la COX-2: celecoxib .....	62
1.7.4.2.5.2	Té verde.....	63
1.7.4.2.5.3	Agonistas dopaminérgicos .....	63
1.7.4.2.5.3.1	Dopamina .....	64
1.7.4.2.5.3.2	Receptores dopaminérgicos.....	65
1.7.4.2.5.3.3	Tipos de agonistas dopaminérgicos .....	65
<b>1.8</b>	<b>Vasculogénesis, angiogénesis y endometriosis .....</b>	<b>67</b>
1.8.1	Concepto.....	67
1.8.2	Angiogénesis y endometriosis .....	69
1.8.3	Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	70
1.8.3.1	Papel del VEGF y sus receptores en la angiogénesis .....	73
1.8.3.2	Endometriosis y VEGF.....	74
1.8.3.3	Inhibidores comerciales del sistema VEGF .....	76
1.8.4	Agonistas dopaminérgicos, angiogénesis y endometriosis .....	79
1.8.4.1	Agonistas dopaminérgicos y regulación del sistema VEGF/VEGFR2 .....	79
1.8.4.2	Uso de agonistas dopaminérgicos en modelos animales de endometriosis.....	82
1.8.4.3	Uso de agonistas dopaminérgicos en humanos con endometriosis .....	84
<b>1.9</b>	<b>Modelos animales para el estudio de la endometriosis .....</b>	<b>86</b>
1.9.1	Modelos murinos homólogos.....	86
1.9.2	Modelos murinos heterólogos.....	88
<b>1.10</b>	<b>Justificación de realizar una evaluación estandarizada del potencial antiangiogénico del agonista dopaminérgico en el tratamiento de la endometriosis .....</b>	<b>90</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>99</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>101</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo principal .....</b>	<b>101</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos secundarios.....</b>	<b>101</b>



<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>103</b>
<b>4.1</b>	<b>Esquema temporal del protocolo de investigación .....</b>	<b>104</b>
<b>4.2</b>	<b>Modelo animal murino heterólogo de endometriosis.....</b>	<b>105</b>
<b>4.3</b>	<b>Obtención y procesamiento de las biopsias endometriales humanas .....</b>	<b>106</b>
4.3.1	Marcaje del tejido endometrial humano procesado .....	107
4.3.2	Implantación de los fragmentos de endometrio marcados en los ratones receptores .....	109
<b>4.4</b>	<b>Intervenciones farmacológicas.....</b>	<b>110</b>
4.4.1	Preparación y administración de los compuestos a estudio .....	110
4.4.2	Monitorización de peso para detección de toxicidad y estimación de dosis total .....	111
<b>4.5</b>	<b>Monitorización no invasiva del tamaño de la lesión .....</b>	<b>112</b>
4.5.1	Detección de la señal fluorescente.....	112
4.5.2	Cuantificación de la señal fluorescente .....	114
<b>4.6</b>	<b>Sacrificio y recuperación de las lesiones .....</b>	<b>115</b>
<b>4.7</b>	<b>Análisis histológico .....</b>	<b>117</b>
<b>4.8</b>	<b>Análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....</b>	<b>118</b>
4.8.1	Detección de Ki67 .....	120
4.8.2	Detección de VEGFR2 .....	121
4.8.3	Detección de apoptosis .....	122
4.8.4	Detección de vascularización.....	124
<b>4.9</b>	<b>Cuantificación de las imágenes de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....</b>	<b>126</b>
4.9.1	Adquisición de la imagen .....	126
4.9.2	Determinación total y específica de las áreas de interés en las imágenes de inmunofluorescencia para la cuantificación de la vascularización, madurez vascular y apoptosis .....	126
4.9.3	Determinación total y específica de las áreas de interés en las imágenes de inmunohistoquímica para la cuantificación de la proliferación .....	128
4.9.4	Determinación de la intensidad relativa de tinción de las imágenes de inmunohistoquímica para la cuantificación de VEGFR2.....	129
<b>4.10</b>	<b>QF-RT-PCR.....</b>	<b>130</b>
4.10.1	Amplificación de VEGF, angiopoyetina 1, VEGFR2, $\beta$ -actina y 18S mRNA transcrita .....	130
4.10.2	Cuantificación del ADNc .....	132
<b>4.11</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>133</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>135</b>
<b>5.1</b>	<b>Descenso de la intensidad media de fluorescencia como estimación de la reducción de tamaño de las lesiones endometriósicas.....</b>	<b>135</b>
5.1.1	Descenso de la intensidad media de fluorescencia por animal.....	140
5.1.2	Variación de la intensidad media de fluorescencia por lesión .....	143
<b>5.2</b>	<b>Análisis histológico .....</b>	<b>146</b>



5.3	Vascularización .....	150
5.4	Madurez vascular.....	152
5.5	Proliferación .....	155
5.6	Apoptosis.....	158
5.7	Determinación de VEGFR2 .....	161
5.8	Determinación de los niveles de VEGF, VEGFR2 y Ang 1 normalizados por el gen constitutivo	
18S	164	
5.9	Determinación de los niveles de VEGF, VEGFR2 y Ang 1 normalizado por el gen constitutivo $\beta$ -actina	
	166	
6	DISCUSIÓN.....	169
7	CONCLUSIONES .....	182
8	BIBLIOGRAFÍA.....	183



## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACO: anticonceptivos combinados orales.

ADN: ácido desoxirribonucleico; (DNA: deoxyribonucleic acid)

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario; (cDNA: complementary deoxyribonucleic acid)

AGGF1: angiogenic factor with G patch and FHA domains.

AINE: antiinflamatorio no esteroideo.

AMPc: adenosín mono fosfato cíclico.

Ang 1: angiopoyetina 1.

ARN: ácido ribonucleico; (RNA: ribonucleic acid)

ARNm: ácido ribonucleico mensajero; (mRNA: messenger ribonucleic acid)

ASRM: American Society of Reproductive Medicine.

$\alpha$ -SMA: alfa-actina del músculo liso; (alpha actin smooth muscle)

BSA: albúmina Sérica Bovina; (bovine serum albumin)

CCL2: quimioquina ligando 2.

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica.

COX-2: ciclooxigenasa 2.

DOPA: dihidroxifenilalanina.

D2R: receptor tipo 2 de la dopamina.



E1: estrona 1.

EGCG: epigallocatequina galato.

EPA: ácido eicosapentaenoico.

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embriology.

FDA: Food and Drug Administration

FN-KB: factor nuclear kappaB.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas.

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

IL-beta, IL-1, IL-6, IL-8: interleuquina beta, 1, 6, 8

IOD: integrated optical density

MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos.

MMP13, MMP10, MMP8, MMP7: metaloproteinasa de matriz 13, 10, 8,7.

PBS: phosphate buffered saline.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; (polymerase chain reaction).

PDTC: pirridolina ditiocarbamato.

PFA: paraformaldehído.

PG: prostaglandina

PGE2: prostaglandina E2.

PGF2 $\alpha$ : prostaglandina 2 $\alpha$



PIF: factor inhibidor de la prolactina; (prolactin inhibitory factor)

PIGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; (platelet inhibitory growth factor)

ROI: área de interés; (region of interest)

RT: transcripción reversa; (reverse transcriptase)

RT-QF-PCR: reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa o en tiempo real; (quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction).

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa; (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

RUNX1: runt-related transcription factor 1.

SEGO: Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología

SERMs: moduladores selectivos de los receptores de estrógenos; (selective estrogen receptor modulator)

SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica.

sICAM: soluble intercellular adhesion molecule 1.

SPRMs: moduladores selectivos de los receptores de progesterona; (selective progesterone receptor modulator).

SSAI: specific stained area of interest

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

TSAI: total specific area of interest



TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; (vascular endothelial growth factor).

VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3: Receptor tipo (1,2,3) del factor de crecimiento del endotelio vascular; (vascular endothelial growth factor receptor type 1,2, 3)

VEGF-A, VEGF-B, VEGFB-E: factor de crecimiento del endotelio vascular tipo A, B, E; (vascular endothelial growth factor type A, B, E).



**“EVALUACIÓN ESTANDARIZADA DEL POTENCIAL  
ANTIANGIOGÉNICO DEL AGONISTA DOPAMINÉRGICO EN EL  
TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS”**





# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 CONCEPTO Y GENERALIDADES

En 1880, el anatomopatólogo austriaco Von Rokitanski (Rokitanski, 1860) mencionó por primera vez esta patología, seguido posteriormente de otros autores como Von Recklinghausen (Speroff et al, 1999). En 1921 el médico norteamericano John Albert Sampson acuñó el término ‘endometriosis’ para describir las “*lesiones peritoneales*” que consideró “*siembras procedentes de enfermedad del ovario*” (Sampson, 1921); desarrollando más tarde su teoría de la ‘menstruación retrógrada’ como posible causa de la enfermedad (Sampson, 1927). Posteriormente han surgido numerosos estudios dirigidos a profundizar en el conocimiento de esta enfermedad.

En la actualidad la endometriosis se define como una patología ginecológica crónica, caracterizada por la presencia de glándulas y estroma endometrial funcionales fuera de la cavidad uterina, que induce una reacción inflamatoria crónica. Las localizaciones más habituales son el peritoneo, el ovario y el septo recto vaginal; en raras ocasiones, también se encuentran implantes en el diafragma, la pleura, la vejiga o incluso el pericardio (Speroff y Fritz, 2006).

Se trata de una patología estrógeno dependiente, por lo que afecta fundamentalmente a mujeres en edad reproductiva.



## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Esta patología afecta al 5-10% de mujeres en edad fértil (Cramer y Missmer, 2002; Rogers, 2002), si bien la incidencia real es desconocida, ya que en numerosas ocasiones cursa de forma asintomática, diagnosticándose de forma casual en intervenciones quirúrgicas realizadas por otro motivo. Si se considera de forma aislada a las pacientes con dolor pélvico crónico, la incidencia oscila entre el 40-60%, mientras que en pacientes con subfertilidad el porcentaje se eleva hasta el 20-40% (Mahmood et al, 1991; Sangi-Haghpeykar 1995).

La edad media al diagnóstico oscila entre los 25 y los 30 años (Kuohung, 2002).

Se han descrito diferencias étnicas en cuanto a la incidencia de endometriosis, siendo más prevalente en mujeres de raza negra, seguido de la raza caucásica, y menos en la raza oriental (Sangi-Haghpeykar, 1995).



## 1.3 ETIOPATOGENIA

Diversas teorías tratan de explicar el origen, desarrollo y progresión de la endometriosis. Sin embargo, ninguna de ellas es capaz de explicar por sí sola todos los aspectos de la enfermedad, por lo que se postula un origen multifactorial en el que intervienen factores genéticos (Daftary 2004; Treloar, 2005), y otros como la exposición a tóxicos ambientales (Rier, 2003) o el estrés oxidativo (Kajihara, 2011; Ngo, 2009).

La teoría de la menstruación retrógrada es la más aceptada actualmente para explicar la diseminación de las células endometriales; sin embargo, los factores que determinan la supervivencia e implantación del endometrio ectópico son desconocidos. Parece que cambios innatos o adquiridos de la capacidad del endometrio para implantar, invadir y crecer en un ambiente inflamatorio dependiente de estrógenos y resistente a la progesterona son cruciales para el desarrollo de la enfermedad (Bulun 2009; Burney, 2012; Vercellini, 2014).

Vamos a desarrollar a continuación las teorías más aceptadas en la actualidad.

### 1.3.1 Teoría de la implantación por menstruación retrógrada

Es una de las teorías con mayor aceptación en la actualidad, aunque deja sin explicar ciertos aspectos de la enfermedad. Propone la existencia de una migración retrógrada de fragmentos endometriales a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad abdominal, donde pueden llegar a implantarse.

Entre las observaciones que apoyan esta teoría, destacamos las siguientes. Por un lado, la distribución de las lesiones en la cavidad abdominal, siendo más frecuente en aquellas zonas que reciben mayor cantidad de flujo retrógrado: ovarios, fondo de saco de



Douglas y ligamentos uterosacros (Hoshiai et al, 1993; Jenkins et al, 1986; Vercellini et al, 1998); así como la alta prevalencia de endometriosis observada en niñas con obstrucción congénita del tracto de salida al flujo menstrual (Sanfilippo et al, 1986).

Observaciones posteriores, como la demostración de la viabilidad del endometrio del flujo menstrual en líquido peritoneal, con capacidad de implantación y crecimiento, demostrada en cultivos celulares (Keettel y Stein, 1951; Koks et al, 1997); la inducción de endometriosis en experimentos animales mediante fístulas uteropélvicas artificiales (Te Linde y Scott, 1950) o forzando un flujo menstrual retrógrado al crear una obstrucción anterógrada (D'Hooghe et al, 1995); o la demostración de la capacidad del endometrio de adherirse a la superficie mesotelial del peritoneo (Witz et al, 2001), sustentan la teoría de la implantación por menstruación retrógrada.

La menstruación retrógrada es un proceso común en la mayoría de las mujeres, sin embargo, no todas desarrollan la enfermedad. Por tanto, parece evidente que la menstruación retrógrada es un proceso implicado en el origen de la enfermedad, aunque la clave estaría en saber qué factores son los que condicionan que unas mujeres no sean capaces de eliminar estos restos endometriales y desarrollar la enfermedad.

### **1.3.2 Teoría de la metaplasia celómica**

Implica la transformación del tejido peritoneal normal en tejido endometrial ectópico. Este tejido procede de la transformación, a través de metaplasia, de tejidos epiteliales con capacidad proliferativa (como podría ser el epitelio ovárico o la serosa peritoneal) al ser inducidos por determinados estímulos inflamatorios o endocrinos (Cullen et al, 1896; Levander, 1955; Merrill, 1966; Meyer et al, 1903). Está basada en el hecho de



que prácticamente la totalidad del epitelio genital representa diferentes grados de diferenciación del epitelio celómico, de ahí su alta capacidad de diferenciación frente a estímulos externos.

### **1.3.3 Teoría de las células progenitoras que se originan en la médula ósea**

Se trata de una teoría más reciente que postula que las células madre de la médula ósea pueden diferenciarse en tejido endometriósico (Sasson, 2008). La línea celular originaria incluiría las células progenitoras mesenquimales y endoteliales.

Esta teoría y la anterior explicarían la aparición de endometriosis en cualquier lugar de la cavidad peritoneal y de la pleura, así como los casos de endometriosis descritos en ausencia de menstruación: mujeres que nunca han menstruado (El Mahgoub et al, 1980), mujeres con síndrome de Rokitansky-Kuster-Hauser (Rosenfeld, 1981; Moon Kyoung Cho, 2009) e incluso en varones con cáncer de próstata que reciben altas dosis de estrógenos (Honoré, 1999; Schrodt, 1980).

### **1.3.4 Teoría del trasplante mecánico**

La causa más probable de aparición de endometriosis en cicatrices quirúrgicas y periné sería el trasplante directo inadvertido de tejido endometrial en el momento de una cirugía pélvica, cesárea o episiotomía (Taff et al, 2001).



Diversos estudios describen la aparición de lesiones endometriósicas en episiotomía (Hambrick, 1979), postcesárea (Stroup, 1976) e incluso posthisterectomías vaginales (Schmid, 1961) de mujeres afectas de endometriosis.

### **1.3.5 Teoría de la difusión hematológica y linfática**

Esta teoría sostiene que los implantes endometriósicos aparecen tras la diseminación linfática o hematológica de las células endometriales (Halban, 1924). Estudios microvasculares demuestran que existe flujo linfático entre el cuerpo uterino y el ovario, lo que implicaría al sistema linfático en la etiología de la endometriosis ovárica. La evidencia más potente que apoya esta teoría se deriva de los hallazgos histológicos de lesiones endometriósicas en lugares lejanos a la pelvis como hueso, pulmones o cerebro (Jubanyik KJ, 1997; Machairiotis, 2013).

Esta teoría podría ser complementaria de las anteriores ya que no explicaría la generación inicial del implante sino su diseminación.

### **1.3.6 Teoría de los restos embrionarios Müllerianos**

Esta teoría propone que células residuales de la migración de los conductos Müllerianos embriológicos mantienen la capacidad de transformarse en lesiones endometriósicas bajo la influencia del estímulo estrogénico puberal (Russell-Edu, 1899), o en respuesta a otras moléculas que puedan mimetizar el efecto de los estrógenos (Missmer, 2004). Esta teoría se apoya en estudios epidemiológicos que reportan el doble de riesgo de padecer endometriosis en pacientes expuestas a dietilstilbestrol intraútero.



## **1.4 FACTORES MOLECULARES EN LA ETIOPATOGENIA DE LA ENDOMETRIOSIS**

Ninguna de las teorías expuestas previamente explica todos los tipos o casos de endometriosis. Los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares asociados a la endometriosis han mejorado el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad, dando nuevas explicaciones a su origen y posterior desarrollo.

Son múltiples los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la enfermedad. A continuación, se describen los más relevantes.

### **1.4.1 Supervivencia de las células endometriales**

La búsqueda de características innatas o adquiridas que favorezcan la supervivencia del endometrio ectópico respecto al eutópico ha sido objeto de múltiples estudios que muestran diferencias en la expresión de genes y proteínas que predisponen a la endometriosis (Bulun, 2009; Burney, 2012; Vercellini, 2014).

Se ha demostrado la sobrerregulación del gen antiapoptótico BCL-2 tanto en endometrio eutópico como ectópico de mujeres con endometriosis (Jones, 1998), y, además de un descenso en la apoptosis (Wingfield, 1995), parece que el aumento de la capacidad proliferativa podría conferir una ventaja de supervivencia selectiva al endometrio de pacientes predispuestas a presentar la enfermedad.

Las células de las pacientes con endometriosis presentan alteraciones que incrementan su capacidad de implantación, y dichas alteraciones pueden tener un componente hereditario. El riesgo de endometriosis en familiares de primer grado de pacientes con endometriosis severa es 6 veces mayor que en familias sin mujeres afectas (Simpson,



1980). Se ha observado, asimismo, una alta tasa de concordancia con confirmación histológica en gemelas monocigotas (Hadfiel, 1997). Se han identificado genes candidatos en las regiones cromosómicas 10q26 7p15 (Painter, 2011; Treloar, 2005).

#### **1.4.2 Alteración del ambiente hormonal: dependencia estrogénica y resistencia a la progesterona**

La endometriosis es una enfermedad hormonodependiente, y existen múltiples evidencias al respecto (Kitawaki, 2002). Se ha demostrado que los implantes endometriósicos presentan sobreexpresión de enzimas como la aromatasas y 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo I (HSD17 $\beta$ 1), implicadas en la conversión de androstendiona a estrona (E1) y de E1 a estradiol, respectivamente. Sin embargo, carecen de 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo II (HSD17 $\beta$ 2), que inactiva los estrógenos (Bulun, 2010, Zeitoun, 1998). La consecuencia de este patrón de expresión supone un incremento marcado de la concentración local de estradiol. El estradiol estimula la producción de prostaglandina E2, lo que estimula a su vez la expresión de la aromatasas (Noble, 1997). Estos hallazgos apoyan la capacidad de los implantes endometriósicos de sintetizar estradiol y la respuesta a los tratamientos que promueven un ambiente hipoestrogénico (Serafini, 2011).

Hay cada vez más evidencias que apoyan la existencia de cierta resistencia a la progesterona (Bulun, 2009). Las lesiones endometriósicas presentan una reducción de la expresión de receptores de progesterona comparado con el endometrio eutópico y una ausencia de receptor  $\beta$  de progesterona (Attia, 2000).



### **1.4.3 Alteraciones del sistema inmunológico**

La disregulación del sistema inmune puede estar implicado en la predisposición a la implantación y crecimiento de las células endometriales. Las primeras observaciones en este sentido parten de estudios realizados sobre monos Rhesus, observándose desarrollo de endometriosis con más frecuencia en aquellos que tenían suprimido el sistema inmune respecto a los controles (Wood et al, 1983). Parece que fragmentos tisulares de mayor tamaño, comparado con células individuales, tienen mayor capacidad de implantación, posiblemente por la protección al sistema inmunológico de las células localizadas en la parte más interna (Nap, 2003). Además, el endometrio eutópico de las mujeres con endometriosis parece ser más resistente a la lisis celular por células natural killer que el endometrio de mujeres sin endometriosis (Oosterlynck, 1991).

La función de los macrófagos también parece estar alterada en mujeres con endometriosis (aumento en el número y actividad de macrófagos en el líquido peritoneal, y como consecuencia un aumento de citoquinas) lo que puede también contribuir a una menor eliminación de células endometriales (Tasuku, 2001).

La alta concordancia de ciertas enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y enfermedades tiroideas) y atopia en mujeres afectas de endometriosis apoyan la disregulación del sistema inmune como un factor implicado en la génesis o mantenimiento de la enfermedad (Sinaii, 2002).

### **1.4.4 Adhesión e invasión de las células endometriales**

Las células endometriales estromales y el peritoneo de las pacientes con endometriosis difiere del de mujeres sanas y favorece los procesos de adhesión e invasión



transmesotelial de las células reflúidas (Lucidi, 2005). El flujo menstrual retrógrado parece tener un efecto perjudicial sobre el mesotelio, y al inducir un daño tisular favorece su propia implantación. Los factores exactos que conducen al daño mesotelial no se conocen. La expresión aumentada de citoquinas y factores de crecimiento (como la interleuquina 6, la metaloproteinasa de matriz-3, el factor de crecimiento vascular - VEGF-) podrían crear un ambiente favorecedor de la implantación de las células endometriales o protector de la limpieza del sistema inmune (Lucidi, 2005).

Las metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores están involucrados en el remodelado de la matriz extracelular y se han implicado en los cambios cíclicos de recambio celular y en la menstruación (Rodgers, 1994). El correcto equilibrio entre estas proteínas y sus inhibidores es crucial para controlar la invasión celular y se han detectado alteraciones en la expresión de la MMP-7 en pacientes con endometriosis (Osteen, 1996).

#### **1.4.5 Neuroangiogénesis, vasculogénesis y crecimiento**

Las lesiones endometriósicas requieren un aporte vascular para su desarrollo y mantenimiento. El peritoneo es un tejido relativamente avascular comparado con el endometrio eutópico. Se ha documentado que las lesiones endometriósicas crecen en áreas con abundante flujo sanguíneo (Nisolle et al, 1993), así como un aumento de la vascularización a nivel de los implantes endometriósicos (Maas et al, 2001; Nisolle et al, 1993). Además, en las mujeres con endometriosis se ha observado un aumento de los factores proangiogénicos y una disminución de los factores inhibidores de la angiogenesis en el fluido peritoneal (Laschke y Menger, 2007). En este sentido, se ha observado que la expresión génica del endometrio en fase menstrual en mujeres con endometriosis presenta una sobrerregulación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la



interleuquina 8 (IL-8) y la MMP-3 (Kyama et al, 2006). Tanto el TNF- $\alpha$  como la IL-8 promueven la adhesión y la proliferación de las células endometriales, así como la angiogénesis.

Entre los factores relacionados con la angiogénesis, destaca la familia del VEGF, una glicoproteína esencial en el proceso de la angiogénesis, tanto fisiológica como patológica (Gargett et al, 2002). Los macrófagos presentes en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis liberan VEGF en mayor cantidad, frente a controles sanos (McLaren et al, 1996). Existe, además, una correlación positiva entre la severidad de la enfermedad y la liberación de VEGF en el líquido peritoneal (Shifren et al, 1996; Bourlev et al, 2006); su expresión está aumentada en lesiones activas, rojas (Donnez et al, 1998), y en las mujeres con endometriosis profunda (Machado et al, 2008).

Se ha documentado un incremento de la neuroangiogénesis asociado a los procesos de neoangiogénesis en las lesiones endometriósicas, lo que podría contribuir al dolor asociado a esta patología (Asante y Taylor, 2011).

### **1.4.6 Inflamación**

La endometriosis se considera una enfermedad inflamatoria, existiendo múltiples evidencias al respecto. Se ha evidenciado en las mujeres con endometriosis una mayor expresión de factores inflamatorios, tanto a nivel endometrial como en el ambiente peritoneal.

Por un lado, el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis presenta un mayor número de macrófagos y de Interleuquina 6 (IL-6) (Tseng et al, 1996).



Por otro lado, el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis presenta mayor cantidad de macrófagos activos, con el consecuente aumento de citoquinas, como la IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , entre otras (Rana et al, 1996). El ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis es, asimismo, rico en prostaglandinas (PG). Los macrófagos peritoneales expresan niveles más altos de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y liberan cantidades más elevadas de PG que los controles sanos (Wu et al, 2002).

A nivel intralesional, el TNF- $\alpha$  promueve la producción de PGE2 y PGF2 $\alpha$  en células endometriales (Chen et al, 1995). La activación de la COX-2 por la IL-1 $\beta$  aumenta la producción de PGE2, lo que activa la aromatasa (Attar et al, 2009), y produce una retroalimentación positiva que promueve el aumento local de estradiol. Existe, por tanto, una estrecha relación entre los procesos inflamatorios y la dependencia estrogénica en la endometriosis, sin que se haya podido dilucidar si esta alteración en la expresión de marcadores inflamatorios es una causa o una consecuencia de la enfermedad.



## 1.5 CLASIFICACIÓN

La endometriosis es una enfermedad compleja y heterogénea, con múltiples formas de presentación clínica, que dependen de la localización, extensión e infiltración de las lesiones (Koninckx, 1991); esos parámetros condicionan la gravedad, el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad, por lo que disponer de un sistema de clasificación de la endometriosis es crucial.

La endometriosis puede clasificarse según la localización de las lesiones, sus características histológicas o mediante sistemas de clasificación, que idealmente deben ser sencillos, reproducibles, objetivos y, sobre todo, correlacionarse con los síntomas, tratamiento y pronóstico de la enfermedad (SEGO, 2014).

### 1.5.1 Localización de las lesiones

La endometriosis puede localizarse en cualquier parte del aparato genital; en localizaciones extragenitales como los ligamentos uterosacos, redondo, ancho, fondo de saco de Douglas, septo rectovaginal o peritoneo (Dmowski et al, 1984); así como en lugares alejados de la pelvis como pericardio, intestino, vejiga o pleura (Jenkins et al, 1986).

### 1.5.2 Características histológicas macroscópicas

En función de la localización principal de los focos endometriósicos se diferencian tres tipos de lesiones endometriósicas (ováricas, peritoneales o infiltrantes) que se diferencian tanto en su forma de presentación clínica, como en su evolución y manejo.



Dentro de cada localización podemos encontrar diferentes tipos de de lesiones atendiendo a su grado de actividad o extensión. Debido al diferente comportamiento de la enfermedad en función de su localización principal, se postula que el origen de estas podría ser diferente (Documentos de consenso: endometriosis, SEGO 2014).

#### **1.5.2.1 Endometriosis ovárica**

La forma de presentación más típica de la endometriosis ovárica es en forma de endometriomas. Se trata de formaciones quísticas de tamaño variable que aparecen como resultado de la acumulación de material tras hemorragias repetidas (Donnez et al, 1992).

Otra forma de presentación es en forma de focos superficiales sobre los ovarios. La apariencia macroscópica de las mismas puede ser de lesiones marrones, rojas, depósitos parduzcos o adherencias (Nisolle et al, 1993).

Respecto a este tipo de endometriosis, se han propuesto tres teorías para explicar su patogénesis. La primera, explicaría la formación de los endometriomas por inversión e invaginación progresiva del córtex ovárico tras la acumulación de detritus menstruales derivados del sangrado de implantes endometriósicos ováricos o peritoneales superficiales (Hughesdon, 1957). La segunda teoría postula que podrían ser secundarios a quistes ováricos funcionales con implantes endometriales en su superficie (Sampson, 1921), y la última que serían secundarios a metaplasia del epitelio celómico ovárico, que se invaginaría en la corteza ovárica dando lugar a los endometriomas (Nisolle y Donnez, 1997). Esta última teoría podría explicar la presencia de endometriomas en pacientes que nunca han presentado menstruación retrógrada (Rosenfeld y Lecher,



1981). Posiblemente no todos los endometriomas aparezcan por el mismo mecanismo patológico (Nisolle y Donnez, 1997).

#### **1.5.2.2 *Endometriosis peritoneal***

Se han descrito varios tipos de lesiones a este nivel, que se clasifican atendiendo a su antigüedad y grado de actividad. Las lesiones rojas o atípicas son lesiones recientes y activas; se trata de lesiones con predominio glandular, de peritoneo petequial o áreas de hipervascularización localizadas con mayor frecuencia en el peritoneo de ligamentos anchos y uterosacos. Las lesiones negras o típicas son antiguas y poco activas; aparecen como resultado de la retención de los pigmentos de la sangre en los tejidos (Nisolle et al, 1993) y están formadas por glándulas, estroma, tejido cicatricial y detritus intraluminales. Por último, podemos encontrar lesiones blancas, fibróticas; suele tratarse de lesiones peritoneales gruesas, opacas, de contorno irregular, en el que el componente glandular es muy escaso. Corresponden a zonas cicatriciales de lesiones activas previas (Donnez et al, 1992).

El origen de los implantes endometriales se explica en la mayoría de los casos por la teoría de Sampson o de la menstruación retrógrada (Sampson, 1927); ciertas alteraciones moleculares de las células endometriales ectópicas, así como un microambiente peritoneal determinado favorecerían la supervivencia, implantación y escape al sistema de inmunovigilancia, lo que explicaría por qué sólo un pequeño porcentaje de las mujeres con menstruación retrógrada desarrollan la enfermedad (SEGO, 2014).



### **1.5.2.3 Endometriosis profunda**

Los focos de endometriosis profunda se pueden encontrar tanto en localizaciones pélvicas como extrapélvicas.

Se han documentado focos de endometriosis en la pared vesical (Kovoor et al, 2010), ligamentos redondos (Crispi et al, 2012), afectando a los uréteres (Chapron et al, 2010), plexos nerviosos hipogástricos, espina ciática, ligamento sacroespinoso, nervios como el ciático o el pudendo (Ceccaroni et al, 2011), ligamentos uterosacros (Bonte et al, 2002; Chapron et al, 2001), parametrios (Ceccaroni et al, 2010), vagina (Dadhwal et al, 2012), recto y tabique rectovaginal (Jelenc et al, 2012; Ruffo et al, 2012).

En localizaciones extrapélvicas se han descrito focos en localizaciones como intestino delgado (Fernández-Rey et al, 2009), sigma, ciego y apéndice (Abrao et al, 2010; Cirillo et al, 2008).

En cuanto a la patogénesis de la endometriosis profunda, se postulan dos hipótesis. La primera, explicaría la aparición de los implantes mediante un proceso de metaplasia a partir de restos Müllermanos (Meyer, 1980), mientras que la segunda los considera fruto de la evolución natural de la endometriosis peritoneal del fondo de saco de Douglas u otras localizaciones (Somigliana et al, 2014).

### **1.5.3 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 y Fritz, 2006), y con unas características peculiares.



En cuanto al componente glandular, éstas son frecuentemente irregulares y el aspecto funcional es variable. A veces pueden sufrir cambios cíclicos semejantes al endometrio eutópico, y otras veces recuerdan a la capa basal del endometrio sin sufrir cambios secretores (Bergqvist et al, 1984).

El epitelio que recubre las glándulas puede sufrir cambios de tal forma que resulte difícil su identificación, basando entonces el diagnóstico en la aparición de estroma de aspecto endometrial. La hemorragia intersticial es común en la endometriosis. La irritación química y mecánica en los tejidos provoca proliferación de fibroblastos, produciendo fibrosis alrededor de la lesión (Schweppe et al, 1981).

Existe un tipo de lesiones conocidas como *endometriosis estromal* que presentan la particularidad de estar formadas por pequeños nódulos o placas de estroma endometrial sin glándulas. Esta histología se acompaña en muchas ocasiones de tejido endometriósico típico formado por glándulas y estroma. Este tipo de tejido endometriósico se ha hallado en cérvix, ovario y peritoneo pélvico (endometriosis estromal micronodular) (Boyle y McCluggage, 2009).

#### **1.5.4 Sistemas de clasificación**

La clasificación más aceptada y utilizada mundialmente es la de la American Society of Reproductive Medicine (ASRM) de 1997 (Figura 1). Se basa en la valoración intraoperatoria de la extensión peritoneal y ovárica, las adherencias y el grado de obliteración del fondo de saco de Douglas, asignando a cada tipo de lesión una puntuación típica (score), siendo la suma de las puntuaciones obtenidas en cada apartado la que clasifica la enfermedad en uno de los 4 estadios posibles (Figura 2).



SOCIETAT AMERICANA SOCIETY PARA MEDICINA REPRODUCTIVA  
CLASIFICACION REVISADA DE ENDOMETRIOSIS

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

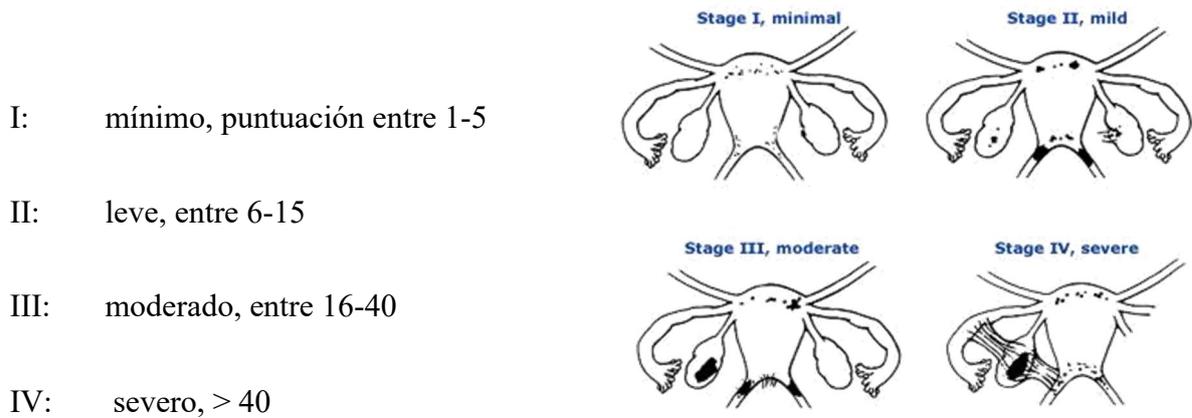
PERITONEO	ENDOMETRIOSIS	< 1 cm	1-3 cm	>3 cm
		Superficial	1	2
	Profundo	2	4	6
OVARIO	D Superficial	1	2	4
	Profundo	4	16	20
	I Superficial	1	2	4
	Profundo	4	16	20
POSTERIOR SACO DE DOUGLAS OBLITERACION		< Parcial		Completo
		4		40
OVARIO	ADHESIONES	< 1/2 Cierre	1/2 - 3/4 Cierre	> 3/4 Cierre
	D Transparente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

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

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



Figura 1: Clasificación de la ASRM de 1997



*Figura 2: Estadios de endometriosis*

Esta clasificación presenta ciertas limitaciones: es subjetiva, carece de correlación clínica y evolutiva y no se correlaciona con el pronóstico reproductivo de las pacientes. No incluye las lesiones microscópicas ni realiza una evaluación cuantitativa de la afectación de otras estructuras pélvicas o extrapelvicas (Koninckx et al, 1992). Tampoco valora la adenomiosis. Por ello, han surgido otros intentos de clasificación (Chapron et al, 2003; Haas 2011; Adamson, 2010) pero que no han conseguido desbancarla, siendo actualmente la más adecuada para estandarizar y concretar criterios en el tratamiento y pronóstico evolutivo de la enfermedad.



## 1.6 DIAGNÓSTICO

La sospecha diagnóstica de endometriosis debe establecerse en base a la historia clínica, los síntomas y signos que presente, corroborada por el examen físico y las técnicas de imagen, y finalmente, se considera confirmada mediante un análisis histológico de las muestras recogidas durante un procedimiento quirúrgico, generalmente una laparoscopia. La combinación de la laparoscopia y la verificación histológica de la presencia de glándulas y estroma endometrial se considera el ‘gold standard’ para el diagnóstico de la enfermedad (Kennedy et al, 2005).

### 1.6.1 Anamnesis

Es una herramienta imprescindible tanto para orientar el diagnóstico como para planificar el tratamiento, ya que éste debe ser individualizado a cada paciente, en cada etapa de su vida y en relación con los síntomas que presente en cada momento.

El síntoma más característico de la enfermedad es el dolor pélvico, en forma de dismenorrea (50-90%), dolor intermenstrual (57-68%) y/o dispareunia (25-40%) (Speroff y Fritz, 2006). En pacientes que se presentan con clínica de dolor es vital cuantificar la intensidad de este, el momento en que se presenta, la relación con el ciclo menstrual, la existencia de síntomas concomitantes (posible afectación de otros órganos), los fármacos que utiliza para aliviar el dolor, etc. (Ministerio de Sanidad, Guía de atención a las mujeres con endometriosis, 2013).

También puede cursar con alteraciones del patrón menstrual, en forma de hemorragia uterina disfuncional tipo spotting, aunque se han descrito múltiples patrones menstruales, generalmente debido a una disfunción ovulatoria asociada a la enfermedad.



La esterilidad es otro síntoma cardinal de la endometriosis. Existe una prevalencia en pacientes con esterilidad primaria del 26-45% y secundaria entre un 12-25%, frente a un 3-10% de la población general. La enfermedad severa compromete a ovarios y produce adherencias que ocluyen o dificultan la movilidad de las trompas. Algunos estudios han demostrado también una disminución de la reserva ovárica independiente de la edad en estas mujeres (Hock et al, 2001). Se ha observado una calidad disminuida de los embriones obtenidos por fecundación in vitro, responsable de la baja tasa de implantación asociada (Pellicer et al, 1995). Esto podría deberse a alteraciones en la foliculogénesis y del medio ambiente paracrino y autocrino intrafolicular que padecen estas pacientes (Pellicer et al, 1998; Garrido et al, 2000). En endometriosis mínima o leve aún no está clara su relación con la esterilidad, aunque podría deberse a una alteración de los marcadores de la implantación endometrial (Matsuzaki et al, 2004), o un ambiente peritoneal hostil que produjera daños en el ADN espermático (Mansour et al, 2009) o en el ovocito (Mansour et al, 2010).

La endometriosis extrapélvica puede cursar con una amplia variedad de síntomas cíclicos dependientes de la localización de los implantes:

- urinarios: disuria, hematuria u obstrucción ureteral (Donnez et al, 2000)
- intestinales: colon irritable, tenesmo perimenstrual, disquecia, hematoquecia, síntomas obstructivos o apendicitis (Yantiss et al, 2001)
- pleurales y pulmonares: es rara y puede manifestarse como dolor torácico pleural o hemoptisis durante la menstruación o derrame pleural o neumotorax postmenstruales (Rychlik y Beber, 2001).



- pared abdominal: nódulos dolorosos en canal inguinal o subumbilicales o sobre cicatrices de cesáreas y episiotomías (Li et al, 2015; Wolf y Singh, 1989).

## **1.6.2 Exploración física ginecológica**

La exploración ginecológica es una herramienta valiosa pero insuficiente por sí misma. 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 (Chapron et al, 2002).

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.

## **1.6.3 Exploraciones complementarias**

### ***1.6.3.1 Ecografía***

La ecografía es la prueba de elección ante la sospecha clínica de endometriosis, ya que ha demostrado su utilidad para el diagnóstico de la enfermedad tanto en su forma quística como infiltrativa. Es muy sensible en la detección de endometriomas y tiene una capacidad diagnóstica similar a la resonancia magnética en los casos de endometriosis profunda (Exacoustos et al, 2014); sin embargo, resulta ineficaz si las



lesiones presentes tienen un tamaño menor de 5-10 mm (Bazot et al, 2003), por lo que resulta insuficiente para el diagnóstico de los implantes peritoneales.

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

La ecografía transrectal es útil sobretudo en el diagnóstico de la endometriosis profunda en el área de los ligamentos uterosacros, tabique recto-vaginal o recto, aunque presenta ciertas limitaciones, como que los ligamentos uterosacros no son ecográficamente visibles en condiciones normales, por lo que deben estar aumentados de tamaño para ser detectados (Banerjee et al, 2008).

La ecografía abdominal es imprescindible para descartar lesiones quísticas extrapélvicas o hidronefrosis secundaria a la afectación ureteral (SEGO, 2014).

### ***1.6.3.2 Ecoendoscopia***

Para valorar la presencia de nódulos en el tabique recto-vaginal o área de uterosacros es más utilizada la vía transrectal; la ultrasonografía endoscópica anal estaría recomendada para determinar con exactitud la profundidad de estas lesiones.

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 et al, 2003).

### **1.6.3.3 Resonancia magnética**

La resonancia magnética (RM) es útil para determinar la extensión y todas las posibles localizaciones de la enfermedad (Medeiros et al, 2015), excepto la endometriosis peritoneal. El método de contraste con gel (vaginal y diluido al 50% rectal), descrito por primera vez por Takeuchi en 2005 (Takeuchi et al, 2005) es especialmente sensible para el diagnóstico de las lesiones en el tabique rectovaginal y en todo el compartimento posterior e intestino.

### **1.6.3.4 Marcadores bioquímicos**

Las nuevas tecnologías de cribado molecular, como la genómica, proteómica, citogenética y microarrays de genes/proteínas están siendo ampliamente utilizadas para la identificación de marcadores biológicos que permitan el desarrollo de pruebas no invasivas de diagnóstico precoz tales como:

- Marcadores tumorales y polipéptidos: CA-125, CA 19.9, sICAM-1 y Proteína Placentaria-14 en suero.
- Marcadores inmunológicos: Citoquinas (IL-6) y anticuerpos antiendometriales y marcadores de estrés oxidativo en suero.
- Marcadores en tejido endometrial: Aromatasa P 450, receptores hormonales e inmunohistoquímica de fibras nerviosas.



Aunque la detección de estos marcadores por separado no parece estar resultando útil actualmente para el diagnóstico precoz, estudios más recientes apuntan a que una combinación de varios de ellos podría ayudar a obtener mejores resultados en este aspecto (May et al, 2011; Elgafor et al, 2013).

#### **1.6.3.5 Otras pruebas complementarias**

Se recomienda el uso de técnicas de imagen específicas en el caso de sospecha clínica de implicación del uréter, vejiga o intestino (Dunselman et al, 2014), como enema de bario de doble contraste, cistouretrografía miccional seriada, cistoscopia, uro-TAC, renograma isotópico, etc.

#### **1.6.3.6 Laparoscopia**

Se considera el “gold standar” en el diagnóstico de la endometriosis (Kennedy et al, 2005), ya que permite la visualización global de la pelvis y la cavidad abdominal, realizar un correcto estadiaje de la enfermedad, así como la toma de biopsias para su confirmación histológica.

Aunque muchos casos de endometriosis son obvios para el cirujano, el diagnóstico exacto de la enfermedad requiere del análisis histológico, por lo que se recomienda la obtención de biopsias siempre que sea posible, para evitar un sobrediagnóstico de la enfermedad. (Dunselman et al, 2014; Wykes et al, 2004).

La utilidad de la laparoscopia diagnóstica en términos de coste-eficacia es escasa, por lo que no se recomienda realizar una laparoscopia con fines exclusivamente diagnósticos; si se encuentra enfermedad deberá tratarse en ese acto quirúrgico (Duffy et al, 2014; Dunselman et al, 2014).

## 1.7 TRATAMIENTO

El tratamiento de la endometriosis tiene como objetivos básicos suprimir los síntomas relacionados con el dolor y la compresión de órganos, restaurar la fertilidad y evitar la progresión de la enfermedad. Debe ser individualizado en función de la edad, extensión de la enfermedad, duración de la infertilidad, deseo reproductivo de la pareja y severidad de síntomas.

Debemos considerar la endometriosis como una enfermedad crónica que precisa un plan de gestión para toda la vida, ofreciendo un tratamiento individualizado para cada paciente y en cada momento (SEGO 2014).

Parece evidente que no debemos tratar a las pacientes asintomáticas, ya que no existen estrategias preventivas de la enfermedad (Colegio nacional de ginecólogos y obstetras franceses, CNGOF 2012).

Así mismo, es fundamental evitar cirugías repetitivas o insistir en tratamientos médicos que no funcionen o supongan efectos secundarios intolerables en pacientes con dolor relacionado con la endometriosis, y considerar otros tratamientos que se dirigen hacia el dolor neuropático e inflamatorio (Howard, 2009).

### 1.7.1 Tratamiento expectante

El tratamiento expectante consiste en el seguimiento periódico ambulatorio de la paciente con endometriosis. Aunque no se encuentra consensuado, generalmente se realiza control de la sintomatología, ecografía y determinación analítica de marcadores tumorales a intervalos de 6-12 meses. Se realiza en mujeres asintomáticas con



endometriosis leve y aquéllas en las que el diagnóstico se ha realizado de forma casual y no presentan ninguna manifestación de la enfermedad.

## 1.7.2 Tratamiento quirúrgico

Permite el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad y estaría indicado en:

- Fallo del tratamiento médico en el control de los síntomas
- Mujeres que rechazan o tienen contraindicaciones a la terapia médica
- Necesidad de un diagnóstico definitivo: En aquellas mujeres con sintomatología moderada sugestiva de endometriosis en las que ha fallado el tratamiento empírico con terapias de primera línea (AINE, ACO).
- Para excluir malignidad en una masa anexial: la endometriosis puede formar quistes de inclusión peritoneales por adherencias pélvicas; estos quistes podrían presentar signos sugestivos de malignidad que precisarían confirmación quirúrgica.
- Tratamiento de la infertilidad: la cirugía es el tratamiento de elección en mujeres que esperan restablecer o preservar la fertilidad y padecen endometriosis moderada o grave (Speroff y Fritz, 2006).
- Obstrucción del tracto urinario o intestinal.

La cirugía puede ser de dos tipos:

- Cirugía conservadora: intenta conservar la anatomía pélvica lo máximo posible extirpando focos endometriósicos, adherencias, fulgurando focos, etc. siendo de elección el abordaje laparoscópico.



- Cirugía definitiva: la histerectomía total con salpingo-ooforectomía bilateral es una opción en estadios avanzados y sin deseos genésicos tras fracaso de los otros tratamientos, incluyendo el abordaje conservador, pudiendo aliviar el dolor y disminuir la posibilidad de nueva cirugía (Shakiba et al, 2008).

La cirugía laparoscópica es el gold standard para establecer el diagnóstico de endometriosis y proporciona una oportunidad para un tratamiento quirúrgico conservador en el mismo acto.

Constituye, además, el único método eficaz para erradicar la enfermedad, mejorando los síntomas cuando la indicación de esta es adecuada; sin embargo, la gran capacidad de recurrencia de la endometriosis, incluso tras cirugías aparentemente completas, hacen de esta opción terapéutica una herramienta limitada.

Las cifras de recurrencia alcanzan el 21.5% a los 2 años y entre el 40 y 50% a los cinco años de la cirugía (Guo, 2009). Las pacientes con mayor riesgo de presentar recurrencias serían aquellas con inicio temprano de los síntomas, alto nivel de dolor previo a la cirugía, tratamiento hormonal previo a la cirugía y mayor extensión de la enfermedad. Como factores que previenen la recurrencia destacan: lograr una cirugía lo más completa posible adaptada a los síntomas de la paciente y la supresión ovárica postoperatoria (Borghese et al, 2014).

Los riesgos de una intervención quirúrgica, que se incrementan con el número de cirugías realizadas sobre la misma paciente, como el daño inadvertido en órganos adyacentes (especialmente intestino y vejiga), las complicaciones infecciosas postquirúrgicas o el daño mecánico a las estructuras pélvicas que derivaría en una mayor formación de adherencias desaconsejan o limitan el uso del tratamiento

quirúrgico de la endometriosis a situaciones muy determinadas, como las descritas anteriormente.

Así pues, debemos procurar como alternativa a estas pacientes otros tratamientos no invasivos que permitan un uso a largo plazo, dada la naturaleza crónica y recidivante de la enfermedad.

### **1.7.3 Tratamiento farmacológico**

El tratamiento farmacológico persigue controlar los síntomas asociados a la endometriosis, mediante la eliminación o reducción de las lesiones, a partir de la administración de drogas comerciales y/o productos naturales. De acuerdo con la Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (Treatment of pelvic pain associated with endometriosis, 2014): ‘la endometriosis debería ser considerada una enfermedad crónica que requiere un manejo de por vida con la intención de maximizar el uso de tratamientos médicos que permitan evitar procedimientos quirúrgicos repetidos’.

El tratamiento médico se puede agupar en tres modalidades, como son los antiinflamatorios no esteroideos, los tratamientos hormonales clásicos y las nuevas terapias.

#### **1.7.3.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)**

Son fármacos inhibidores de las prostaglandinas (PG). Persiguen el alivio de cualquier tipo de dolor, de leve a moderado y suponen la primera línea de tratamiento por su

accesibilidad, bajo coste, tolerabilidad de efectos secundarios y evidencia en ensayos clínicos de mejoría de la dismenorrea primaria.

Las mujeres con endometriosis producen una mayor cantidad de prostaglandinas en la zona pélvica (Ylikorkala et al, 1985). Las prostaglandinas aumentan la intensidad de la contracción intestinal y uterina, causando dolor y calambres típicos de la dismenorrea. Estos fármacos, al reducir las PG, ejercen un efecto antiinflamatorio disminuyendo el dolor (Moghissi, 1999).

Sin embargo, este tratamiento resulta insuficiente en endometriosis severas o de larga evolución y proporcionan sólo un tratamiento sintomático, sin influir en la progresión de la enfermedad.

### ***1.7.3.2 Tratamientos hormonales de uso clínico***

Los tratamientos hormonales están basados fundamentalmente en la supresión estrógenica, debido al carácter hormono-dependiente de la enfermedad (Burney y Giudice, 2012). Esto conlleva una serie de efectos secundarios derivados de la acción hormonal, como la inducción de una menopausia artificial en muchos casos o la interferencia con la función reproductiva (Prentice et al, 2000).

En general todos los tratamientos hormonales disponibles actualmente son equiparables en términos de eficacia. El alivio del dolor, las tasas de embarazo y de recidiva son similares en todas las formas de tratamiento médico, por lo que la elección será individualiza y según criterios de coste-beneficio y efectos secundarios (Speroff y Fritz, 2006).



La mayor limitación de los tratamientos hormonales es, que, si bien detienen la progresión de la enfermedad, no reducen ni eliminan las lesiones ya formadas.

El objetivo de estos tratamientos es disminuir la producción de estrógenos por el ovario, dando lugar a una decidualización y posterior atrofia del tejido endometrial eutópico y ectópico (Sanchez-Fernandez, 2011). Se distinguen principalmente:

#### 1.7.3.2.1 Anticonceptivos orales combinados (ACO)

Se consideran un tratamiento de primera línea en el manejo inicial de la endometriosis para el dolor mínimo a moderado, en mujeres con deseo anticonceptivo (Harada et al, 2008), siendo una de sus principales ventajas frente a otros tratamientos hormonales el poderlos tomar de manera más prolongada e incluso en ocasiones indefinida. Inhiben la ovulación e inducen una pseudodecidualización y atrofia del tejido endometrial. Pueden administrarse con pautas cíclicas o continuas, para evitar el sangrado cíclico (Coffe et al, 2007).

Su uso tras un tratamiento quirúrgico ha demostrado, en estudios recientes, una reducción del 47% de la tasa de recurrencia de endometriosis tras cirugía frente a placebo, proporcional al tiempo de utilización de los ACO (Vercellini et al, 2008).

Sin embargo, los ACO pueden producir sangrados uterinos disfuncionales, cefaleas, náuseas, vómitos, aumento de peso y de la tensión mamaria, depresión y disminución de la libido, al igual que los progestágenos a altas dosis, además de incrementar el riesgo de eventos tromboembólicos (Surrey, 2006).



#### 1.7.3.2.2 Gestágenos

Inhiben el crecimiento del tejido endometrial causando una decidualización inicial, seguida de atrofia. También inhiben la secreción hipofisaria de gonadotropinas y la producción hormonal ovárica, causando anovulación e incluso amenorrea (Milsom y Korver, 2008; Speroff y Darney, 2005).

En general, son una buena alternativa como mantenimiento o en caso de que otros tratamientos no fueran posibles. Algunas de sus limitaciones son el retardo en recuperar los ciclos ovulatorios en las posologías depot (por lo que no estarían indicados en mujeres que deseen gestación a corto plazo) o el patrón de sangrado escaso, intermitente e irregular típico de los tratamientos prolongados. Además, producen una serie de efectos secundarios (dependientes de la dosis, duración y vía de administración) en ocasiones mal tolerados por las mujeres, como náuseas, vómitos, aumento de peso, tensión mamaria, retención de líquidos, depresión y disminución de la libido (Surrey, 2006), por lo que las pacientes candidatas deben ser seleccionadas con cautela e informadas de sus posibles efectos.

El dispositivo intrauterino liberador de progesterona (DIU-LNG) se considera un tratamiento de primera línea del dolor asociado a la endometriosis. Este DIU libera 20µg/día de Levonorgestrel e induce amenorrea o hipomenorrea por un mecanismo de acción diferente a los otros tratamientos, reduciendo la dismenorrea y las algias pélvicas asociadas a la endometriosis. Este tratamiento no requiere posología diaria y tiene escasos efectos a nivel metabólico general.

El DIU-LNG ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la endometriosis peritoneal, ovárica, profunda, lesiones recidivadas y también como medida preventiva



postoperatoria (Abou-Setta et al, 2006; Fedele et al, 2001; Petta et al, 2005; Vercellini et al, 2003).

#### 1.7.3.2.3 Agonistas de la GnRH

Estos compuestos actúan de manera continua sobre los receptores hipofisarios de GnRH disminuyendo la actividad gonadotrófica (down-regulation) e induciendo una supresión reversible de la esteroidogénesis ovárica. Este estado de hipogonadismo hipogonadotropo produce una reducción de las lesiones endometriósicas controlando el dolor y facilitando una posterior cirugía (Prentice et al, 2000). Algunos de los más empleados son: leuprolerina, buserelina, nafarelina, histrelina, goserelina y triptorelina; se emplean vía intramuscular, subcutánea o nasal con una duración aproximada de entre 3-6 meses, pues más allá de este tiempo incrementan de forma considerable el riesgo de osteoporosis.

Los análogos de la GnRH han demostrado claramente reducir el dolor de la endometriosis, incluyendo la dismenorrea, la dispareunia y el dolor pélvico crónico; mejoras similares a las obtenidas con danazol, progestágenos o ACO (Prentice et al, 2000).

Sus efectos secundarios son los derivados de una menopausia artificial como sofocos, insomnio, atrofia y sequedad vaginal, depresión, irritabilidad, ... y suelen reducirse si se añaden progestágenos a altas dosis o en combinación con dosis bajas de estrógenos (terapia "add-back") (Surrey, 2010), sin detrimento del efecto terapéutico.



#### 1.7.3.2.4 Danazol

Es un agente androgénico derivado de la 19 nortestosterona, que a dosis elevadas produce una inhibición hipofisaria de las gonadotrofinas y de la producción hormonal ovárica, suprimiendo la ovulación, menstruación y provocando atrofia endometrial.

También aumenta las concentraciones de testosterona libre, creando un ambiente rico en andrógenos y pobre en estrógenos que inhibe el crecimiento de los implantes endometriósicos. Sin embargo, hasta un 85% de las pacientes presentan efectos secundarios derivados de su acción masculinizante, que en algunos casos obligan a suspenderlo. (Barbieri et al, 1982).

El danazol representó el tratamiento de elección en la década de los 1980. Múltiples estudios demostraron su eficacia en cuanto a la reducción de síntomas asociados a la endometriosis (Selak et al, 2007). Al igual que otros tratamientos supresores, los síntomas reaparecen tras suspender el tratamiento.

#### 1.7.3.2.5 Gestrinona

Es un derivado 19-noresteroideo con acción antiestrogénica que actúa de forma compleja bloqueando el desarrollo folicular y la producción de estradiol, uniéndose a los receptores de andrógenos y con efecto agonista-antagonista al unirse a los receptores de progesterona (Surrey, 2006).

Este fármaco ha demostrado ser una opción eficaz para el tratamiento del dolor de la endometriosis de forma similar al danazol o a los agonistas de la GnRH (Surrey, 2006), pero su uso está limitado por su baja tolerancia. Entre sus efectos secundarios destacan



la atrofia mamaria, alteraciones menstruales, alopecia y cloasma “pseudogravídico” (Crosignani et al, 2006; Fedele y Berlanda, 2004).

#### **1.7.4 Nuevas terapias en el tratamiento de la endometriosis**

El hecho de que ninguno de los tratamientos anteriores elimine completamente los síntomas de la enfermedad, que sean efectivos mientras se mantenga el tratamiento pero que los síntomas reaparezcan al suspenderlos y que presenten limitaciones importantes derivadas de la afectación del ambiente hormonal, hace que se estén buscando nuevas alternativas que ofrezcan tratamientos más efectivos y/o menor severidad de efectos secundarios.

##### **1.7.4.1 Tratamientos hormonales experimentales**

Los nuevos tratamientos hormonales de la endometriosis, al igual que los clásicos, presentan limitaciones considerables derivadas de su mecanismo de acción: no pueden utilizarse en pacientes con deseo genésico, pues interfieren con la ovulación y la receptividad endometrial; su uso en el tiempo está limitado por los efectos secundarios y no han demostrado eficacia completa en la supresión de los síntomas o en la eliminación de la progresión de la enfermedad (Mihalyi et al, 2006).

###### **1.7.4.1.1 Antagonistas de la GnRH**

Producen una supresión rápida de la secreción de gonadotrofinas mediante competición selectiva con el receptor de la GnRH endógena, evitando el efecto *flare up* de los agonistas. A pesar de que dos estudios apoyan su eficacia en el campo de la



endometriosis (Batzer, 2006; Kupker et al, 2002), actualmente no hay evidencia suficiente que apoye su eficacia, aunque por su mecanismo de acción cabe esperar que su uso sea eficaz para controlar los síntomas. Presentan un coste más elevado y una posología más compleja que los agonistas de la GnRH, además de tener el mismo perfil de efectos secundarios tipo “menopausia-like” (Kupker et al, 2002).

#### 1.7.4.1.2 Inhibidores de la aromatasa

La aromatasa es la enzima que cataliza el paso de andrógenos a estrógenos (estrone y estradiol). Se ha demostrado un aumento de su expresión en los implantes endometriósicos y en el endometrio de pacientes con endometriosis. (Bulun, 1999), por lo que la supresión de la producción ovárica de estradiol puede no controlar totalmente el dolor asociado a la endometriosis.

Los inhibidores de la aromatasa reducen la producción de estrógenos en cerebro, ovario, lesiones endometriósicas y periferia (piel, tejido adiposo, ...) (Sebastian y Bulun, 2001). La evidencia actual indica que estos fármacos son eficaces en reducir el dolor pélvico con efectos similares a otros tratamientos hormonales, aunque está basada en estudios con un número pequeño de pacientes (Patwardhan et al, 2008). Los efectos secundarios sobre la desmineralización de la matriz ósea contraindican su uso prolongado (Buzdar, 2004). Actualmente su uso en el tratamiento del dolor asociado a la endometriosis no se ha aprobado por la Food and Drug Administration (FDA).



#### 1.7.4.1.3 Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs)

Son compuestos que actúan como ligando sintético del receptor de estrógenos; van a modular dicho receptor pudiendo tener efectos antiestrogénicos o proestrogénicos en función del tejido diana (Speroff y Fritz, 2006). En este sentido, por ejemplo, el raloxifeno presenta una acción antagonista en endometrio (atenuando su crecimiento) y agonista en el hueso (preservando la densidad mineral ósea); sin embargo, su utilidad está reducida por sus efectos vasomotores. En animales ha demostrado una reducción del 70% del volumen de tejido ectópico, pero los resultados en humanos han sido contradictorios (Stratton et al, 2008).

#### 1.7.4.1.4 Moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SPRMs)

Tienen efecto agonista/antagonista sobre los receptores de progesterona en función del tejido diana. Suprimen la producción de prostaglandinas a nivel endometrial y tienen efecto directo sobre la proliferación endometrial y la formación de vasos en el endometrio (Chwalisz et al 2005), manteniendo los niveles de estrógenos circulantes, lo que mejora su tolerabilidad frente a los agonistas. En contrapartida, la tendencia a aumentar el riesgo de hiperplasia endometrial observada podría restringir su uso (Chwalisz et al, 2004).

#### **1.7.4.2 Tratamientos no hormonales experimentales**

Los múltiples avances en el conocimiento de la fisiología de la enfermedad realizados en los últimos años, junto con las carencias mencionadas de los tratamientos actuales, han volcado el interés en el estudio de nuevos tratamientos no hormonales que ofrezcan nuevas opciones terapéuticas a estas pacientes.



El objetivo de estos tratamientos, en su mayoría en fase experimental, sería controlar los síntomas de la enfermedad sin interferir en el estado hormonal de las pacientes, evitando de este modo los efectos secundarios derivados de la supresión hormonal, a la vez que se les puedan ofrecer opciones reproductivas (Olivares et al, 2008).

#### 1.7.4.2.1 Fármacos hipolipemiantes

Estudios experimentales con estatinas en animales muestran una disminución del crecimiento endotelial en los implantes mediante supresión de los genes que codifican proteínas implicadas en la inflamación y angiogénesis, y reducción de la HMG-CoA reductasa (Bruner-Tran et al, 2009; Cakmak et al, 2012).

Otros estudios en ratas suplementadas con ácido eicosapentaenoico (EPA) han evidenciado una reducción del grosor del tejido endometriósico intersticial relacionado con la progresión de la endometriosis, así como disminución de la proliferación de fibroblastos y MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos) y supresión de algunos genes implicados en la patogenia de la enfermedad (IL-Beta, MMP13, MMP10 y MMP8) (Netsu et al, 2008).

La principal limitación que presentan estos compuestos es que son teratógenos, recomendándose medidas anticonceptivas en las usuarias hasta mes y medio tras finalizado el tratamiento (Lecarpentier et al, 2012). Además, entre sus efectos secundarios más graves se han descrito casos de miositis y rabdomiolisis, por lo que se recomienda monitorizar con pruebas de función hepática (pueden elevar las transaminasas transitoriamente) y muscular periódicamente durante el tratamiento (Armitage, 2007; Kashani et al, 2006). Esto obliga a contrastar la existencia de un



beneficio claro de estos fármacos sobre la enfermedad pues su uso no está exento de complicaciones.

#### 1.7.4.2.2 Bifosfonatos

Los macrófagos activados parecen promover el desarrollo de la endometriosis al perpetuar la disfunción inmunológica en la misma. Una posible línea terapéutica consistiría en reducir in vivo el número de macrófagos activados mediante partículas liposomales que, al permitir la entrada de bifosfonatos fagocitarían e inactivarían a los macrófagos circulantes, sin resultar tóxicos para células no fagocitarias (Dananberg et al, 2002; Epstein et al, 2007).

La administración de 10mg/kg de alendronato liposomal en roedores ha demostrado una reducción del tamaño de los implantes peritoneales, así como una reducción del número de monocitos y de la respuesta inflamatoria (Haber et al, 2009).

Entre los efectos adversos más frecuentes de los bifosfonatos se incluyen problemas gastrointestinales (dolor abdominal, disfagia, esofagitis, úlcera esofágica, ...) (Graham et al, 1997 y 2001), síndrome pseudogripal (Black et al, 2007), síntomas musculoesqueléticos (dolor muscular, articular) (Wysowski y Chang, 2005), patología ocular (uveitis, epiescleritis, ...) (Etminan et al 2012) y osteomandibular (osteonecrosis de la mandíbula) (Khosla et al 2007); además de estar también contraindicados en la gestación por su teratogenia (Levy, 2009). Por todo ello habría que demostrar un claro beneficio en humanos para recomendarlo como tratamiento.



#### 1.7.4.2.3 Fármacos inmunomoduladores

El uso de inmunomoduladores deriva de la consideración de la endometriosis como una enfermedad inflamatoria.

La pentoxifilina ha sido una de las moléculas más estudiada por diversos autores: ha demostrado inhibir la fagocitosis por macrófagos, aumentar la liberación de enzimas proteolíticas y reprimir la producción de TNF- $\alpha$ , además de inducir la regresión de lesiones endometriósicas sin inducir un estado de hipoestrogenismo en modelo animal (Nothnick 2001, Olive et al, 2004). Estos resultados parecen prometedores en el tratamiento de la fertilidad para mujeres con endometriosis en estadios precoces (Balasch et al, 1997; Creus et al, 2008).

#### 1.7.4.2.4 Bloqueantes del factor nuclear KappaB (FN-kB)

El FN-kB es un factor de transcripción que induce la expresión de una amplia variedad de genes que intervienen en la respuesta inflamatoria (McKay et al, 1999); algunos estudios han demostrado un papel importante en el proceso inflamatorio de las células del estroma endometrial en endometriosis (Guo, 2007; Yamauchi et al, 2004). En estudios con células cancerosas se han probado inhibidores del FN-kB e inhibidores de los proteosomas para impedir la liberación de los precursores del FN-kB con éxito (Orlowski et al, 2002).

La pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), un potente inhibidor del FN-kB y el bortezomib, un inhibidor reversible del proteosoma, han demostrado reducir el tamaño de los implantes y frenar la progresión de lesiones en ratas a las que se les había implantado tejido endometriósico (Celik et al, 2008).



#### 1.7.4.2.5 Terapias antiangiogénicas

La neoangiogénesis es un pre-requisito fundamental en el mantenimiento y desarrollo de la endometriosis, una vez que los nódulos del tejido endometrial han quedado implantados (Nap et al, 2004).

Entre los factores implicados en la angiogénesis destaca el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), una glicoproteína esencial en este proceso (Gargett et al, 2002). Es liberado por los macrófagos presentes en mayores cantidades en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis frente a sanas (McLaren et al, 1996). Existe una correlación positiva entre severidad de la enfermedad y liberación de VEGF en el líquido peritoneal (Bourlev et al, 2006), y su expresión está aumentada en las lesiones endometriósicas activas (Donnez et al, 1998) y en la endometriosis profunda (Machado et al, 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 (Verheul et al, 2000; Watkins et al, 1999). Se hipotetiza que el bloqueo de los principales factores angiogénicos puede producir la interrupción de la neoformación de vasos en las lesiones y con ello la destrucción de las mismas, al carecer de un adecuado soporte de aporte de nutrientes (Nap et al, 2004).

Avalados por esta hipótesis, se ha ensayado en modelos animales de endometriosis el efecto que la inhibición de la angiogénesis ejerce sobre el crecimiento y supervivencia de lesiones. Entre los fármacos estudiados tenemos varios inhibidores específicos del VEGF, principal regulador de la angiogénesis, como el Avastin, así como otros de amplio espectro como el TNP-A, Endostatina, Anginex, ... que han demostrado su eficacia en la disminución de estas lesiones (Nap et al, 2004) en los citados modelos.



Estos compuestos, disponibles comercialmente, nacieron originalmente como tratamientos antitumorales (Bello et al, 2004; Kraeber-Bodéré et al, 2010). Debido a su toxicidad y a un mecanismo no selectivo de acción sobre la angiogénesis ejercen graves efectos secundarios (flebitis, anorexia, astenia) “tolerables” en pacientes oncológicos, pero no en pacientes con enfermedades no cancerosas, como las afectas por endometriosis (Via et al, 2000).

Ante esta coyuntura, se están evaluando otras sustancias, que por su mecanismo de acción conserven su efecto antiangiogénico y simultáneamente presenten efectos secundarios asumibles. Algunos de ellos corresponden a medicaciones previamente aprobadas para otras enfermedades y usos como las que mencionamos a continuación.

#### *1.7.4.2.5.1 Inhibidores selectivos de la COX-2: celecoxib*

La ciclooxigenasa (COX) tipo 1 y 2 son isoenzimas que catalizan la síntesis de prostaglandinas. La COX-2 se encuentra aumentada en procesos relacionados con el dolor y la inflamación.

Se ha observado una sobreexpresión de la COX-2 en el endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis (Matsuzaki et al 2004; Ota et al, 2001).

Estudios en modelo animal han demostrado que la administración de celecoxib bloquea el crecimiento celular e induce la apoptosis en células tumorales (Basu et al, 2005; Kundu et al, 2002), siendo además un potente inhibidor de la angiogénesis (Basu et al, 2005). También se ha observado que previene la implantación del tejido ectópico, y el crecimiento de lesiones ya existentes (Matsuzaki et al, 2004), induciendo la regresión de los implantes endometriales en ratas (Dogan et al, 2004) y ratones (Ozawa et al, 2006).

En humanos, un estudio *in vitro* ha demostrado la reducción de la proliferación celular y la inducción de apoptosis de células epiteliales de endometrio junto con una disminución del VEGF en el fluido peritoneal de mujeres tratadas (sanas y con endometriosis) (Olivares et al, 2008).

#### 1.7.4.2.5.2 *Té verde*

La epigallocatequina galato (EGCG), un flavonoide de tipo galato que constituye uno de los principios activos del té verde, presenta una potente actividad antioxidante, anticancerígena y de inhibición del crecimiento del endotelio vascular *in vivo* e *in vitro* (Tang et al, 2001). Parece tener un potente efecto antiangiogénico en diversos tumores (Fassina et al, 2004), asociado a una inhibición del VEGF y su receptor (Basini et al, 2005).

En modelos de endometriosis experimental en ratones, la EGCG ha demostrado una inhibición de la angiogénesis, la adhesión y la invasión de lesiones endometriósicas, así como una reducción en el tamaño de las mismas (Rogers et al, 2009).

#### 1.7.4.2.5.3 *Agonistas dopaminérgicos*

Los agonistas dopaminérgicos son compuestos que aúnan un bajo perfil de toxicidad junto con una amplia experiencia en su uso clínico. Estos fármacos, usados para el tratamiento de la hiperprolactinemia, se están ensayando actualmente en estudios piloto para el tratamiento de la endometriosis.

La posible implicación de los agonistas dopaminérgicos en la reducción de la angiogénesis se observó por primera vez en una sucesión de estudios realizados por el

grupo de Gómez et al sobre el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), (Gómez et al, 2002; Gómez et al, 2003; Gómez et al, 2006). Posteriormente se ensayó el efecto de los agonistas dopaminérgicos en modelos animales de endometriosis (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009), y los alentadores resultados obtenidos sirvieron de base para realizar un estudio piloto en mujeres con hiperprolactinemia y endometriosis (Gómez et al, 2011a).

Por las peculiaridades que presentan, y por el papel principal que ocupan en esta tesis, procede describir a continuación la naturaleza de dichos compuestos, previamente a describir los resultados observados con esta novedosa terapia, en los siguientes apartados.

#### *1.7.4.2.5.3.1 Dopamina*

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

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

#### *1.7.4.2.5.3.2 Receptores dopaminérgicos*

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

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

#### *1.7.4.2.5.3.3 Tipos de agonistas dopaminérgicos*

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



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

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

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

Los agonistas dopaminérgicos ejercen un efecto antiangiogénico al interferir la vía del VEGF/VEGFR2, a través de su receptor D2R (Basu et al, 2001). Puesto que el objetivo de la presente tesis doctoral es verificar el efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos sobre la reducción de tamaño de las lesiones endometriales, procedemos a desarrollar, en el siguiente apartado, el concepto de angiogénesis, previamente esbozado, y la relación entre angiogénesis y endometriosis.

## 1.8 VASCULOGÉNESIS, ANGIOGÉNESIS Y ENDOMETRIOSIS

En aras de facilitar la comprensión de diferentes conceptos que constituyen el eje vertebral del presente trabajo de investigación, en los siguientes párrafos profundizaremos en el conocimiento de la angiogénesis y revisaremos las evidencias que nos conducen a plantearnos, por un lado, la importancia de la angiogénesis en la implantación y desarrollo de las lesiones endometriales, y por tanto la potencial diana terapéutica que constituyen, así como el potencial papel antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos en la endometriosis.

### 1.8.1 Concepto

El término **angiogénesis** se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de los existentes. Este 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. 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 tras el nacimiento y durante la fase de crecimiento del individuo para desaparecer completamente durante la fase adulta.

- **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 entre angiogénesis fisiológica y patológica. La angiogénesis fisiológica se asocia generalmente 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 de 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 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 el proceso, y factores inhibidores de la angiogénesis (Folkman y Shing, 1992).

Por otro lado, la angiogénesis es imprescindible para el desarrollo de procesos patológicos como el crecimiento de los tumores, la artritis, la psoriasis, la retinopatía diabética, la aterosclerosis, la inflamación crónica y la endometriosis (Griffioen et al, 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.

### **1.8.2 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, que llega a la cavidad abdominal mediante la menstruación retrógrada (Prentice, 1992). Pero lo que realmente determina la aparición y desarrollo de la endometriosis es la supervivencia y crecimiento del tejido endometrial adherido (McLaren, 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 un proceso de 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 et al, 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 (Waller, 1993), observando en éste



un aumento de la presencia de vasos sanguíneos (Healy et al, 1998). Finalmente, se ha visto que la endometriosis crece sobretodo en áreas con abundante riego sanguíneo (Nisolle et al, 1993; Vernon y Wilson, 1985), 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 et al, 2004), parece ésta una diana adecuada 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. En este sentido, es importante conocer los principales factores implicados en la angiogénesis pues sobre ellos actuaríamos para tratar la endometriosis.

### **1.8.3 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

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

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



La hipoxia es uno de los principales inductores de la expresión del VEGF en la vida postnatal, y su acción determina la formación de vasos inmaduros y altamente permeables. El VEGF estimula la remodelación vascular favoreciendo la formación de brotes angiogénicos a partir de los cuales proliferan las células endoteliales, promoviendo el crecimiento de nuevos vasos. Así mismo, estimula la supervivencia de las células endoteliales evitando la apoptosis celular y la regresión de los vasos. Durante los últimos estadios de la neovascularización, el VEGF modula la expresión de genes implicados en la maduración y reestabilización de los vasos formados (Carmeliet, 2000; Hicklin y Ellis, 2005) culminando el proceso de angiogénesis.

La familia del VEGF está formada por una serie de ligandos emparentados y receptores. En el caso de los ligandos, encontramos al VEGF-A (conocido comúnmente como VEGF y principal sujeto de estudio) y sus homólogos VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PIGF). En cuanto a los receptores, encontramos el VEGFR1 (también flt-1), el VEGFR2 (también Flk--2/KDR) y el VEGFR3 (también flt-4) (Shalaby et al, 1995; Waltenberger et al, 1994).

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

El VEGF-A, comúnmente conocido como VEGF o factor de permeabilidad vascular (Ferrara y Henzel, 1989; Senger y Dvorak, 1993), es una glicoproteína dimérica de 34 a 46 KDa, una citoquina multifuncional (Senger et al, 1993) aislada a partir de las proteínas secretadas en las pequeñas venas hiperpermeables a macromoléculas que rodean los tumores (Senger et al, 1983), capaz de ligar heparina, y formada por polipéptidos con extremo N-terminal idénticos, unidos por puentes disulfuro. Esta

glicoproteína es capaz de unirse a uno de los múltiples receptores de la tirosina kinasa, lo que provoca su autofosforilación, consiguiendo la activación de proteínas kinasas con acción mitogénica (Keck et al, 1989).

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

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

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

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

### 1.8.3.1 Papel del VEGF y sus receptores en la angiogénesis

El VEGF dispone de receptores específicos presentes en las membranas de las células endoteliales y que pertenecen a la familia de la Tirosin-quinasa (De Vries et al, 1992). El VEGF muestra alta afinidad por tres receptores específicos de membrana (Figura 3) a través de los cuales desarrollan sus acciones como son el VEGFR1 (también flt-1), el VEGFR2 (también Flk-2/KDR) y el VEGFR3 (también flt-4) (Shalaby et al, 1995; Waltenberger et al, 1994).

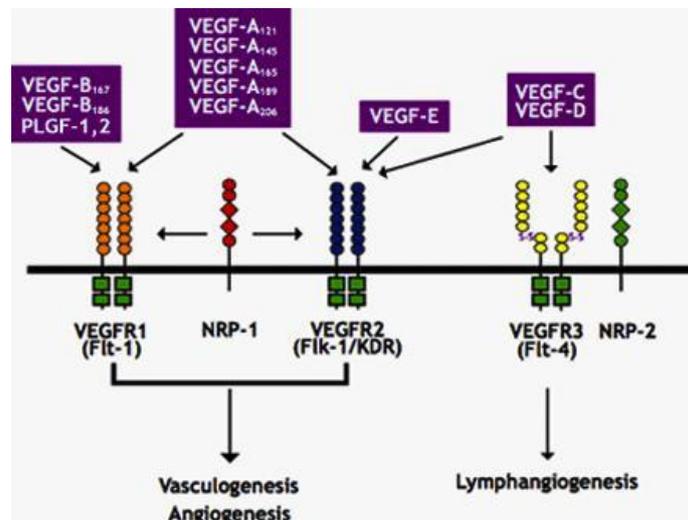


Figura 3. Receptores del VEGF. Adaptado de Berne y Levy, 1998.



El VEGFR1, que tiene mayor afinidad por el VEGF que VEGFR2, desempeña principalmente funciones de morfogénesis y estructuración de las células endoteliales (Fong et al, 1995), interviniendo en los procesos de ensamblaje, supervivencia y maduración del vaso. En cambio, VEGFR2 está implicado principalmente en la mitogénesis (Shalaby et al, 1995). Una vez activado promueve la proliferación y migración de células endoteliales, desempeñando las acciones angiogénicas propiamente dichas del VEGF (Gille et al, 2000). El VEGF actúa fundamentalmente a nivel de las células endoteliales (Senger et al, 1993) induciendo cambios en la expresión génica de la célula (Pepper et al, 1992), en su forma (Senger et al, 1993), estimulando su migración y división, y aumentando los niveles de calcio intracelulares (Connolly et al, 1989).

#### ***1.8.3.2 Endometriosis y VEGF***

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

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha localizado la presencia de VEGF tanto en el epitelio como en el estroma del endometrio eutópico en la fase proliferativa,



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

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

El líquido peritoneal desempeña un papel fundamental en la implantación, supervivencia y propagación del tejido endometrial ectópico (Koninckx et al, 1998; Ramey et al, 1993). Se ha demostrado la presencia de VEGF en el líquido peritoneal de



las mujeres con endometriosis (McLaren et al, 1996), siendo mayores los niveles en mujeres con enfermedad severa (Shifren et al, 1996).

Reseñada la importancia de la angiogénesis en el mantenimiento y desarrollo de los implantes endometriósicos, la inhibición de este mecanismo se postula como una alternativa terapéutica potencialmente eficaz en el tratamiento de la endometriosis.

### ***1.8.3.3 Inhibidores comerciales del sistema VEGF***

Los agentes angiostáticos, inhibidores de la angiogénesis, se empezaron a emplear en oncología médica como terapia experimental desde que Judah Folkman (Folkman, 2002) identificara el imprescindible papel de la angiogénesis en el crecimiento y mantenimiento de estos tumores. Estas terapias fueron impulsadas más si cabe con el descubrimiento del VEGF en 1989 por Ferrara y colaboradores (Ferrara y Henzel, 1989) y con el inmediatamente posterior nacimiento de compuestos diseñados para inhibir el VEGF (Ferrara, 2002). Estas sustancias, ya sean anticuerpos bloqueantes del propio ligando VEGF (Hull et al, 2003) o del VEGFR2 (Nap et al, 2004), en definitiva persiguen impedir la unión ligando-receptor o la transducción de la señal, entorpeciendo la angiogénesis (Molema et al, 1998; Nap et al, 2004).

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



máxime si estos agentes afectan a la implantación y desarrollo embrionario en mujeres fértiles.

Esta circunstancia no ha sido obstáculo para que el uso de estos inhibidores, ya fuera anticuerpos bloqueantes del propio ligando VEGF o del VEGFR2, se haya ensayado en modelos animales de endometriosis (Hull et al, 2003; Nap et al, 2004) u otras enfermedades angiogénico-dependientes en aras de confirmar el papel de dicho sistema en el desarrollo de estas patologías. De modo que estos hallazgos servirían como motivación para el futuro ensayo/diseño de nuevas drogas menos tóxicas, pero igualmente efectivas sobre las dianas a estudio, de modo que permitieran su uso terapéutico en humanos.

Por lo que respecta a confirmar el papel del sistema VEGF en la endometriosis, existen varios trabajos empleando ratones inmunodeprimidos con implantes de endometrio humano como modelos animales de experimentación en endometriosis. Son referencia fundamentalmente los trabajos de Hull (Hull et al, 2003) que emplearon dos aproximaciones terapéuticas anti-VEGFR; en primer lugar, administraron el receptor soluble del VEGF (sVEGFR1) que consiste en una variante truncada del receptor 1 que carece de dominio transmembrana y que por lo tanto no transduce señal. El sVEGFR1 actuaría como un secuestrador natural del VEGF inhibiendo su actividad; y en segundo lugar administraron un anticuerpo anti-VEGF-A que de igual modo bloquea la actividad de VEGF impidiendo su unión a receptores de membrana. En ambos casos, obtuvieron un resultado similar, esto es, una disminución significativa en el tamaño y número de los explantes endometriósicos, a la vez que se evidenciaba destrucción vascular (Hull et al, 2003).



De forma similar, Nap y colaboradores, emplearon diversos componentes antiangiogénicos para inhibir lesiones endometriósicas tras el trasplante de endometrio humano en un modelo animal murino (Nap et al, 2004). A las 2 semanas del tratamiento, tanto un inhibidor específico del VEGF (Avastin), como otros potentes inhibidores generales de la angiogénesis (TPN-470, endostatina, anginex) habían disminuido de forma significativa la incidencia de lesiones endometriósicas y la presencia de vasos sanguíneos en estas lesiones respecto a los animales controles cuyos implantes fueron tratados con placebo.

No obstante, como hemos comentado anteriormente, estos compuestos tenían efectos indeseables que podían involucrar a muchos procesos fisiológicos, incluyendo la gestación temprana, induciendo la luteólisis a través del bloqueo sobre la angiogénesis ovárica, interfiriendo en la implantación (Pauli et al, 2005; Wulff et al, 2001; Zimmermann et al, 2001, 2003), así como en la angiogénesis a nivel uterino (Heryanto et al, 2003; Rockwell et al, 2002).

Por tanto, una vez establecida la relación entre endometriosis y angiogénesis, repasados los sistemas de angiogénesis implicados en la misma, y demostrada la inhibición del crecimiento de los implantes en modelos in vitro e in vivo (Hull et al, 2003; Nap et al, 2004), queda pendiente obtener nuevas terapias antiangiogénicas, menos tóxicas e igual de efectivas, que permitan tratar las lesiones endometriósicas sin los efectos secundarios descritos con los compuestos antiangiogénicos ensayados.

### **1.8.4 Agonistas dopaminérgicos, angiogénesis y endometriosis**

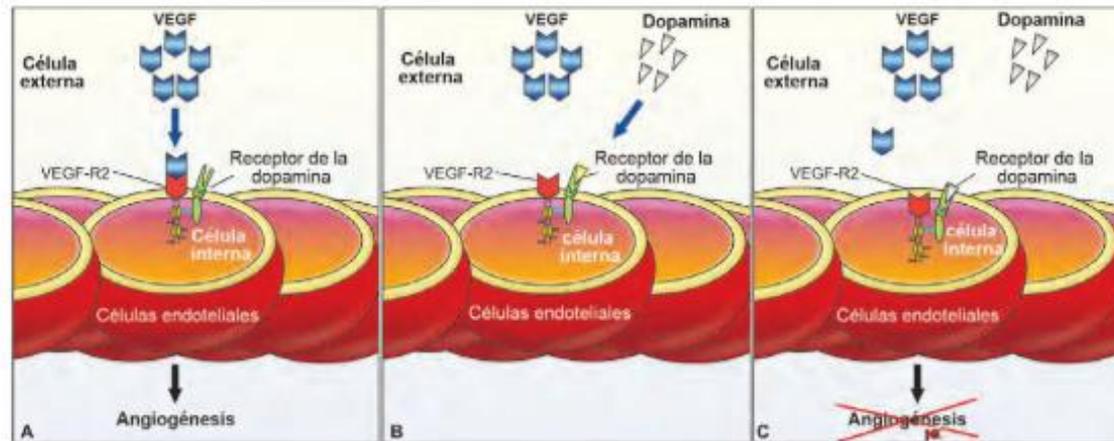
Como ya adelantamos en el apartado de ‘Terapias antiangiogénicas’, los agonistas dopaminérgicos ejercen un efecto antiangiogénico al interferir la vía del VEGF/VEGFR2, a través de su receptor D2R (Basu et al, 2001). Desarrollamos a continuación la sucesión de acontecimientos que permitieron proponer a los agonistas dopaminérgicos como una posible opción terapéutica en el tratamiento de la endometriosis, en aras de su efecto inhibidor de la angiogénesis y su bajo perfil de efectos adversos.

#### ***1.8.4.1 Agonistas dopaminérgicos y regulación del sistema VEGF/VEGFR2***

La sucesión de estudios sobre el SHO realizado por el grupo de investigación de Gómez y colaboradores (Gómez et al, 2002; Gómez et al, 2003; Gómez et al, 2006) en el pasado ejemplifica cómo se pueden desarrollar estrategias para la obtención de terapias antiangiogénicas no tóxicas frente a enfermedades VEGF/VEGFR2 dependientes que no interfieran con el hecho reproductivo.

El SHO es una enfermedad VEGF/VEGFR2 dependiente, y para demostrar la importancia de este sistema en dicha enfermedad, Gómez y colaboradores mostraron que el incremento de la permeabilidad vascular se podía revertir utilizando un anticuerpo específico que bloquea el VEGFR2, el SU5416 (Fong et al, 1999). Pero debido a los efectos secundarios que producía (tromboembolismo y vómitos), así como la posibilidad de interferir en el desarrollo de la gestación bloqueando la implantación ovario-dependiente y la angiogénesis uterina (Pauli et al, 2005; Wulff et al, 2001; Zimmermann et al, 2001, 2003), este compuesto no pudo ser utilizado para la clínica en el SHO.

En dicho estudio, Gómez y colaboradores observaron que el gen que codifica para la tiroxin-hidroxilasa, un enzima crítico en la síntesis de dopamina, está expresado a la baja en los animales con SHO (Gómez et al, 2003).



**Figura 4. Mecanismo de acción antiangiogénico del agonista dopaminérgico.** Adaptado de García-Velasco y Rízt, 2010. Durante el proceso de angiogénesis, el VEGF se une a su receptor VEGFR2 que se encuentra en la superficie de las células endoteliales, promoviendo la fosforilación del receptor y el inicio de la cascada de señalización angiogénica (A). La dopamina, utilizada a niveles no tóxicos, se une al D2R, promoviendo la endocitosis de VEGFR2 en las células endoteliales y previniendo la unión de VEGF-VEGFR2, un paso crítico en la neoangiogénesis. Como consecuencia, no se produce fosforilación de VEGFR2 ni cascada de señales.

Esto fue de gran interés, ya que se sabía que la dopamina ejerce un efecto antiangiogénico al interferir la vía del VEGF/VEGFR2, concretamente a través de su receptor D2R (Basu et al, 2001). En su estudio sobre los cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical, Basu y colaboradores afirmaban que el VEGF unido a su receptor tipo 2 produce la fosforilación del receptor, y que la dopamina disminuye esta fosforilación al reducir la expresión del VEGFR2 en la superficie de estas células, estimulando su internalización por endocitosis (Basu et al, 2001).



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

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

Apenas un año más tarde que en ratones (Gómez et al, 2006), se ensayó exitosamente la cabergolina como opción terapéutica para el SHO en humanos (Álvarez et al, 2007).

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

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



#### *1.8.4.2 Uso de agonistas dopaminérgicos en modelos animales de endometriosis*

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

Para que la dopamina o alguno de sus análogos ejerza una acción antiangiogénica sobre el tejido endometriósico de forma directa, parece lógico pensar que ésta debe unirse al receptor dopaminérgico (D2R) presente en dicho tejido.

En un trabajo publicado por Novella-Maestre se puso de manifiesto, por primera vez, la existencia de receptores para la DA de tipo 2 en el tejido endometrial humano, tanto eutópico como endometriósico (Novella-Maestre et al, 2010). Observaron, asimismo, que la expresión del VEGF y del VEGFR era mucho mayor en las lesiones peritoneales rojas más activas que en las negras y blancas, menos activas. En cambio, la presencia de D2R en las lesiones endometriósicas era menor cuando mayor era la actividad de ésta, sugiriendo incluso un posible papel del sistema dopaminérgico en la modulación de la endometriosis.

Confirmada la presencia del sistema dopaminérgico en el tejido endometriósico, Novella et al establecieron un modelo animal heterólogo de endometriosis tras implantar tejido endometrial humano en peritoneo de ratones nude inmunodeprimidos. En este trabajo se demostró que el uso de Cabergolina produce



una disminución del tamaño de las lesiones activas y una disminución significativa del índice proliferativo (Novella-Maestre et al, 2009). Además, las lesiones observadas en los ratones tratados presentaban microscópicamente un estroma más laxo, con menor celularidad y una reducción del componente glandular (Novella-Maestre et al, 2009). Se pudo observar un aumento de la expresión de los genes que codifican para el D2R y un aumento de este receptor en el tejido, que fue tanto mayor cuanto mayor fue la dosis de fármaco. Se comprobó que el uso de cabergolina se asociaba a una disminución en la expresión de los factores proangiogénicos como VEGF y un aumento de la expresión de marcadores anti-angiogénicos como Angiopoyetina 1 (Ang-1), (Novella-Maestre et al, 2009). Finalmente, se confirmó que el nivel de fosforilación del VEGFR2 fue significativamente menor en los ratones tratados, de acuerdo con los hallazgos encontrados en el modelo del SHO anteriormente (Gómez et al, 2006).

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

A raíz de los resultados de los estudios de Novella-Maestre y Delgado-Rosas y colaboradores (Delgado-Rosas et al, 2011, Novella-Maestre et al, 2009) el grupo de investigación del Dr. Gómez se planteó valorar el efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos en lesiones endometriósicas en humanos. La ejecución de dichos estudios se describe a continuación.



#### *1.8.4.3 Uso de agonistas dopaminérgicos en humanos con endometriosis*

Tras verificar el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la reducción de tamaño de las lesiones endometriósicas en modelos animales de endometriosis, el grupo de investigación del Dr. Gómez se propuso valorar el efecto antiangiogénico de dichos compuestos en humanos con endometriosis.

El hecho de que los agonistas dopaminérgicos no estén aprobados para su uso clínico en la endometriosis hizo que se escogieran pacientes con hiperprolactinemia y endometriosis, con lo que las pacientes tomaban estos fármacos como tratamiento de su patología de base.

Para llevar a cabo su estudio, por tanto, 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 quinagolida como tratamiento de su patología basal (hiperprolactinemia). Tras cuatro meses de tratamiento se realizó una segunda laparoscopia exploradora con el objetivo de prevenir adherencias y que 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 D2R en las mismas y una disminución de la expresión del VEGFR2 estadísticamente significativo. Sin embargo, no se pudo demostrar en humanos



diferencias significativas en cuanto a la vascularización y neoformación de vasos (Gómez et al, 2011a).

Al margen del último estudio desarrollado, estudio piloto en humanos, la inducción de endometriosis en modelos animales constituye una herramienta imprescindible para estudiar la evolución de enfermedades humanas, así como para ensayar la respuesta de las mismas a diferentes tratamientos, constituyendo, además, el eslabón fundamental que permite el salto de compuestos a la práctica clínica habitual. Dado que esta tesis se desarrolla sobre un modelo murino de endometriosis, introducimos a continuación una breve reseña de los mismos para una mejor comprensión del trabajo desarrollado.

## 1.9 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 (Becker et al, 2006; Delgado-Rosas et al, 2011; Ozer H et al, 2013; Ricci AG et al, 2011). Dentro de estos, unos de los más atractivos 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, 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 et al, 2006; Fortin et al, 2003; Fortin et al, 2004). 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.

### 1.9.1 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 o de un individuo singénico. Ambos animales (donante y receptor) deben ser ovariectomizados y tratados con estrógenos a fin de que no haya diferencias estrogénicas entre ellos. Para estos estudios se utilizan animales inmunocompetentes. Este tipo de modelo se ha desarrollado con ratas, ratones, hámsters y conejos, aunque se han empleado con mayor frecuencia los dos primeros.

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. Además, la expresión de citoquinas y quimoquinas de los implantes endometriósicos es similar a la de la endometriosis humana (Umezawa et al, 2012). Por otra parte, uno de los principales inconvenientes que presentan este tipo de modelos es que el endometrio no suele separarse del miometrio para realizar los implantes, por lo que, al evaluar el tamaño y el peso de las lesiones producidas, la presencia de miometrio puede distorsionar los resultados. Otro de los inconvenientes sería lo poco fisiológico que resultan en comparación con el humano por dos características como son:

- La necesidad de aporte exógeno de estradiol para mantener el implante dado que estos animales están ovariectomizados.
- Los roedores no menstrúan, sino que tienen ciclos estrales de descamación, a diferencia de lo que ocurre en el humano.

Algunas de las desventajas de los modelos homólogos han sido superadas en un trabajo de 'Modelo homólogo mejorado o actualizado' (Cheng et al, 2011). En dicho modelo un tejido más parecido al menstruante es generado gracias a la inducción de la decidualización en útero murino. Posteriormente este tejido pseudodecidualizado es el que será implantado en los receptores. En dicho estudio Charnock-Jones (Cheng et al,



2011) evidenció que cuando así se producía, el tejido implantado podía sobrevivir sin necesidad de aporte exógeno de estradiol tan sólo con las variaciones cíclicas endógenas del propio animal receptor

### **1.9.2 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%, ésta puede elevarse al 100% cuando los implantes son cosidos o pegados mediante adhesivo tisular. Este dato es importante si se van a realizar ensayos con posibles fármacos, ya que, si el número de lesiones es diferente entre los animales testados, los resultados pueden verse comprometidos (Grummer et al, 2001).

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 et al, 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 et al, 2001). Posteriormente, se desarrollaron los ratones NOD/SCID/ $\gamma$ 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 et al, 2005). Por otra parte, en 2004, Greenberg y Slayden utilizaron un ratón knockout [RAG-2/ $\gamma$ (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 y Slayden, 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. Sin embargo, no hay que olvidar que se trata de ratones inmunodeprimidos, por lo que no pueden ser usados para estudios de inmodulación.

Recientemente 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 modificados genéticamente a tal fin (Buiges, 2018).

La principal limitación de estos modelos animales, aparte de ser un modelo animal para estudiar una enfermedad humana, 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.

## **1.10 JUSTIFICACIÓN DE REALIZAR UNA EVALUACIÓN ESTANDARIZADA DEL POTENCIAL ANTIANGIOGÉNICO DEL AGONISTA DOPAMINÉRGICO EN EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS**

La endometriosis es una enfermedad crónica, de elevada prevalencia y etiopatogenia no claramente establecida, para la que no se dispone, actualmente, de un tratamiento seguro y eficaz a largo plazo.

Una de las teorías más aceptadas que trata de explicar la etiopatogenia de la enfermedad, la teoría de la menstruación retrograda de Sampson (Sampson, 1927), propone que la endometriosis se origina a partir de fragmentos de endometrio refluídos a la cavidad abdominal mediante un proceso de menstruación retrógrada. Sin embargo, el inicio y mantenimiento de la enfermedad viene determinado, no sólo por la presencia de tejido endometrial en la cavidad peritoneal (hecho común en más del 90% de las mujeres), sino por la capacidad de éste de implantarse y proliferar, respondiendo a estímulos hormonales.

Se han señalado múltiples factores que pueden determinar la capacidad de implantación y desarrollo de los fragmentos endometriales refluídos, como la alteración del ambiente hormonal, ciertas alteraciones del sistema inmunológico, u otros factores que faciliten la capacidad de adhesión e invasión de las células endometriales, sin olvidar la importancia de un adecuado aporte vascular.

La necesaria relación entre angiogénesis y endometriosis ha sido publicada en múltiples ocasiones. Así, se ha descrito que las lesiones endometriósicas crecen en las zonas más vascularizadas, que este aporte sanguíneo procede de las áreas circundantes, y que las



lesiones más vascularizadas son más activas (Healy et al, 1998; Vernon y Wilson, 1985).

Se ha demostrado, además, la presencia de VEGF-A en endometrio humano (Kressin et al, 2001; Tan et al, 2002), y en líquido peritoneal de mujeres con endometriosis (McLaren et al, 1996). Se postula que los valores de VEGF varían en función del tipo de lesión endometrial, y el grado de enfermedad, siendo mayores en las lesiones más vascularizadas y activas (Donnez et al, 1998; McLaren et al, 1996).

Establecida, por tanto, la angiogénesis como uno de los requisitos fundamentales en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad, la inhibición de dicho proceso se postula como una potencial diana terapéutica en el tratamiento de la endometriosis.

En este sentido, los agentes inhibidores de la angiogénesis, ya sea anticuerpos bloqueantes del propio ligando VEGF o del receptor VEGFR2, se han ensayado en modelos animales de endometriosis (Hull et al, 2003; Nap et al, 2004) con el objetivo de confirmar el papel de dicho sistema en el desarrollo de esta patología. Sin embargo, el intolerable perfil de efectos adversos que presentan estos compuestos antiangiogénicos limita su uso en humanos con enfermedades no oncológicas.

El potencial efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos, revelado por la sucesión de estudios realizados sobre el SHO por el equipo del Dr. Gómez y colaboradores (Álvarez et al, 2007; Gómez et al, 2003; Gómez et al, 2006), abrió una nueva línea de investigación en el campo de la endometriosis.

Así, el grupo de trabajo de Novella-Maestre et al puso de manifiesto la existencia de receptores dopaminérgicos D2R en el tejido endometrial humano, tanto eutópico como endometriósico (Novella-Maestre et al, 2010). Confirmada la presencia del sistema



dopaminérgico en el tejido endometrial, se llevaron a cabo dos estudios sucesivos, en modelo animal murino heterólogo de endometriosis (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009), con el fin de determinar el potencial antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos. En ambos casos se objetivó una reducción en el tamaño de las lesiones endometriales y del índice proliferativo, así como una reducción en la expresión de factores proangiogénicos como VEGF y un aumento en la expresión de marcadores anti angiogénicos como Ang1, tanto para la cabergolina (Novella-Maestre et al, 2009), como para la quinagolida (Delgado-Rosas et al, 2011).

A raíz de los resultados de dichos estudios, el grupo de investigación del Dr. Gómez se planteó valorar el efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos en lesiones endometriósicas en humanos, administrando un agonista dopaminérgico a mujeres afectas de hiperprolactinemia y endometriosis confirmada por vía laparoscópica. Los resultados mostraron una importante disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas asociado a un incremento en la expresión del D2R en las mismas y una disminución de la expresión del VEGFR2 estadísticamente significativo, sin poderse establecer diferencias significativas en cuanto a vascularización y neoformación de vasos (Gómez et al, 2011a).

Una lectura rápida de los citados estudios podría llevarnos a afirmar que los agonistas dopaminérgicos producen una reducción significativa de tamaño de las lesiones endometriales, inhibiendo potencialmente el sistema VEGF-VEGFR2 de forma no tóxica, tanto en modelos animales (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) como en humanos (Gómez et al, 2011a).

Sin embargo, un análisis más detallado de estos estudios nos revela resultados discordantes, en dos aspectos fundamentales; la reducción de tamaño de las lesiones



endometriales, en primer lugar, y que esta reducción sea secundaria a un efecto antiangiogénico. Vamos a examinar a continuación de forma más detallada dichos resultados.

A nivel macroscópico, en los estudios en modelo animal realizados por Novella-Maestre y Delgado-Rosas y colaboradores, se objetivó una reducción moderada, aunque significativa en el tamaño de las lesiones endometriales; el tamaño de las lesiones se estimó mediante callipers. El pequeño tamaño, la forma irregular, la consistencia y los diferentes grados de invasión que presentan estas lesiones nos llevan a plantearnos si el método utilizado de medida es lo suficientemente exacto, fiable y reproducible.

Así mismo, se evidenció una reducción marcada en la vascularización macroscópica de las lesiones, sin reducción de la densidad vascular. En este sentido, se observó una reducción en la proporción de vasos inmaduros, que se justifica por la mayor sensibilidad a las señales angiogénicas de los vasos inmaduros o de nueva formación, no cubiertos por pericitos (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009).

En el estudio piloto en humanos, por el contrario, se objetivó a nivel macroscópico una importante reducción de tamaño de las lesiones endometriales (con desaparición total de algunas de ellas), pero sin reducción de la vascularización macroscópica ni de la neoangiogénesis tras el tratamiento con agonistas dopaminérgicos (Gómez et al, 2011a).

A nivel histológico, tanto en los estudios en animales como en humanos se objetivó una desestructuración de las lesiones endometrióticas recuperadas tras el tratamiento con agonistas dopaminérgicos, observándose un estroma laxo y con pérdida de celularidad, así como una reducción de la ratio glándulas/estroma, hallazgos característicos de tejidos atróficos o degenerativos.



En cuanto al índice de proliferación celular, valorado por la presencia de Ki67 mediante técnicas de inmunohistoquímica, se encontró reducido de forma significativa en las lesiones de los estudios sobre modelo animal (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009), pero no en las lesiones del estudio en humanos (Gómez et al, 2011a).

En cuanto a marcadores inmunohistoquímicos de angiogénesis, en los estudios realizados en roedores se constató una disminución en la expresión de factores proangiogénicos como VEGF y un aumento de la expresión de marcadores antiangiogénicos como Ang-1, (Novella-Maestre et al, 2009), así como una reducción significativa en el nivel de fosforilación del VEGFR2; hallazgos que se hicieron extensivos a la quinagolida posteriormente (Delgado Rosas et al, 2011). En el estudio piloto en humanos se constató una regulación a la baja de VEGF/VEFR2, reducción de citocinas proangiogénicas (CCL2, RUNX1 y AGGF1), así como del PAI1 (plasminogeno activador inhibidor), potente inhibidor de la fibrinólisis. Con estos hallazgos se sugiere un mecanismo de acción de la quinagolida no mediado exclusivamente por su efecto antiangiogénico, sino también por un efecto antiinflamatorio y estimulador de la fibrinólisis.

Los resultados discordantes señalados nos llevan a replantearnos hasta qué punto el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre los implantes endometriósicos está mediado por sus efectos antiangiogénicos, si estos efectos antiangiogénicos se traducen en una reducción de tamaño de las lesiones endometriales, o si por contra, existen otras vías a través de las cuales ejercen su efecto.

Nos planteamos porqué no se objetivaron cambios en los parámetros de angiogénesis en el estudio en humanos, cambios que sí se describieron en los estudios previos en modelo



animal. Una posibilidad es que estos cambios se produzcan, pero no hayamos sido capaces de detectarlos, por el bajo número de pacientes que se estudiaron, o porque las lesiones en las que realmente se produjeron estos fenómenos redujeron tanto su tamaño que no pudieron ser recuperadas para su análisis posterior.

Otra posibilidad es que realmente estos cambios no se produzcan en humanos, o se produzcan en mucha menor cuantía, porque intervengan otros mecanismos (reducción de la inflamación secundaria a la cirugía, aumento de la fibrinólisis, etc) o por el importante papel que el sistema inmunológico tiene en la patogenia de la endometriosis, que podría ser el responsable de enmascarar los fenómenos antiangiogénicos que sí se observan en modelos animales no inmunocompetentes.

Además, otro parámetro a tener en consideración es la relevancia biológica de los hallazgos en los estudios en modelos animales. Al ser comparados los agonistas dopaminérgicos únicamente con un grupo control, no queda claro si la reducción que se constata en los parámetros de angiogénesis, a pesar de ser estadísticamente significativa, tiene una relevancia biológica real.

Con la finalidad de esclarecer la importancia del efecto antiangiogénico en la reducción de tamaño de las lesiones endometriales, nos planteamos realizar un estudio en un modelo animal de endometriosis inmunocomprometido, comparando un agonista dopaminérgico, la Cabergolina, con un compuesto estándar anti VEGF y un grupo placebo.

Elegimos un modelo animal de endometriosis inmunocomprometido con el fin de evitar que el papel inmunomodulador de los agonistas dopaminérgicos, así como el propio sistema inmunitario del animal, puedan enmascarar la evaluación de los efectos antiangiogénicos en la reducción de tamaño de las lesiones endometriósicas.



De entre los diferentes parámetros que pretendemos evaluar en el estudio, el tamaño de la lesión endometrial ocupa un lugar prioritario. Tal y como se ha comentado previamente, nos planteamos hasta qué punto la medición mediante callipers realizada en estudios previos (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) es adecuada, dado el pequeño tamaño de las lesiones, y por tanto reproducible y fiable. Esto es importante porque de ser así, que los agonistas dopaminérgicos no disminuyan realmente el tamaño de las lesiones endometriales en roedores, podría inferirse que los agonistas dopaminérgicos no fueron efectivos en reducir el tamaño en humanos, y que lo que hemos visto en humanos (Gómez et al, 2011a) no sea un efecto de la medicación sino un artefacto del estudio.

Por tanto, independientemente de que los agonistas dopaminérgicos ejerzan un efecto reduciendo la angiogénesis en roedores (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009), debemos aclarar si estos efectos se traducen en una reducción de tamaño de las lesiones endometriales. En este sentido, nos planteamos realizar una valoración del tamaño de las lesiones no invasiva e in vivo, mediante monitoración no invasiva de inmunofluorescencia (ver más adelante, material y método).

Hace falta constatar no sólo que estos compuestos tienen efectos antiangiogénicos en ratones, sino que estos efectos se asocian realmente con una reducción en el tamaño de las lesiones endometriales que no se pudo objetivar claramente en los estudios en roedores (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009).

Con el estudio que planteamos realizar pretendemos, en primer lugar, determinar la relevancia biológica del efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos en el tratamiento de la endometriosis, para lo que necesariamente debemos realizar un estudio comparativo con un compuesto antiangiogénico estándar; y en segundo lugar, constatar



que estos efectos antiangiogénicos se traducen en una reducción real de tamaño de las lesiones endometriales.

Visto el potencial que pueden tener estos compuestos, pero que no se acaban de instaurar en la práctica clínica diaria es necesario mejorar la evidencia en cuanto a su actividad, de forma que se justifique su uso en clínica.



## 2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

---

El uso de compuestos antiangiogénicos en modelos animales ha demostrado reducir el tamaño de lesiones endometriósicas; sin embargo, el uso de estos compuestos en humanos se ve limitado por el intolerable perfil de efectos adversos que presenta.

Los agonistas dopaminérgicos (fármacos con un perfil de tolerabilidad aceptable) han demostrado, en modelos animales, reducir el tamaño de los implantes endometriósicos mediante un mecanismo inhibitor de la angiogénesis. Si bien en estudios en humanos estos fármacos han demostrado reducir el tamaño de las lesiones endometriósicas, no se ha replicado la observación de disminución de la angiogénesis, lo cual plantea dudas razonables respecto al mecanismo de acción de estos.

Nosotros creemos que la imposibilidad de detectar efectos antiangiogénicos en humanos se debió a la destrucción masiva de tejidos que enmascaró dicha observación. Por ello, sostenemos que los agonistas dopaminérgicos sí juegan un papel significativo en la inhibición de la angiogénesis de manera comparable a los estándares de referencia, los bloqueantes anti VEGF/VEGFR2 comerciales, y que por ello serán capaces de inhibir el crecimiento de la lesión de manera similar a estos.

En aras de esclarecer el potencial antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos en el contexto de la enfermedad endometriósica, así como la reducción de tamaño de los implantes endometriósicos secundaria a los efectos antiangiogénicos, nos planteamos realizar un estudio experimental en un modelo murino heterólogo de endometriosis, comparando el potencial antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos con un compuesto inhibitor de VEGF y un grupo control.





## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Determinar el impacto de la cabergolina, un agonista dopaminérgico, sobre la vascularización y el tamaño de las lesiones endometriales en un modelo experimental murino, mediante comparación frente a un compuesto antiangiogénico estándar anti VEGF.

### 3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Desarrollar un modelo murino de endometriosis con monitorización no invasiva del tamaño de la lesión endometrial.
- Determinar el impacto sobre el potencial proliferativo y la apoptosis de las posibles acciones anti-angiogénicas de la cabergolina frente a un compuesto antiangiogénico estándar anti VEGF.
- Determinar el efecto de la cabergolina sobre la neovascularización frente a un compuesto antiangiogénico estándar anti VEGF.
- Determinar el efecto de la cabergolina sobre vías reguladoras de la angiogénesis, específicamente la expresión génica y proteica de VEGFR2 así como la expresión génica de VEGF, VEGFR2, y angiopoyetina 1 frente a un compuesto antiangiogénico estándar anti VEGF.



## 4 MATERIAL Y MÉTODOS

---

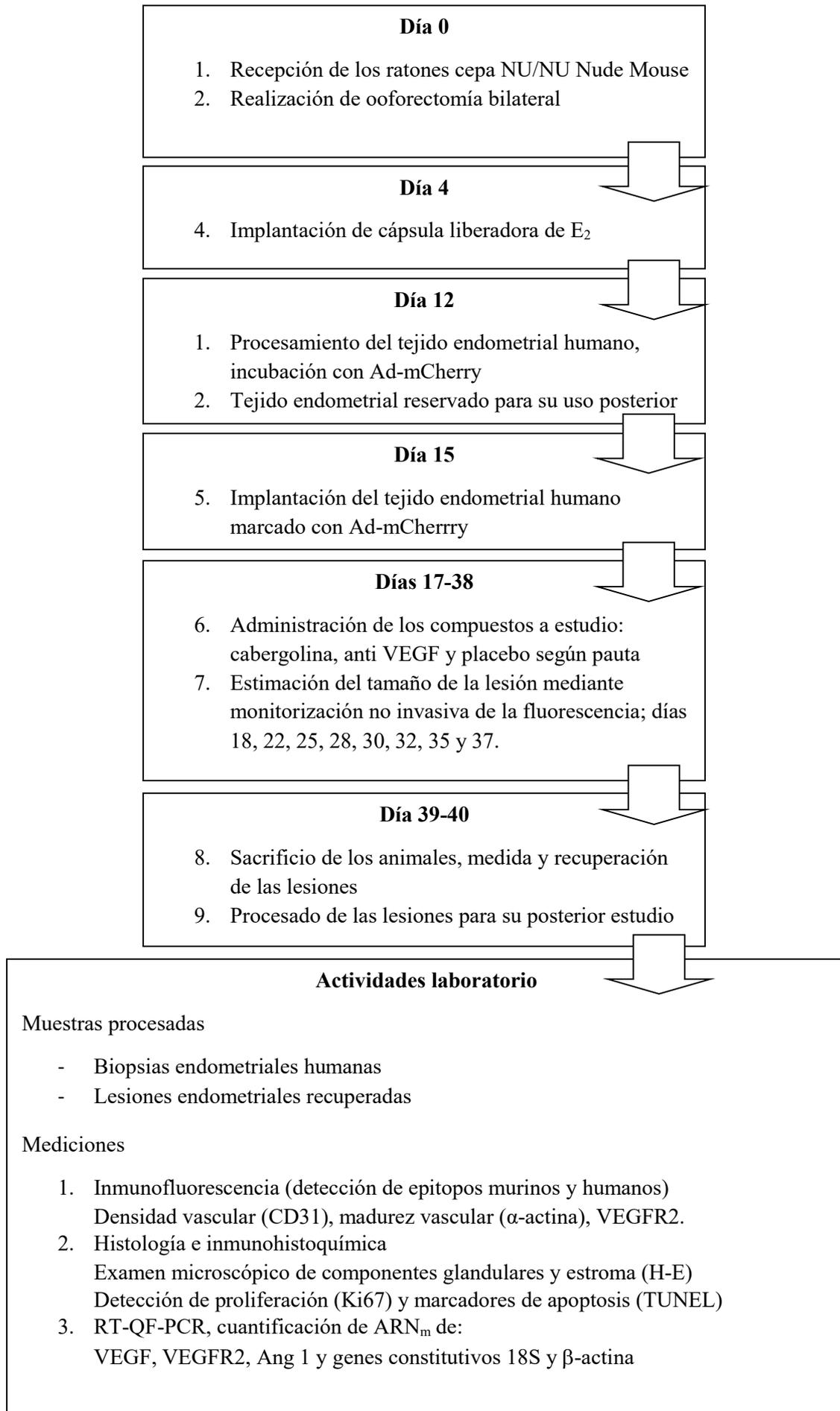
A continuación, esbozamos brevemente el diseño experimental desarrollado para la ejecución de los objetivos perseguidos en este trabajo de investigación.

Para llevar a cabo el presente estudio, se implantó tejido endometrial humano, marcado con proteína inmunofluorescente Ad-mCherry, en 24 ratones hembra inmunocoprometidos, previamente ooforectomizados. Se administraron los compuestos a estudio (agonista dopaminérgico, compuesto anti-VEGF y control) durante un periodo de tres semanas, durante el cual se hizo un seguimiento no invasivo del tamaño de la lesión, mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por el tejido endometrial. Al finalizar el tratamiento se procedió al sacrificio de los ratones y a la recuperación de las lesiones para su estudio. Se realizó:

- Un estudio histológico, valorando la presencia de glándulas y estroma.
- Determinación de la densidad vascular, madurez de los vasos, apoptosis e índice de proliferación; así como cuantificación mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de los niveles de expresión de proteína VEGFR2.
- Cuantificación mediante RT-PCR de los niveles de ARN<sub>m</sub> de VEGF, VEGFR, y angiopoyetina 1 (Ang 1).



## 4.1 ESQUEMA TEMPORAL DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN



## 4.2 MODELO ANIMAL MURINO HETERÓLOGO DE ENDOMETRIOSIS

La experimentación animal se realizó en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, 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 y el Convenio Europeo 1-2-3, 18 de marzo de 1986).

Los procedimientos de experimentación animal fueron acordes con los Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio (National Institutes of Health, NIH; publicación nº 85-23, revisado en 1985).

Un total de 24 ratones hembra inmunocomprometidos (atímicos, cepa NU/NU Nude Mouse (Crl:NU-Foxn1nu)), de 5 semanas de edad, fueron adquiridos en Charles River para la realización de este proyecto.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) y temperatura (26°C), con libre acceso a comida y bebida.

Con el fin de anular los cambios cíclicos hormonales, las ratonas fueron ooforectomizadas, mediante una pequeña incisión dorsal. Las incisiones fueron cerradas mediante un adhesivo tisular, y los animales se dejaron en reposo durante 4 días.

Al cuarto día, se procedió a la implantación subcutánea, en la región del cuello, de cápsulas de liberación prolongada de estradiol (18mg de 17 $\beta$ -E2) con el fin de homogeneizar los niveles hormonales.

La implantación de los fragmentos de endometrio previamente marcados con proteína inmunofluorescente Ad-mCherry se realizó unos 11-12 días más tarde.

### **4.3 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS ENDOMETRIALES HUMANAS**

El uso de este material obtenido de mujeres sanas fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínic Universitari de València, y las muestras fueron tomadas acorde a la legislación vigente en investigaciones, Ley 14/2007 de 3 de julio, de investigación biomédica.

Las muestras de tejido endometrial humano eutópico se obtuvieron mediante biopsia endometrial de mujeres sanas que se sometían a una cirugía para una intervención de esterilización tubárica definitiva. El procedimiento se realizó con cánulas Endosampler (MedGynEndosampler™), la cual permite la obtención de una biopsia profunda y no fragmentada, que se procesaba de forma inmediata. Se obtuvieron un total de 9 muestras, durante la fase endometrial proliferativa tardía o secretora temprana del ciclo menstrual.

Las muestras obtenidas fueron sumergidas inmediatamente en medio de mantenimiento (M199 medium; Gibco - 10% suero fetal bovino (FBS; PAA), solución antibiótica y antimicótica (Gibco), y solución tampón (HEPES) de 10mmol/L N-2-hidroxiethylpiperacina-NO-2-ácido etanosulfónico), y transportadas en frío al laboratorio para su procesamiento. Se desecharon dos de las muestras por su apariencia excesivamente laxa y/o excesiva cantidad de moco. Los fragmentos de tejido de las muestras restantes fueron colocados en placas de Petri, cortados en fragmentos de 5-10mm<sup>3</sup>, y cuidadosamente puncionados con una jeringa de 24G con el fin de incrementar la superficie de tejido expuesta. Se obtuvieron aproximadamente entre 40-50 fragmentos de tejido de cada biopsia. Dichos fragmentos fueron colocados en placas

(3 fragmentos de tejido por placa, en un total de 70 placas) y lavados en dos ocasiones con medio sin antibiótico M199.

### **4.3.1 Marcaje del tejido endometrial humano procesado**

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 esta (CFP, del inglés Cyan Fluorescent Protein; YFP, del inglés Yellow Fluorescent Protein) y mCherry entre otras.

De las diferentes técnicas de transferencia génica en células de mamífero que existen, el empleo de virus como vectores constituye el método más eficaz y es el que se decidió emplear en la presente tesis doctoral.

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 huéspedes 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. 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 en cuyo genoma ha sido introducido el gen que codifica para Ad-mCherry, una proteína fluorescente roja. Estos vectores virales han sido empleados para conseguir el marcaje fluorescente del tejido endometrial humano, marcaje que posibilita su seguimiento in vivo.

Ad-mCherry fue obtenido de Vector Biolabs. Para el marcaje de los fragmentos de endometrio, éstos fueron incubados con Ad-mcherry ( $1 \times 10^8$  PFU/ml) diluido en medio DMEM F-12 libre de antibiótico (Life Technologies) y medio FBS 10% (FBS gold; PAA), incubándolo durante 12-18 horas a una temperatura de 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con agitación suave. Posteriormente se realizó un doble enjuagado con DMEM F-12 de los



fragmentos endometriales, para ser finalmente sumergidos en medio fresco DMEM F-12 con antibióticos (estreptomina y penicilina), y antifúngicos (fungicina, 1mg/ml) (Gibco), y medio FBS 10%, a una temperatura de 37°C hasta su implantación.

Tras la incubación se chequeó el marcaje fluorescente mediante el uso de un microscopio invertido (Eclipse; Nikon) y las placas fueron clasificadas según la intensidad y distribución de la fluorescencia emitida por los fragmentos contenidos en las mismas, clasificándose en 5 grupos: A (óptima), B (buena), C (intermedia), D (pobre) y E (sin señal). Se seleccionaron un total de 29 placas clase A, 18 clase B y 8 de clase C para su posterior implantación, desechándose un total de 15 placas por emisión pobre o nula de fluorescencia.

#### **4.3.2 Implantación de los fragmentos de endometrio marcados en los ratones receptores**

Tras el marcaje de los fragmentos endometriales humanos con Ad-mCherry se procedió a la implantación de estos en el peritoneo de los ratones nude ooforectomizados. Los animales fueron anestesiados mediante isoflurano inhalado; el acceso al peritoneo fue a través de una pequeña incisión centro abdominal. Se crearon dos zonas de implantación en cada ratón (una centrada en el lado izquierdo, y otra a la derecha, en localización superior o caudal a la contralateral); en cada zona de implantación se colocaron todos los fragmentos de tejido endometrial contenidos en una placa (entre 2-3), y se fijaron con adhesivo tisular (n-butyl-ester-cyanoacrylato – 3M Animal Care).

## 4.4 INTERVENCIONES FARMACOLÓGICAS

### 4.4.1 Preparación y administración de los compuestos a estudio

Los animales se dividieron en 3 grupos de 8 individuos cada uno, con el fin de ensayar los tres compuestos a estudio (agonista dopaminérgico, fármaco anti-VEGF y placebo).

La inclusión de estos en los diferentes grupos se realizó mediante asignación aleatoria.

En la siguiente tabla se incluyen los compuestos a estudio:

Producto	Fabricante	Información
<b>Inhibidor VEGF (CBO-PO11)</b>	SIGMA	0.5 mg/kg, diaria, intraperitoneal
<b>Cabergolina</b>	PFIZER	50µg/kg cada 3 días, oral
<b>Suero salino</b>	Grifols	NaCl 0.9%
<b>Suero glucosalino</b>	Grifols	NaCL0.9%, glucosa 5%
<b>Etanol 100%</b>	SIGMA	Etanol 100%

**Tabla 1. Compuestos a estudio empleados**

La preparación de la dilución de los compuestos que finalmente se administran a los ratones se detalla a continuación:

El agonista dopaminérgico (cabergolina) se recibió en forma de comprimidos de 0.5mg de principio activo, que fueron prediluidos con 0.5ml de etanol, a los que se añadió posteriormente suero salino en proporción 1:6 (etanol: suero salino). Esta solución stock

se diluyó con suero glucosalino (5% glucosa) hasta obtener una concentración final de  $10\mu\text{g}/\text{cabergolina}/\text{ml}$  de solución. Se administró un total de 1.25ml de la citada solución ( $10\mu\text{g}$  cabergolina/ml) vía oral a cada ratón ( $50\mu\text{g}$  de Cabergolina/kg). El peso aproximado de cada ratón fue de unos 25g. Las diluciones de cabergolina se preparaban el mismo día de la administración.

El compuesto inhibidor del VEGF (CBO-PO11) se recibió en viales en forma de polvo seco. Tras ser reconstituido con agua, se obtuvo una solución stock con una concentración de  $1\text{mg}/\text{ml}$ . Para preparar la solución que finalmente se administró, se diluyeron  $40\mu\text{l}$  de la solución stock en  $760\mu\text{l}$  de agua, obteniendo finalmente un volumen total de  $800\mu\text{l}$ . Se administró una dosis diaria de  $100\mu\text{l}$  ( $0.5\text{mg}/\text{Kg}/\text{día}$ ) de la citada solución mediante inyección intraperitoneal.

#### **4.4.2 Monitorización de peso para detección de toxicidad y estimación de dosis total**

La administración de los compuestos a estudio se inició dos días tras el implante de los fragmentos de endometrio, y se continuó durante 21 días. Durante este periodo se realizó una monitorización diaria del peso de los animales con el fin de estimar la cantidad exacta de compuesto administrada, así como para detectar signos precoces de toxicidad producidos por los compuestos a estudio.

Las oscilaciones de peso que se objetivaron entraban en el rango de la normalidad, y fueron similares en los grupos de intervención y en el control. En efecto, se observó una ganancia de peso de unos 2-3g por animal al final del estudio, sin diferencias entre los diferentes grupos, sin evidenciarse signos externos de toxicidad.

## 4.5 MONITORIZACIÓN NO INVASIVA DEL TAMAÑO DE LA LESIÓN

### 4.5.1 Detección de la señal fluorescente

El tamaño de las lesiones endometriósicas fue estimado de forma indirecta durante el periodo de tratamiento en función de la extensión e intensidad de la fluorescencia emitida por los fragmentos de tejido marcados. Esta monitorización no invasiva fue realizada mediante el uso de IVIS Spectrum Preclinical In Vivo Imaging System (Perkin-Elmer) asociado a una cámara anestésica de isoflurano (XG-Gas Anesthesia System; Xenogen). La monitorización se inició 3 días tras la implantación del tejido endometriósico marcado, realizándose un total de 8 determinaciones (cada 2-3 días) a lo largo de 21 días. Dichas determinaciones se realizaron los días 4, 8, 11, 14, 16, 18, 21 y 23, tomando como día 1 el día de la implantación de los fragmentos de endometrio marcados.

Anticipándonos a posibles problemas que pudieran surgir, como la dificultad de detección de la señal fluorescente del tejido marcado por emisión excesiva de señal de fondo, se decidió monitorizar la emisión de fluorescencia en cada animal con 5 pares de filtros de emisión/absorción (540-595, 540-620, 605-620, 605-640, 605-660 nm). Una vez escogidas las longitudes de onda de emisión/excitación de los filtros, se realizaron todas las mediciones en las mismas condiciones. El campo de visión se estableció a 10cm, el mínimo número de contajes se fijó en 6000 y el tiempo de exposición se estableció en función del tiempo necesario para realizar el número mínimo de contajes, oscilando entre 0.25 y 2 segundos, de acuerdo con lo descrito en estudios previos (Fortin et al, 2006).



Todas las lesiones endometriósicas emitieron suficiente señal fluorescente durante todo el tiempo de estudio como para que ésta fuera adecuadamente detectada y cuantificada.

Durante el proceso de monitorización se detectó una débil señal fluorescente distribuida de forma homogénea por todo el cuerpo del animal. Dicha señal de fondo corresponde a aquella emitida por las propias estructuras biológicas del ratón, así como de diferentes compuestos químicos contenidos en los alimentos, como clorofilas o flavonoides.

Se detectaron, asimismo, otros focos emisores de señal fluorescente, más localizados, pero de igual o mayor intensidad que la señal emitida por los propios implantes endometriósicos, más intensas durante los primeros días de monitorización no invasiva. Estas señales correspondían a las cicatrices de las incisiones realizadas en la región centro abdominal para realizar los xenotransplantes.

Con el objeto de poder cuantificar cuanta de todas las señales emitidas correspondía realmente a los implantes, se intentó realizar un perfil espectral para cada una de estas fuentes emisoras. Mediante la combinación de los perfiles de fluorescencia emitidos por los 5 pares de filtros de emisión/excitación empleados se establecieron tres perfiles espectrales para identificar la señal procedente de cada fuente emisora, a saber: procesos cicatriciales (UMX1), implantes endometriósicos (UMX2), y radiación de fondo (UMX3).

Una vez establecidos los perfiles, se usaron como macros para identificar la señal de interés, mediante el software Living Image 6.3, detectando y cuantificando la señal procedente de los implantes endometriósicos.



#### 4.5.2 Cuantificación de la señal fluorescente

Una vez obtenidas las imágenes de interés, éstas fueron superpuestas sobre una imagen anatómica en escala de grises.

El software adquiere la imagen cuando los 6000 contajes han sido alcanzados, independientemente del tiempo de exposición necesario para detectarlos. Para intentar detectar diferencias durante el periodo de tratamiento, la intensidad de señal fue normalizada en cada animal en el curso del tiempo, estableciendo para cada uno de ellos un periodo fijo de exposición, que osciló entre 0.5 y 1 segundo.

Las regiones de interés correspondientes a las lesiones fueron establecidas automáticamente por el software, tras ser previamente establecido de forma manual un umbral alrededor de cada lesión.

Con el fin de evitar el sesgo operador dependiente, el análisis fue realizado por 5 técnicos diferentes. A cada uno de ellos le fueron asignados de forma aleatoria dos animales de cada uno de los 3 grupos, de forma que cada uno de los técnicos analizaba un total de 6 animales. Posteriormente, a 3 de los 5 técnicos se les asignó la representación de los datos de los animales de cada uno de los grupos.

La variación de la intensidad de señal emitida a lo largo del tiempo se expresó como el % de variación de esta comparado con la intensidad máxima observada para esa lesión. Se representó el promedio de reducción de fluorescencia de cada área de interés (de cada implante endometriósico), así como de las áreas de interés de cada animal de forma conjunta.



## 4.6 SACRIFICIO Y RECUPERACIÓN DE LAS LESIONES

Tras 21 días de monitorización, los animales fueron anestesiados introduciéndolos en una cámara de CO<sub>2</sub>, siendo posteriormente sacrificados por dislocación cervical.

Se accedió a la cavidad peritoneal mediante una incisión transversal en la parte baja del abdomen. A simple vista las lesiones estaban bien integradas en el peritoneo, presentando formas irregulares y diferentes grados de penetración en el mismo. En esta situación era difícil establecer macroscópicamente el límite entre el implante endometriósico humano y el tejido murino. Tal y como ya anticipábamos, medir estas lesiones blandas e irregulares con precisión mediante callipers nos pareció complejo y sujeto a una gran variabilidad intra e inter observador. Teniendo en cuenta el rango milimétrico en el que nos movíamos (error de la medida) determinar el tamaño de lesiones de tamaño milimétrico con estos aparatos nos pareció poco adecuado y no reproducible. Esto nos hizo reafirmarnos en que nuestra decisión de prescindir de esta metodología para determinar el tamaño de lesiones fue adecuada.

De cada uno de los animales se recuperaron los dos implantes, obteniéndose un total de 48 implantes endometriósicos, que fueron procesados de la siguiente forma:

- Uno de los fragmentos obtenidos se fijó en formol al 4% durante unas 10-12horas, a 8°C de temperatura, para ser posteriormente embebido en parafina, para realizar el análisis histológico e inmunohistoquímico.
- El fragmento de mayor tamaño se dividió en dos, una parte se conservó en OCT congelado a -80°C, para realizar posteriormente el análisis de inmunofluorescencia.



- El tercer fragmento (la mitad restante) se crioconservó en Trizol y nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis mediante técnicas de QF-PCR, para la detección de genes implicados en la angiogénesis, como VEGF, Angiopoyetina, VEGFR2,  $\beta$ - actina y 18S.



## 4.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los implantes sumergidos en PFA 4% (paraformaldehído) se pasaron a una solución de etanol 70% 24h después de su recogida. Una vez fijados, se incluyeron en parafina (Panreac), previa deshidratación mediante sucesivos pases por concentraciones crecientes de etanol y xilol (Merck). Posteriormente, empleando un microtomo de rotación HM-340E (Microm), se realizaron cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  que se adhirieron a portaobjetos *SUPERFROST® PLUS* (Thermo Scientific).

Entre cuatro y cinco secciones no contiguas de las lesiones endometriales de cada uno de los animales fue examinada al microscopio óptico tras su tinción con hematoxilina-eosina (Sigma Co.), confirmándose la presencia de glándulas y estroma típicos 21 días tras la implantación de los fragmentos.



## 4.8 ANÁLISIS DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

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).

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). 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.

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.

En esta tesis doctoral se han empleado anticuerpos primarios específicos para determinar la proliferación celular, detectando la expresión de Ki67; la apoptosis, mediante la determinación de los extremos TdT-OH'; así como la regulación de la expresión del receptor de VEGF, detectando la expresión de VEGFR2.

La determinación de Ki67 y VEGFR2 se realizó mediante técnicas estándar de inmunohistoquímica, que se detallan a continuación, mientras que el análisis de la apoptosis se realizó mediante el kit APoptag, reconociendo los extremos rotos 3-OH' de las cadenas de ADN.

En caso de emplear un anticuerpo primario o secundario conjugado a un fluorocromo en lugar de a un enzima como la HRP, la misma técnica previamente descrita pasa a denominarse inmunofluorescencia, y la detección del antígeno requiere del empleo de microscopios de fluorescencia. Dicha técnica suele aplicarse a secciones de tejido congelado, como se realizó en este caso, aunque también es posible aplicarla a secciones de tejido embebidas en parafina tras eliminar adecuadamente la parafina existente.

En nuestro caso se usó la inmunofluorescencia para la detección de vascularización, así como del porcentaje de vasos maduros e inmaduros mediante Ac primarios capaces de reconocer epítomos comunes a las dos especies implicadas (humana y murina). Se realizó un doble marcaje de las muestras: el aporte vascular a los implantes endometriósicos se determinó usando un Ac murino policlonal contra CD-31 (ab28364, 1:200, Abcam, Cambridge, MA, USA), mientras que para detectar específicamente los

vasos maduros, se usó un Ac monoclonal murino anti  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), (Sigma S-501, 1:50).

El proceso de preparación de las muestras para su análisis inmunohistoquímico (previamente incluidas en parafina) para su posterior análisis es común, e incluye los siguientes pasos:

- Corte de las muestras en secciones de 4 $\mu$ m de grosor, mediante un microtomo de rotación.
- Desparafinamiento de las mismas mediante incubación a 60°C durante una hora, seguido de cinco minutos de lavado en solución de xilol/etanol
- Proceso de rehidratación mediante lavados de cinco minutos en concentraciones decrecientes de etanol (100, 95, 90, 80, 70%) con inmersión final en agua.

El proceso de preparación de las muestras para su análisis mediante inmunofluorescencia, a partir de muestras de tejido criopreservadas, se detalla en el apartado de ‘Detección de vascularización’.

#### **4.8.1 Detección de Ki67**

Las células en proliferación fueron detectadas mediante la detección del marcador de proliferación celular Ki67, mediante el anticuerpo Dako, Clon MIB (Dako, M7240), en dilución 1:100, seguido del empleo de “EnVision™ FLEX” (Dako, K8000) para el revelado.

Para desenmascarar el antígeno ki67, las placas se sumergieron en solución tampón de citrato, pH6, durante 2 minutos a 120°C en autoclave. Se dejaron enfriar en agua



destilada y se lavaron con “Wash Buffer” (Dako) (1x TBST). Se añadió la solución bloqueante de peroxidasa para bloquear las peroxidasas endógenas; posteriormente se bloqueó la biotina endógena mediante “Avidin/Biotin Blockin kit” (Vector laboratoires, SP-2001), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó la dilución del Ac primario anti-ki67 mediante dilución 1:100 y se añadió a las muestras, dejándolas en incubación en una cámara húmeda a 4°C. A la mañana siguiente, previo lavado, fueron incubadas con la solución Dako HRP (anticuerpo secundario unido a HRP –peroxidasa de rábano-) durante 20 minutos. Posteriormente se reveló la señal mediante la adición de solución DAB de revelado (Dako). La reacción se paró a los tres minutos mediante la inmersión de las muestras en agua destilada. Se tiñeron de nuevo con hematoxilina durante 30 segundos, siendo nuevamente lavadas con agua destilada y deshidratadas con etanol y xileno. Finalmente fueron montadas en el medio “Entellan” (Millipore, 107960) y dejadas secar durante 30 minutos previo a su observación en el microscopio.

#### **4.8.2 Detección de VEGFR2**

La expresión de VEGFR2 se detectó mediante el uso del Ac primario Flk-1 (Ac monoclonal murino A-3) (Santa Cruz, sc-6251) diluido 1:100, seguido del uso del kit “EnVision™ FLEX” (Dako, K8000) para el revelado de la tinción. El protocolo empleado para su detección fue exactamente el mismo que se ha descrito previamente para la detección de ki67 con la única excepción que la reacción DAB se paró a los 40 segundos de incubación.



### 4.8.3 Detección de 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 “burbujeo”, 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. 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.

Una técnica ampliamente utilizada para identificar células en apoptosis es el TUNEL (del inglés ‘terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling’), un método para detectar fragmentación del ADN marcando el fragmento terminal de los ácidos nucleicos. 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.

La técnica consiste en la incubación de las muestras con 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. La detección del marcaje se realiza mediante un microscopio de fluorescencia.

En esta tesis doctoral, el análisis de la apoptosis se realizó empleando el kit Apoptosis Detection (Millipore, 171-141), kit de detección de fragmentos de ADN libres basado en la técnica TUNEL, previamente descrita. Se detalla a continuación el procedimiento empleado.

Las muestras se dejaron incubar, previo lavado durante 30 minutos a 37°C en PBS (Phosphate Buffered Saline), con proteinasa K diluida 1:25 en una cámara húmeda a 37°C durante 20 minutos. Se paró la reacción y se lavaron de nuevo con PBS. Se añadió solución tampón TdT durante 10 minutos, siendo posteriormente incubadas con el reactivo TdT marcado durante 60 minutos a 37°C. La reacción finalizó al retirar el reactivo e incubar las muestras con “TB Buffer 1x” durante 5 minutos. Tras varios lavados las muestras fueron incubadas con “Blocking Buffer” durante 20 minutos. A partir de este momento todas las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad. Tras retirar la solución anterior, se añadió “Streptavidin, alexa Fluor® 594 conjugate” (Invitrogen, S11227) diluido 1:50, y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Finalmente, las muestras se lavaron dos veces con PBS durante 15 minutos y fueron montadas en la plataforma “ProLong Gold antifade” (Life Technologies, P36931) con el reactivo DAPI (tiñe de azul los núcleos de las células). Tras cubrir las muestras con un cubreobjetos y ser selladas con esmalte transparente se dejaron en una cámara húmeda durante 15 minutos antes de ser reveladas mediante el microscopio de fluorescencia.

#### 4.8.4 Detección de vascularización

Para la detección de vascularización total, así como de la madurez vascular se usó la inmunofluorescencia. Se usaron Ac primarios capaces de reconocer epítomos comunes a las dos especies implicadas (humana y murina). En este sentido se realizó un doble marcaje de las muestras. Por un lado, el aporte vascular a los implantes endometriósicos se determinó usando un Ac murino policlonal contra CD-31 (ab28364, 1:200, Abcam, Cambridge, MA, USA), con unión a las células endoteliales tanto de la micro como macro-vascularización. Por otro lado, para detectar específicamente los vasos maduros, se usó un Ac monoclonal murino anti  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), (Sigma S-501, 1:50). A continuación, se detalla el protocolo empleado.

- Se obtuvieron 8 micro secciones de las muestras que se encontraban criopreservadas en OCT a  $-80^{\circ}\text{C}$  mediante criotomo. Dichas secciones se fijaron con acetona, previo atemperamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Tras varios lavados con PBS frío, se procedió al bloqueo de la biotina endógena con el kit comercial “Avidin/biotin Blocking kit” (Vector Laboratoires, SP 2001), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Tras nuevo lavado con PBS se realizó el bloqueo no específico, incubando las secciones de tejido en una solución bloqueante (PBS, suero murino (2%) y BSA (5%)) durante una hora.
- Se realizó la incubación con el Ac primario CD-31 diluido 1:200 en solución diluyente (2% suero murino y 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA)) en una cámara húmeda a  $4^{\circ}\text{C}$ . A la mañana siguiente se procedió a realizar la incubación de las muestras, previo lavado con PBS, con el Ac secundario, “Biotinylated Rabbit Anti-Rat IgG Antibody” (Vector Laboratoires, BA-400) en



una dilución 1:500, durante 30 minutos. A partir de este momento, el resto de los procedimientos se llevaron a cabo en oscuridad. Para el revelado de las muestras se procedió a incubarlas de nuevo en cámara húmeda, durante 20 minutos, con “Streptavidin, Alexa Fluor® 488 Conjugate” (Invitrogen, S-32354) en dilución 1:1500.

- Tras varios lavados de las muestras se procedió a realizar una nueva incubación de las mismas con Ac  $\alpha$ -SMA diluido 1:200 en PBS, con 1% BSA, durante 30 minutos, en cámara húmeda. Tras realizar los lavados finales, las muestras fueron montadas en la plataforma “ProLong Gold antifade” (Life Technologies, P36931) con el reactivo DAPI. Tras cubrir las muestras con un cubreobjetos y ser selladas con esmalte transparente se dejaron en una cámara húmeda durante 15 minutos antes de ser reveladas mediante el microscopio de fluorescencia.

## **4.9 CUANTIFICACIÓN DE LAS IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA**

### **4.9.1 Adquisición de la imagen**

Tras finalizar los procesos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, las muestras se llevaron para su revelado y cuantificación a la sección de microscopía confocal de la Universidad de Valencia.

Se escogieron dos muestras de cada implante endometriósico, y se consideraron representativas del resto del implante. De cada una de estas muestras escogidas se seleccionaron aleatoriamente 3 campos de alta potencia mediante el uso del software de captura de imagen “LAS V4” (LeicaMicrosystem), sistema asociado al microscopio Nikon Eclipse E400. Se obtuvieron, por tanto, un total de 4 imágenes por animal con el fin de determinar en ellas los parámetros de interés. Para la obtención de dichas imágenes se establecieron al inicio todos los parámetros (iluminación, tiempo de exposición, zoom, brillo, contraste, etc) y se mantuvieron constantes durante todo el proceso. El análisis de los parámetros de interés de las imágenes obtenidas tanto por inmunohistoquímica como por inmunofluorescencia fue realizado mediante el software “Image Pro Plus 6.3 software analysis”.

### **4.9.2 Determinación total y específica de las áreas de interés en las imágenes de inmunofluorescencia para la cuantificación de la vascularización, madurez vascular y apoptosis**

Por lo que respecta al proceso de análisis y cuantificación de las imágenes, éste se realizó mediante el software Image Pro Plus 6.3 (MediaCybernetics, CA). Inicialmente

se establecieron unos valores estándar (usadas como macros) para determinar/cuantificar la intensidad de señal para cada uno de los colores, RGB (siglas en inglés de red, green, blue) de cada una de las áreas teñidas específicas de interés (SSAI, siglas en inglés de 'specific stained area of interest').

Para obtener el área teñida total de interés (TSAI, siglas en inglés de 'total specific area of interest'), con la finalidad de expresar los resultados en función del área total, se realizó una estimación de la misma tomando como referencia el área teñida correspondiente a DAPI (señal azul correspondiente a los núcleos) de una zona determinada y multiplicándolo por un coeficiente para hacerlo extensivo al resto de la muestra.

Una vez cuantificada la intensidad de señal en cada una de las SSAI de las muestras de cada animal, así como calculada la TSAI, se procedió a calcular los parámetros de interés como se detalla a continuación.

La vascularización se expresó, en cada animal, como la proporción media de zonas vascularizadas, calculado dividiendo el área de vascularización de cada zona específica de interés entre el área total de interés, mediante la siguiente fórmula: (SSAI reconocido por CD31/TSAI) x100.

La madurez vascular se expresó, en cada animal, como la proporción media de áreas conteniendo vasos maduros e inmaduros en las muestras obtenidas. La proporción de zonas con vasos maduros se calculó con la siguiente fórmula: [(SSAI reconocido por CD31/TSAI) / (SSAI reconocido por  $\alpha$ -SMA/TSAI)] x100. La proporción de zonas con vasos inmaduros se calculó con la siguiente fórmula: 100-( [(SSAI reconocido por CD31/TSAI) / (SSAI reconocido por  $\alpha$ -SMA/TSAI)] x100).

La apoptosis en cada animal se expresó como la proporción de zonas apoptóticas con respecto al área total de interés, calculado usando la fórmula (SSAI reconocido por DNAsa/TSAI) x100.

#### **4.9.3 Determinación total y específica de las áreas de interés en las imágenes de inmunohistoquímica para la cuantificación de la proliferación**

Por lo que respecta al proceso de análisis y cuantificación de las imágenes, éste se realizó, como en el apartado anterior, mediante el software Image Pro Plus. Inicialmente se establecieron unos valores estándar (usadas como macros) para determinar/cuantificar la intensidad de señal para cada uno de los colores, RGB (siglas en inglés de red, green, blue) de cada una de las áreas teñidas específicas de interés (SSAI, siglas en inglés de 'specific stained area of interest').

Para obtener el área teñida total de interés (TSAI, siglas en inglés de 'total specific area of interest'), con la finalidad de expresar los resultados en función del área total, se realizó un sumatorio de la superficie de todas las imágenes analizadas al que se les restó la superficie correspondiente a áreas sin tejido (no teñidas).

Una vez cuantificada la intensidad de señal en cada una de las SSAI de las muestras de cada animal, así como calculada la TSAI, se procedió a calcular el índice de proliferación en cada animal. La proliferación se expresó como el porcentaje promedio de expresión de Ki67, calculado mediante la siguiente fórmula: (SSAI reconocido por ki67/TSAI) x100.

#### **4.9.4 Determinación de la intensidad relativa de tinción de las imágenes de inmunohistoquímica para la cuantificación de VEGFR2**

El incremento en la intensidad de tinción del parámetro de interés en cada imagen se estimó en función del SSAI de cada campo de visión multiplicado por la intensidad de tinción. El SSAI se determinó como se detalla en el apartado anterior, mientras que para estimar la intensidad de tinción se empleó el parámetro “actual” IOD (densidad óptica integrada, por sus siglas en inglés). En el software empleado para el análisis de las imágenes (Pro Plus Software), el parámetro IOD es un índice indirecto de los niveles de brillo, por lo que lo que estima en realidad es el inverso de la densidad óptica de tinción, por lo que se decidió tomar el inverso de dicho valor (parámetro IOD proporcionado por el software) como estimador de la intensidad de tinción de las muestras.

La expresión de VEGFR2 en cada animal se expresó como promedio de la intensidad relativa de tinción de VEGFR2 en muestras representativas de cada animal, y calculado usando la siguiente fórmula: (SSAI marcado por VEGFR2 x “actual IOD” VEGFR2).

## 4.10 QF-RT-PCR

### 4.10.1 Amplificación de VEGF, angiopoyetina 1, VEGFR2, $\beta$ -actina y 18S mRNA transcrita

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica relativamente simple y ampliamente utilizada en el campo de la biología molecular para amplificar y detectar secuencias de DNA y RNA. La PCR es altamente sensible y requiere una plantilla mínima para la detección y amplificación de secuencias específicas.

La PCR de transcripción inversa o RT-PCR, permite el uso de RNA como molde. El RNA se transcribe de forma inversa en DNA complementario (cDNA) utilizando una transcriptasa inversa. La transcriptasa inversa también tiene una función RNAasa H, que degrada la porción de RNA del híbrido. La molécula de DNA de cadena sencilla restante sirve entonces como molde para la formación de cDNA, mediante la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA, de la transcriptasa inversa. A partir de aquí, se utiliza el procedimiento de PCR convencional para amplificar el cDNA.

PCR en tiempo real (en inglés 'real time PCR') es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza después de cada ciclo de amplificación y es por



esto que también se le denomina PCR en tiempo real (es decir, PCR inmediata, simultánea). En muchos casos el molde que se emplea para la PCR cuantitativa no es desde el principio ADN, sino que puede ser ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN); en este caso, la técnica es una RT-PCR cuantitativa o en tiempo real, o RT-QF-PCR.

En nuestro trabajo se llevó a cabo la ampliación de dos tipos de genes: genes constitutivos (18s o  $\beta$ -actina) y genes diana (VEGF, VEGFR, Ang 1). Los genes constitutivos (housekeeping) son los que se expresan como resultado de la interacción entre la ARN polimerasa y el promotor, sin necesidad de regulación adicional; a menudo se denominan genes de mantenimiento, ya que se trata de genes que se expresan a un nivel relativamente bajo en todas las células. Estos genes se caracterizan por tener niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo; se utilizan en experimentos de PCR a tiempo real como control negativo. A continuación, se detalla el protocolo seguido en nuestro estudio.

La extracción del RNA (ácido ribonucleico) se realizó mediante el kit 'Quiagen Tissue RNA extraction' siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la obtención del material se comprobó la integridad del mismo mediante un Bioanalizador. Haciendo uso de un kit estándar de transcriptasa reversa (RT), se obtuvo DNAc a partir de 1 $\mu$ g del RNA obtenido de cada muestra. Para la amplificación del DNAc obtenido se usaron primers (cebadores) para los genes diana VEGF, VEGFR y Ang 1; así como para los genes constitutivos  $\beta$ -actina y 18S, especialmente diseñados para reconocer simultáneamente regiones del DNA humano y murino. Para dicho proceso de amplificación se usó la técnica estándar previamente descrita.

#### 4.10.2 Cuantificación del ADNc

Para comparar los niveles de transcripción entre las muestras se usó el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Scmittgen, 2001). Dicho método se basa en una cuantificación relativa, comparando los Ct (umbrales de ciclo) del gen testado y del gen de referencia en cada muestra, y luego se comparan los  $\Delta Ct$  de las muestras experimentales con respecto a los calibradores.

En primer lugar, se calculó la diferencia entre los valores de Ct entre los genes constitutivos (18s o  $\beta$ -actina) y los genes diana (VEGF, VEGFR, Ang 1) en las muestras de cada animal, de los grupos tratados y no tratados:

$(\Delta Ct_{\text{gen constitutivo.gen diana}})$  grupo NO tratamiento,  $(\Delta Ct_{\text{gen constitutivo.gen diana}})$  grupo tratamiento anti VEGF,  
 $(\Delta Ct_{\text{gen constitutivo.gen diana}})$  grupo tratamiento AD.

A continuación, se calculó la media aritmética de las muestras representativas de cada uno de los grupos a estudio:

$\Delta Ct_{\text{grupo tratado}} - \Delta Ct_{\text{grupo NO tratado}} = (\Delta Ct_{\text{gen constitutivo.gen diana}})$  grupo tratado -  $(\Delta Ct_{\text{gen constitutivo.gen diana}})$   
grupo NO tratado.

Finalmente, para determinar la relación entre los niveles de expresión en las muestras de los animales tratados vs no tratados, se usó la siguiente fórmula:

$$Q_r = 2^{Ct(\text{grupo tratado} - \text{no tratado})}$$

Para cada uno de los genes diana de interés, se comparó el nivel de expresión entre las muestras del grupo tratado vs no tratado, obteniendo un valor  $Q_r$  para cada uno de ellos. Se consideró que había inducción en la expresión de un determinado gen cuando el  $Q_r$  fue  $>2$ .

## 4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS Statistics (Statistical Package for Social Sciences, IBM). Para la elección del test estadístico a emplear se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. En los casos de una variable numérica, una categórica y distribución normal se aplicó un t-test para muestras independientes. En caso de no cumplirse la distribución normal se aplicó un test no paramétrico (Kruskall-Wallis e U de Mann-Whitney). Este test se usó, por ejemplo, para comparar las diferencias en la emisión de señal fluorescente entre el grupo control y cada uno de los grupos de intervención. Se recurrió al análisis de varianzas y al test de Tukey cuando se realizaron comparaciones múltiples; dicho test se usó para valorar el efecto de los tratamientos administrados en vascularización, madurez vascular, apoptosis, proliferación y expresión de VEGFR. En todos los casos, se rechazó la hipótesis nula cuando p-valor fue  $<0,05$ .



## 5 RESULTADOS

---

### 5.1 DESCENSO DE LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA COMO ESTIMACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE TAMAÑO DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS

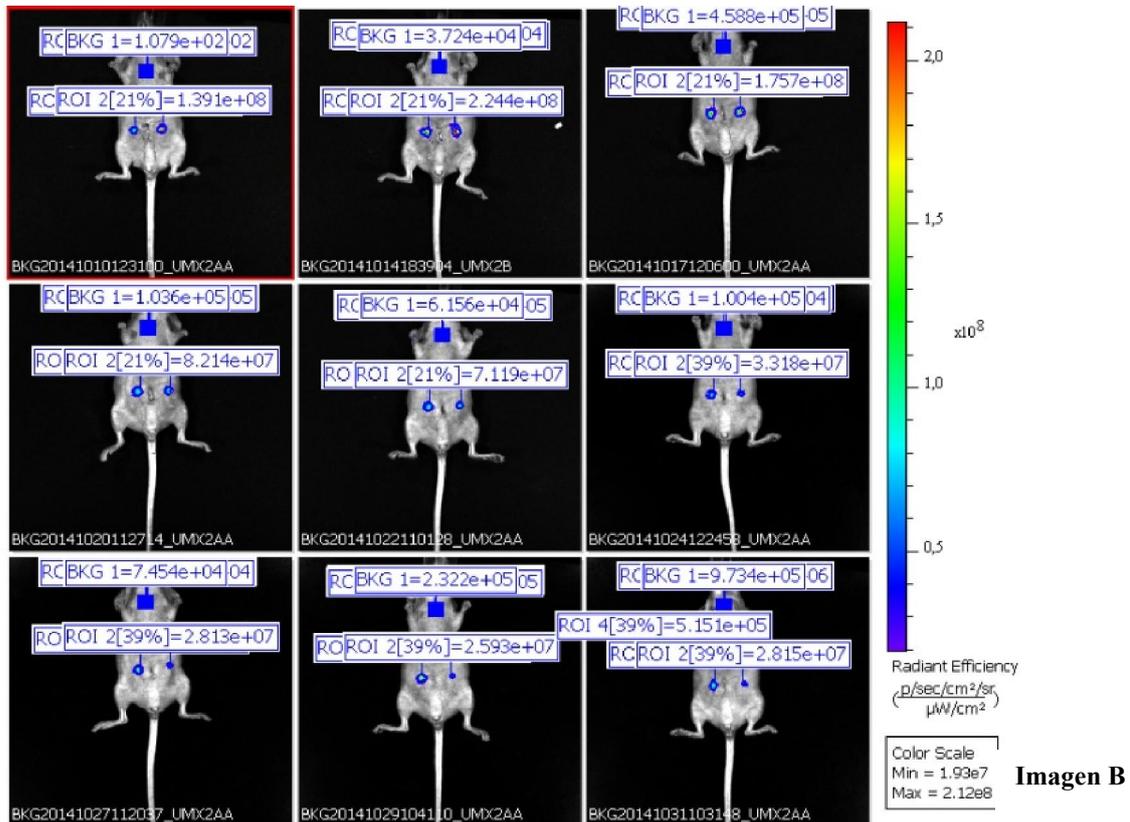
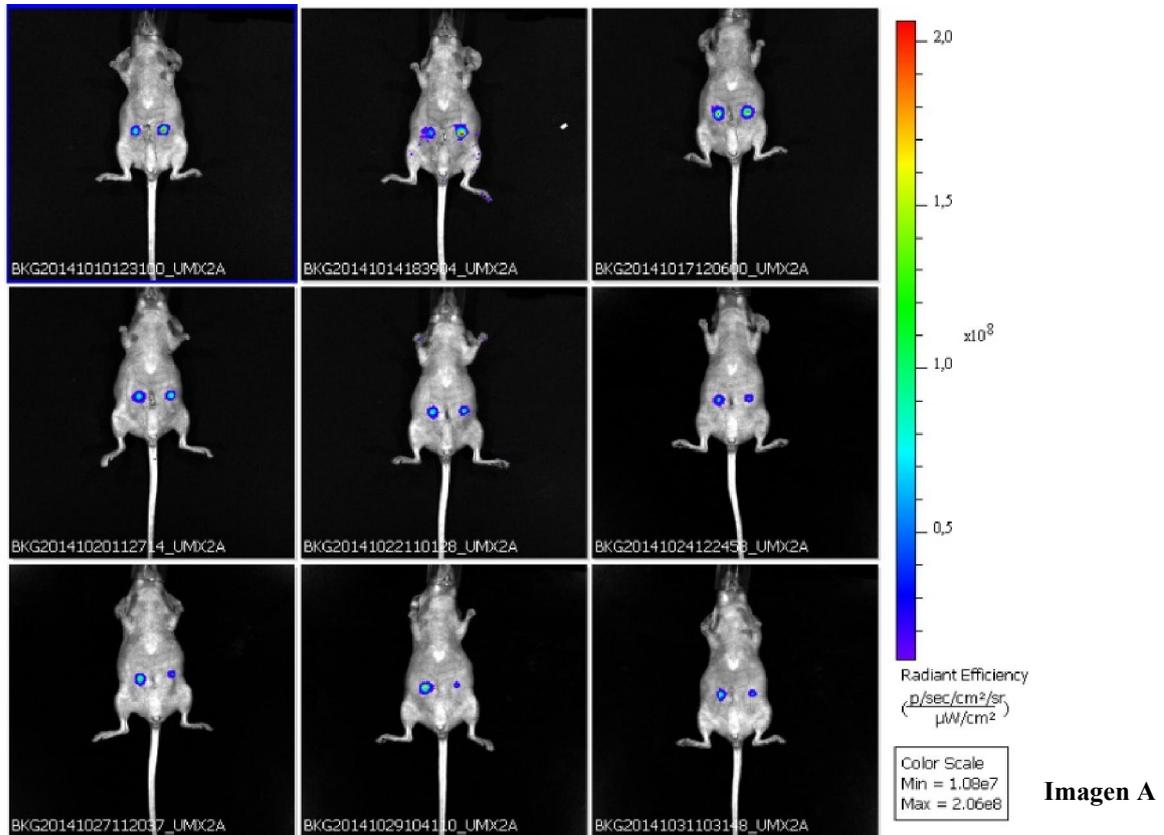
La monitorización de la fluorescencia in vivo se analizó, tanto de forma independiente para cada implante endometriósico, como para cada individuo de forma conjunta. En ambos tipos de análisis las gráficas mostraron una variación de la fluorescencia similar a lo largo del tiempo.

La cantidad de fluorescencia emitida por los fragmentos endometriales al inicio del experimento fue similar en todos los grupos. La intensidad global se incrementó en todos los grupos, alcanzando un máximo entre los 5 y 8 días de la implantación. Posteriormente se observó una reducción uniforme y progresiva de la señal fluorescente, hasta el final del experimento, en todos los grupos. Esta evolución decreciente de la intensidad de señal fluorescente con el paso del tiempo es acorde a lo descrito previamente en estudios similares (Fortin et al, 2004, Wang et al 2013), donde la intensidad de fluorescencia es máxima una semana tras la implantación con un declinaje posterior a partir de ese punto. Este comportamiento es acorde con la expresión episomal del adenovirus m-Cherry en el citoplasma celular. Este virus no implanta su material genético en el genoma de la célula endometrial, por lo que la expresión vírica muere cuando la célula se divide (Fortin et al, 2004).

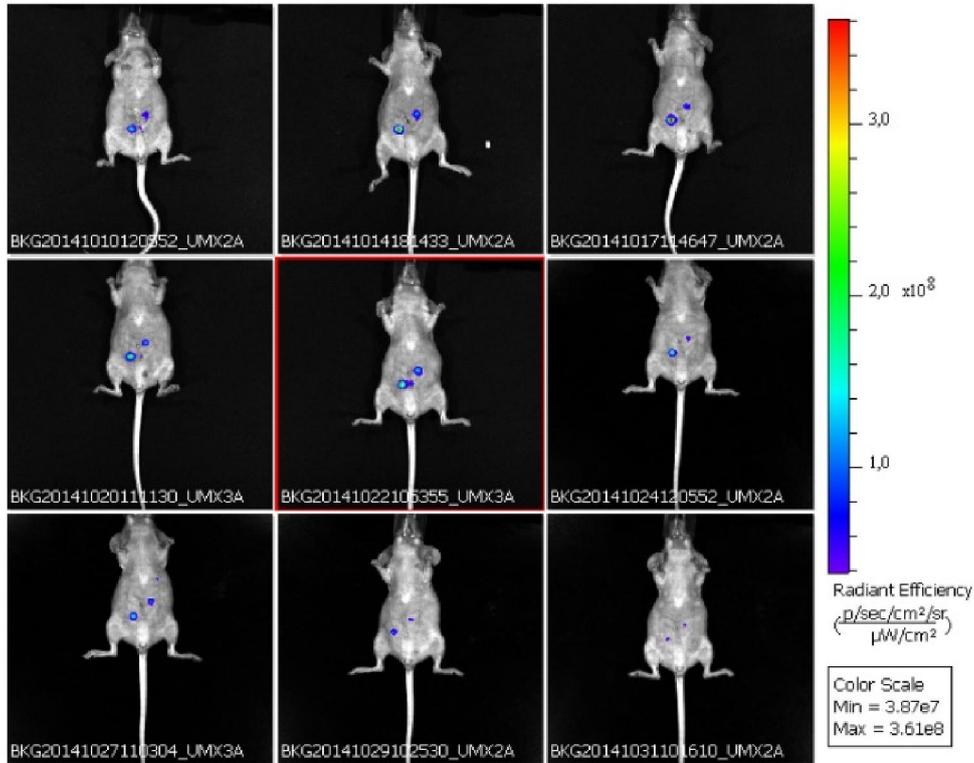


Se muestran a continuación una selección de las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas en cada uno de los grupos. La obtención de las imágenes y, por tanto, la cuantificación de la fluorescencia emitida se realizó en 8 ocasiones a lo largo del estudio, concretamente los días 4, 8, 11, 14, 16, 18, 21 y 23, tomando como día 1 el día de la implantación de los fragmentos de endometrio marcados. Las siguientes imágenes representan la emisión de fluorescencia evolutiva de un individuo de cada uno de los tres grupos a estudio.

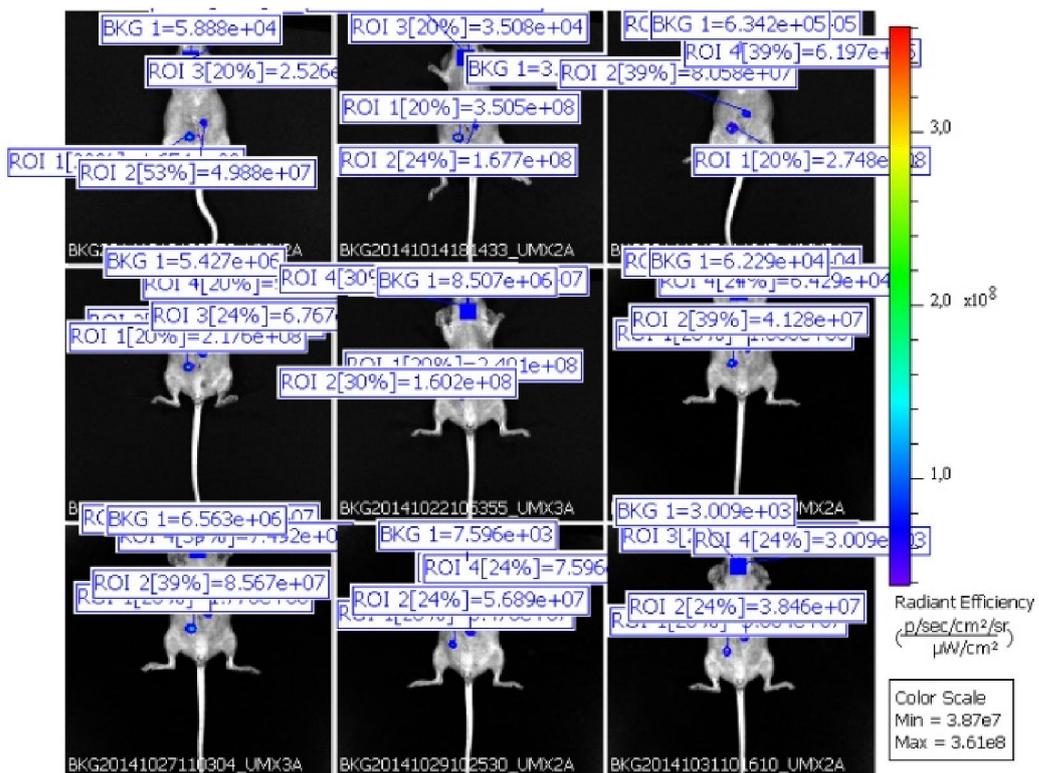
**Figura 5. Monitorización in vivo de la fluorescencia. Grupo control.** Imagen A: previo a la cuantificación de ROIs (área de interés). Imagen B: tras la cuantificación de ROIs.



**Figura 6. Monitorización in vivo de la fluorescencia. Grupo tratado con anti-VEGF.** Imagen A: previo a la cuantificación de ROIs. Imagen B: tras la cuantificación de ROIs.

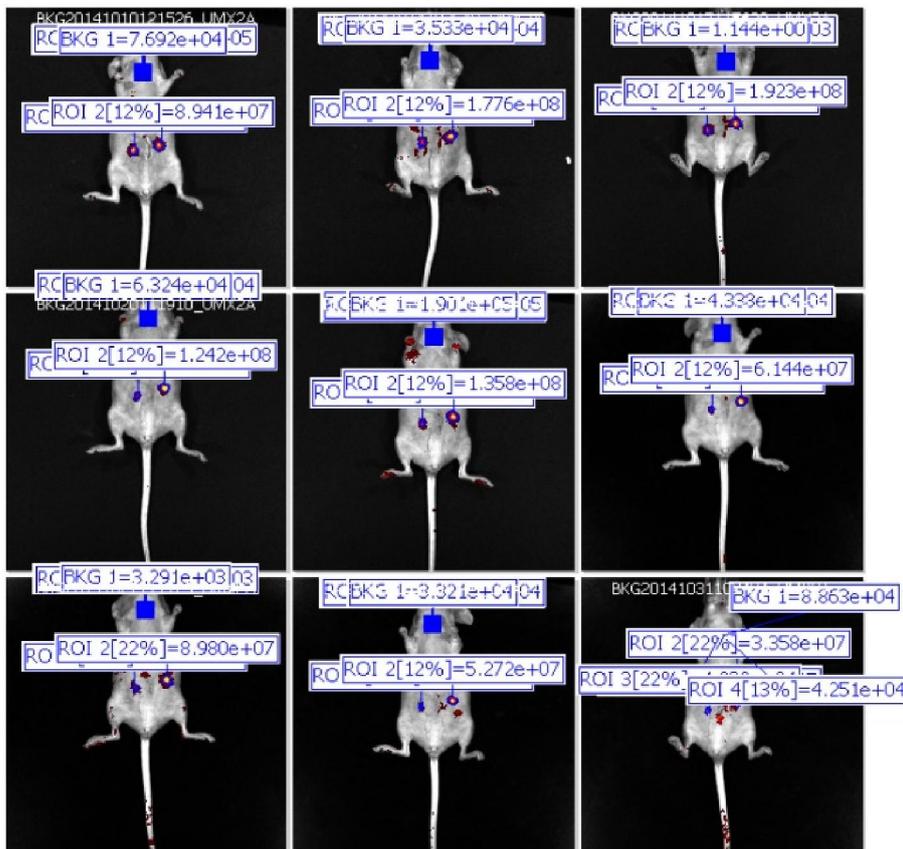
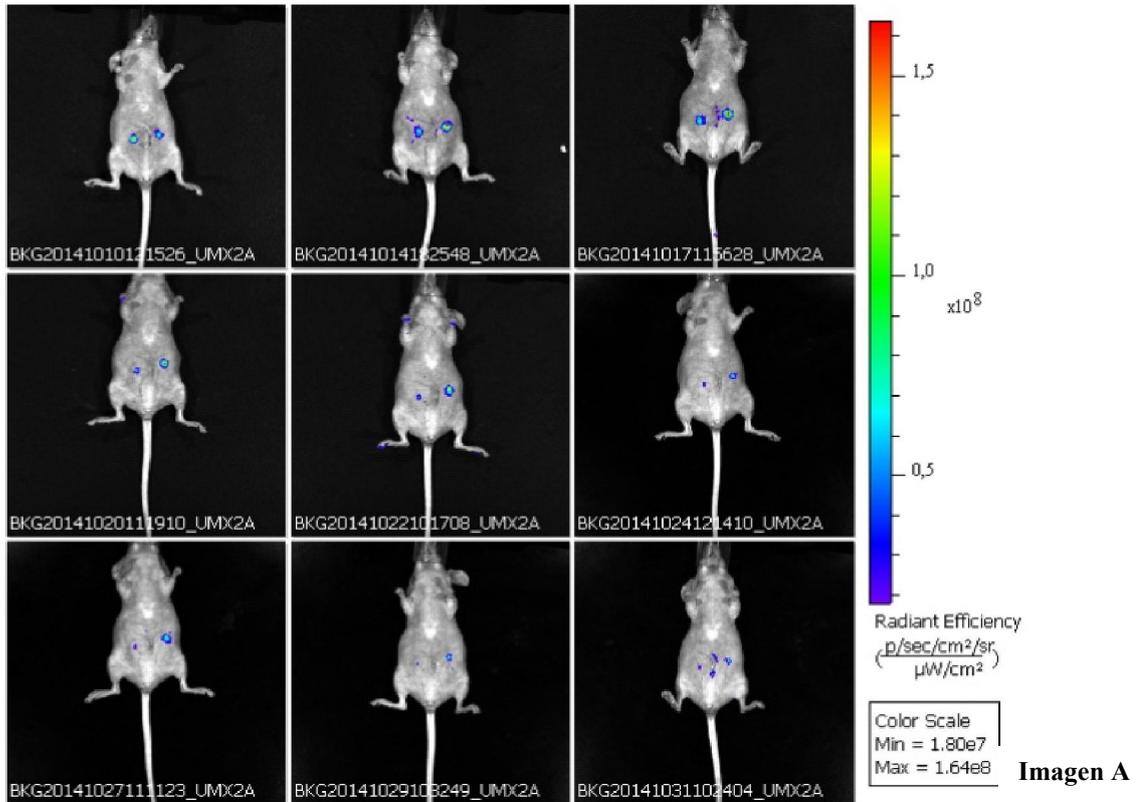


**Imagen A**



**Imagen B**

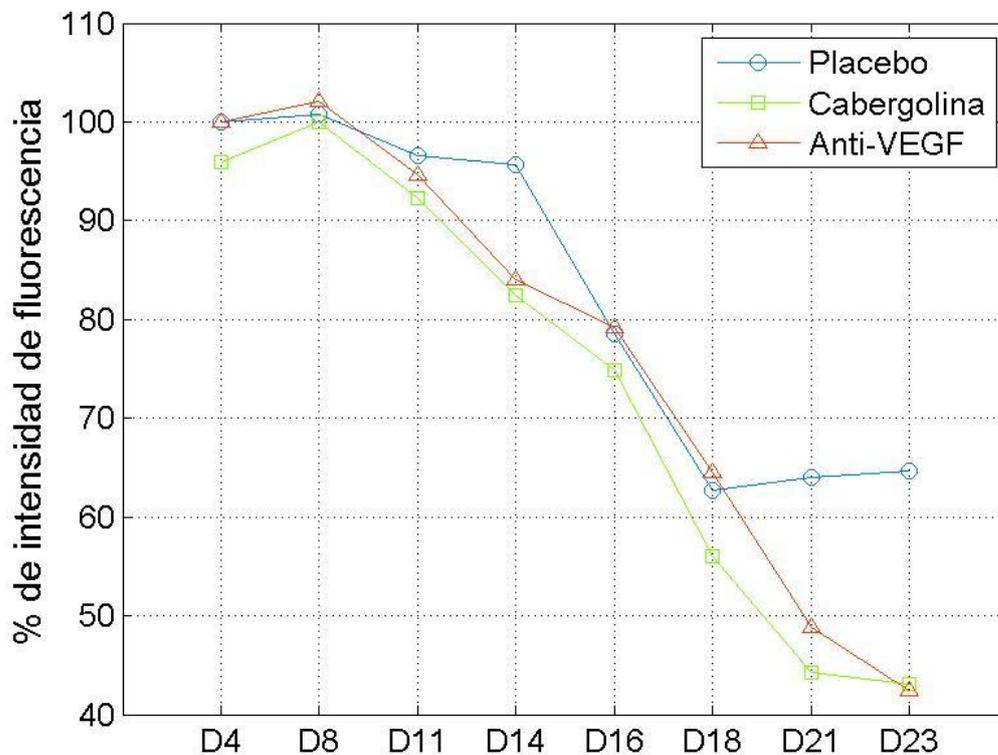
**Figura 7. Monitorización in vivo de la fluorescencia. Grupo tratado con Cabergolina.** Imagen A: previo a la cuantificación de ROIs. Imagen B: tras la cuantificación de ROIs.



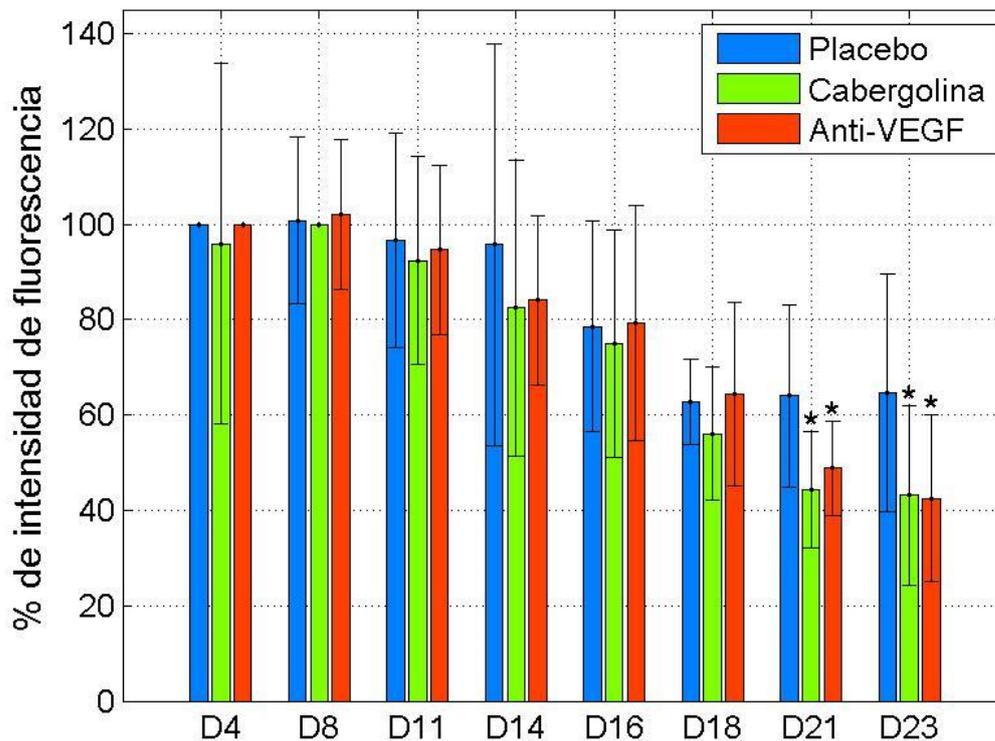
### 5.1.1 Variación de la intensidad media de fluorescencia por animal

La variación de la intensidad de señal en cada animal se expresó como el porcentaje promedio de reducción de la intensidad de fluorescencia respecto a la intensidad máxima (100%) observada para la misma lesión en cada animal.

Tal y como se puede observar en la gráfica, la pendiente decreciente en los grupos de tratamiento es más marcada, sin embargo, las diferencias no fueron significativas con respecto al grupo control hasta el final de la tercera semana de tratamiento.



**Figura 8.** Variación porcentual en la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo por animal. Gráfico lineal que muestra la variación porcentual en la intensidad de fluorescencia emitida por cada animal a lo largo del tiempo en los grupos placebo, agonista dopaminérgico (Cabergolina) y Anti-VEGF. En el eje de las X se muestra el tiempo en días (Dx) transcurrido tras la implantación del tejido.



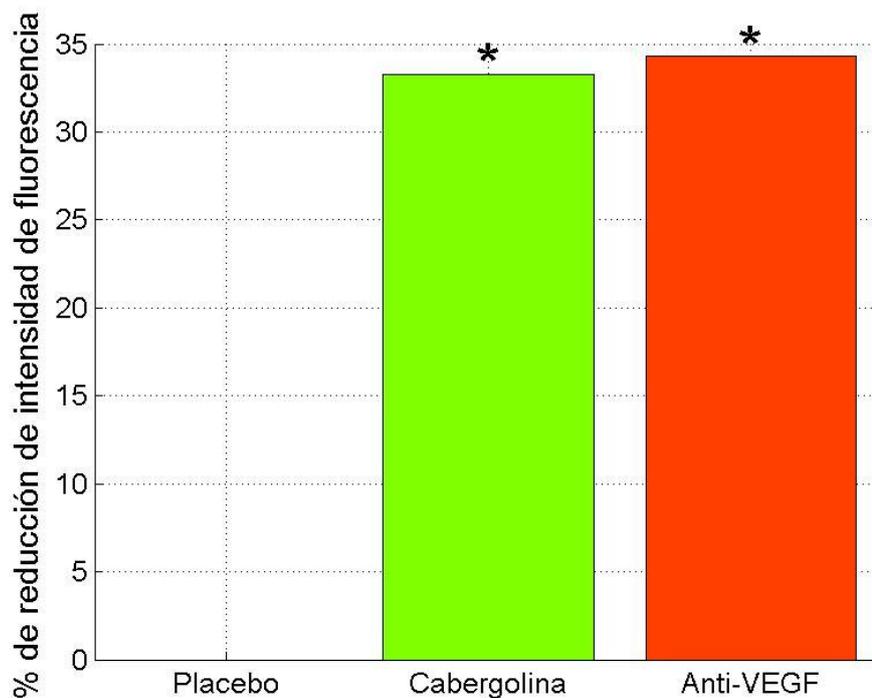
**Figura 9. Variación porcentual en la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo por animal.** Gráfico de barras que muestra la variación porcentual en la intensidad de fluorescencia emitida por cada animal a lo largo del tiempo en los grupos placebo, agonista dopaminérgico (Cabergolina) y Anti-VEGF. En el eje de las X se muestra el tiempo en días (Dx) transcurrido tras la implantación del tejido. (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).

La diferencia en la intensidad de fluorescencia entre el grupo control y los dos grupos de tratamiento sólo fue evidente los últimos dos días de tratamiento, es decir, los días 21 y 23 de monitorización. De hecho, sólo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los dos grupos de tratamiento dichos días.

Al finalizar el periodo de estudio, tras 21 días de tratamiento, se cuantificó un descenso de intensidad de fluorescencia de 35.36% en el grupo placebo, de 56.9% en el grupo

tratado con Cabergolina y de 57.5% en el grupo tratado con anti VEGF, comparado con el punto en el que la intensidad de señal fue máxima para cada uno de los grupos, durante los días 5-8.

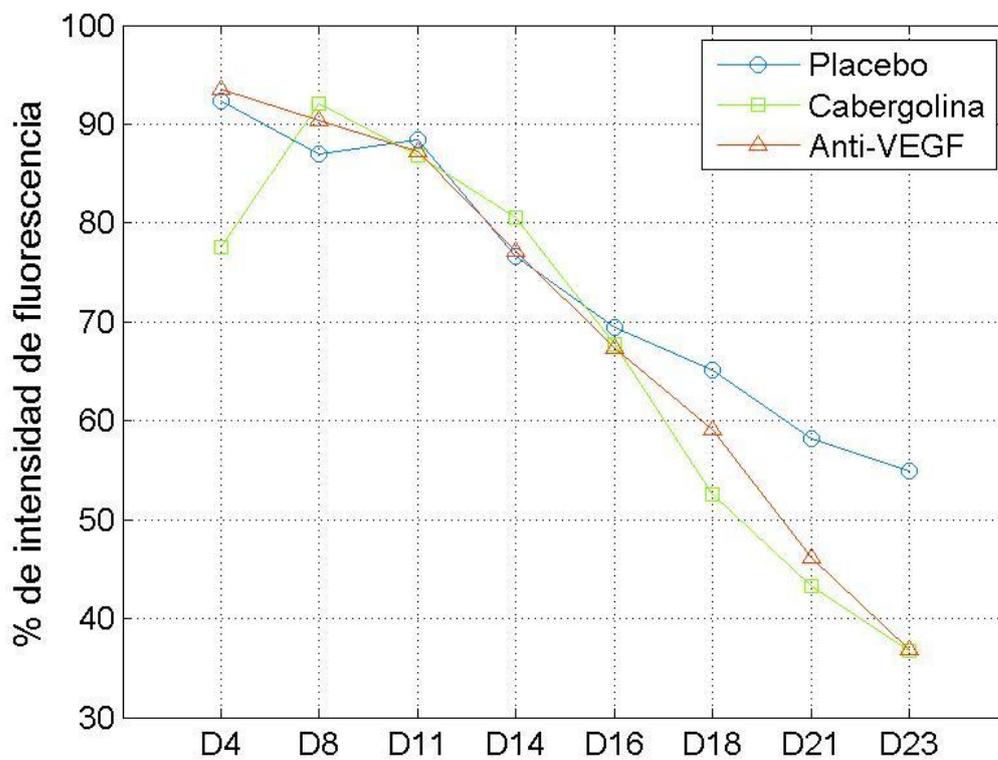
Tomando como referencia el grupo control (0%), se cuantificó una reducción en la intensidad de fluorescencia de 33.29% en el grupo tratado con Cabergolina y de 34.32% en el grupo tratado con anti VEGF. Dicha reducción en la intensidad de fluorescencia emitida sirve como estimador de la reducción del tamaño de la lesión endometrial, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.



**Figura 10. Reducción estimada de tamaño de la lesión endometrial.** Gráfico de barras que muestra el porcentaje estimado de reducción de tamaño de la lesión endometrial por pérdida de intensidad de fluorescencia (eje Y), según la fluorescencia emitida por animal, entre cada uno de los grupos de tratamiento con respecto al grupo control, que representa el 0% (eje X). (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).

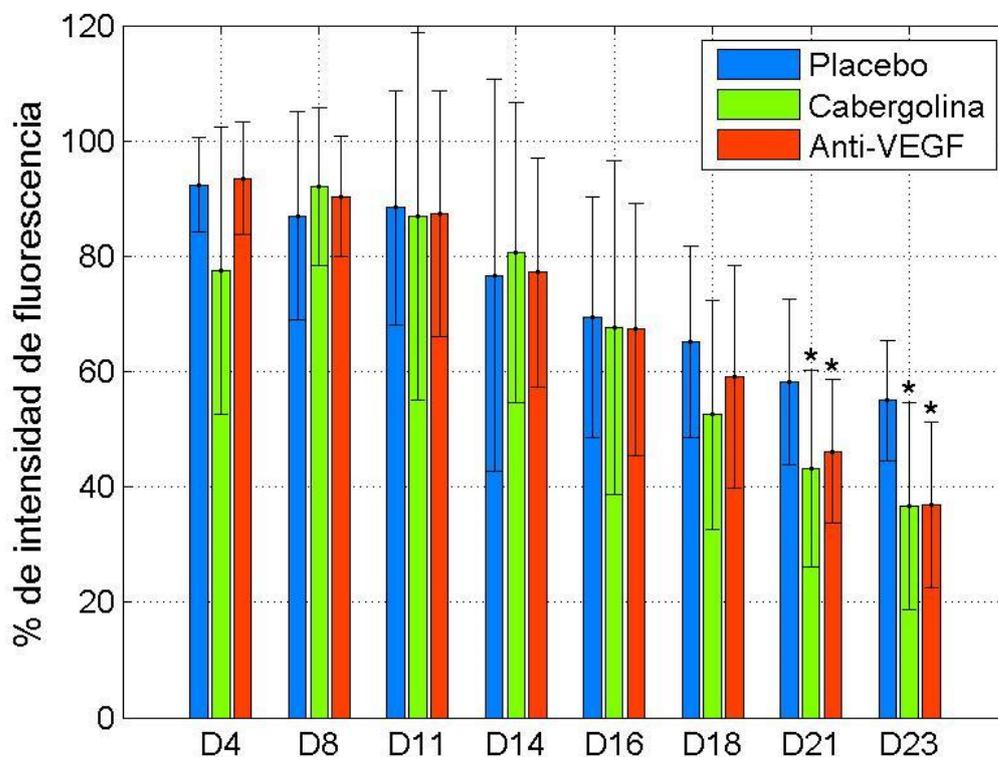
### 5.1.2 Variación de la intensidad media de fluorescencia por lesión

Tras cuantificar la intensidad de señal como el porcentaje de reducción de intensidad con respecto a la intensidad máxima emitida por cada animal (realizando un sumatorio de las intensidades de cada lesión) se representó el porcentaje de reducción de la intensidad de fluorescencia en cada grupo para cada una de las lesiones de forma independiente.



**Figura 11. Variación porcentual en la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo por lesión.** Gráfico lineal que muestra la variación porcentual en la intensidad de fluorescencia emitida por cada lesión endometrial a lo largo del tiempo en los grupos placebo, agonista dopaminérgico (Cabergolina) y Anti-VEGF. En el eje de las X se muestra el tiempo en días (Dx) transcurrido tras la implantación del tejido.

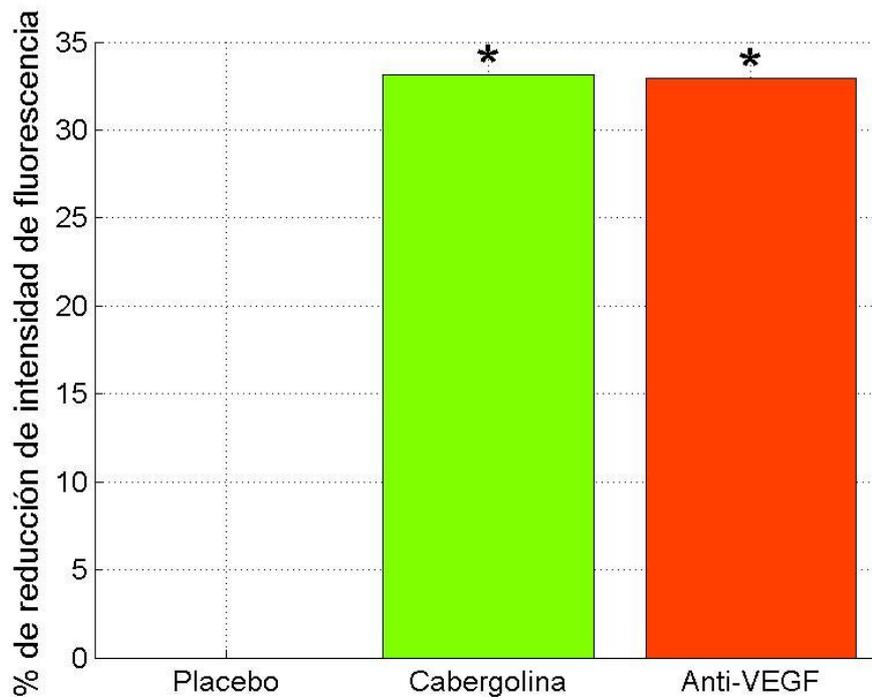
De forma similar a cuando se representó la reducción de intensidad fluorescente por animal, en este caso también se observó una pendiente decreciente de pendiente más marcada en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control. A pesar de que aparentemente las diferencias entre los grupos de intervención y control aparecieron antes en el tiempo, al inicio de la tercera semana, estas diferencias sólo fueron significativas durante los dos últimos días de monitorización.



**Figura 12. Variación porcentual en la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo por lesión.** Gráfico de barras que muestra la variación porcentual en la intensidad de fluorescencia emitida por cada lesión endometrial a lo largo del tiempo en los grupos placebo, agonista dopaminérgico (Cabergolina) y Anti-VEGF. En el eje de las X se muestra el tiempo en días (Dx) transcurrido tras la implantación del tejido. (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).

Al finalizar el periodo de estudio, tras 21 días de tratamiento, se cuantificó la intensidad de señal para los tres grupos, con respecto al punto de emisión de máxima intensidad, entre los días 5 y 8 de intervención.

Tomando como referencia el grupo control (0%), se cuantificó una reducción en la intensidad de fluorescencia de 33.12% en el grupo tratado con Cabergolina y de 32.93% en el grupo tratado con anti VEGF. Dicha reducción en la intensidad de fluorescencia emitida sirve como estimador de la reducción de tamaño de la lesión endometrial, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.



**Figura 13. Reducción estimada de tamaño de la lesión endometrial.** Gráfico de barras que muestra el porcentaje estimado de reducción de tamaño de la lesión endometrial por pérdida de intensidad de fluorescencia (eje Y), según la fluorescencia emitida por lesión, entre cada uno de los grupos de tratamiento con respecto al grupo control, que representa el 0% (eje X). (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).

## 5.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

A nivel histológico, el endometrio se compone de un epitelio y una gruesa capa subyacente de tejido conectivo o estroma. La mucosa endometrial contiene numerosas glándulas endometriales tubulares simples que se abren directamente a la superficie mucosa. Se extienden hasta la profundidad del estroma, donde terminan en un extremo ciego cerca del miometrio.

El epitelio es cilíndrico simple en la superficie y en las glándulas, y está compuesto por una mezcla de células ciliadas y secretoras. El estroma endometrial contiene abundantes células estrelladas incluidas en una red de fibras reticulares y una sustancia fundamental metacromática en fase folicular.

La vascularización del endometrio procede de las arterias basales, que en la fase secretora se vuelven tortuosas, constituyendo las arterias espirilidas. Cerca de la superficie epitelial se dividen en abundantes ramas terminales formando una densa red capilar.

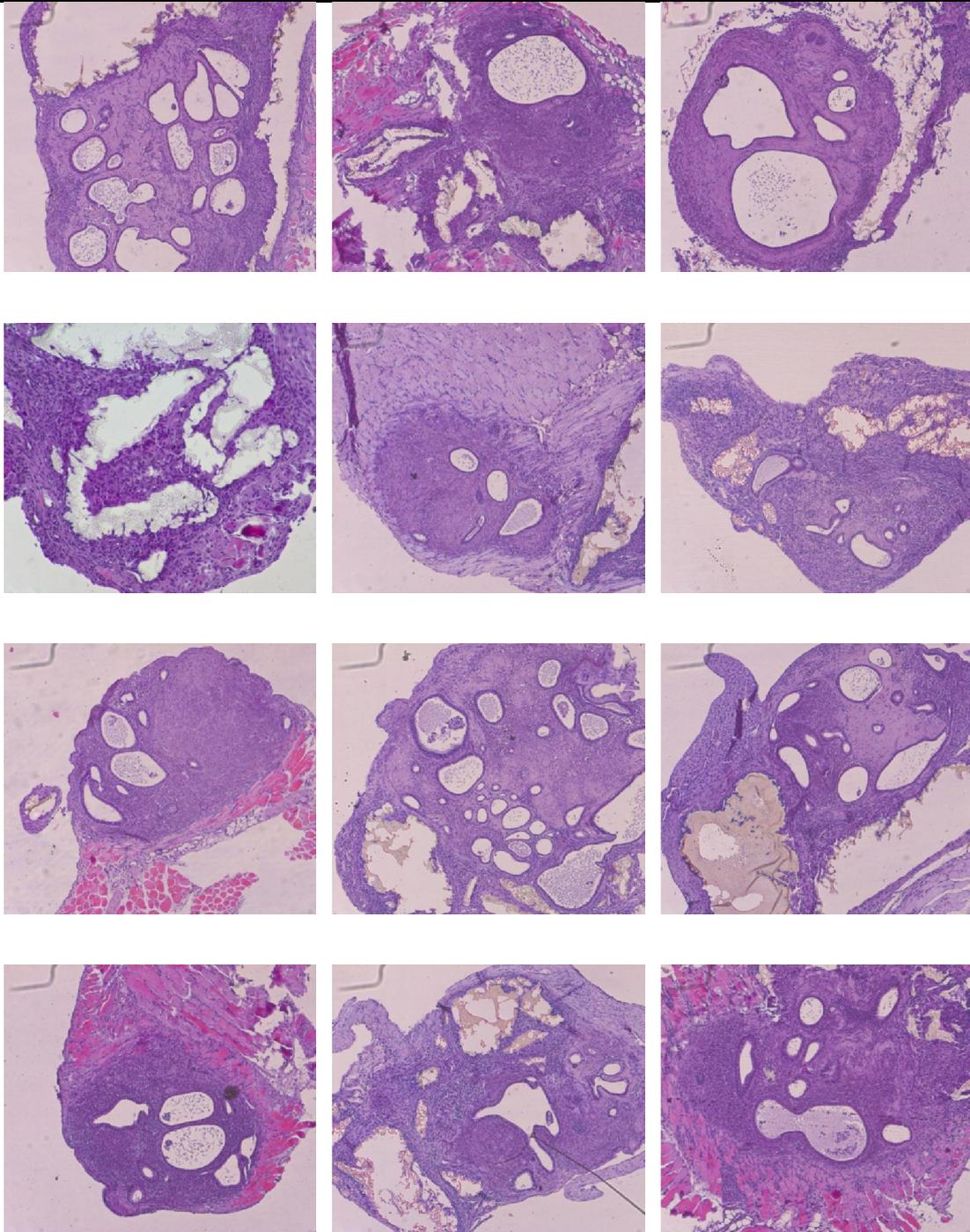
Durante el análisis histológico de las muestras se observó una desestructuración de la organización típica en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control, con un estroma más laxo, pérdida de la celularidad y de estructuras glandulares.

A continuación, se muestran imágenes representativas de cada uno de los grupos de estudio (control, tratado con Cabergolina y tratado con anti VEGF), con menor y mayor detalle.

---

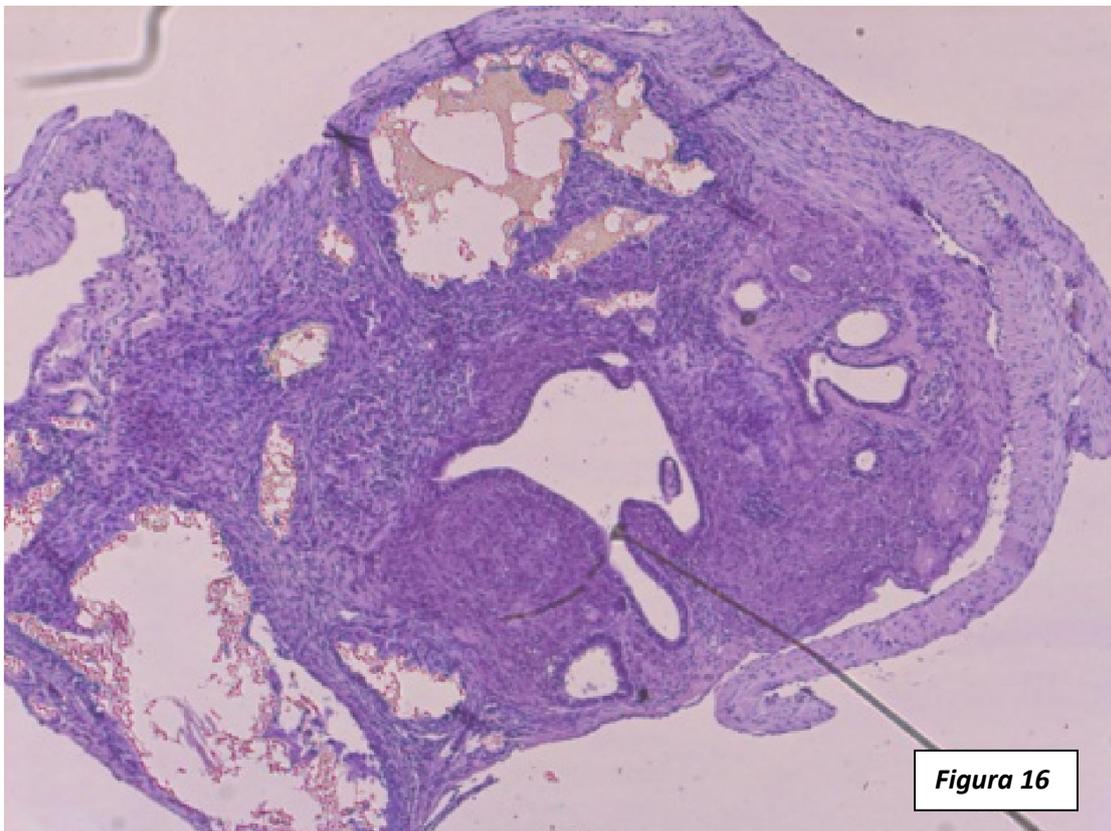
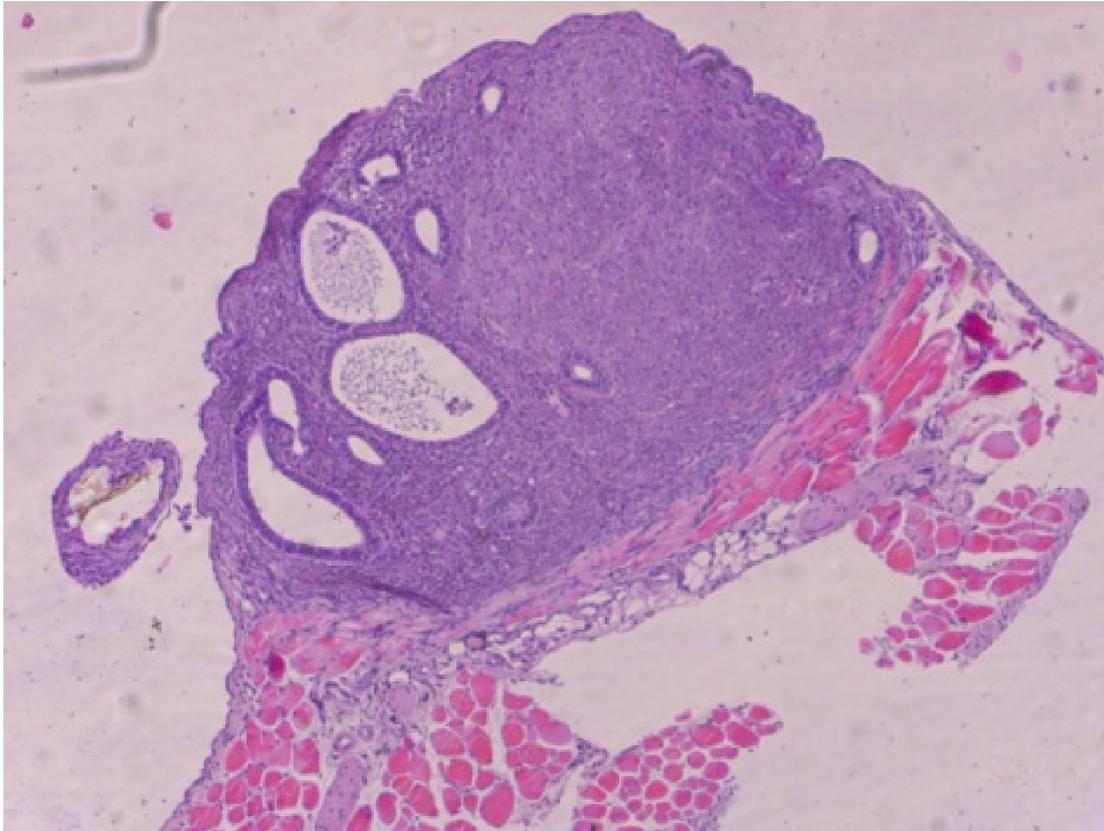
<b>Grupo control</b>	<b>Grupo tratado con anti-VEGF</b>	<b>Grupo tratado con Cabergolina</b>
----------------------	------------------------------------	--------------------------------------

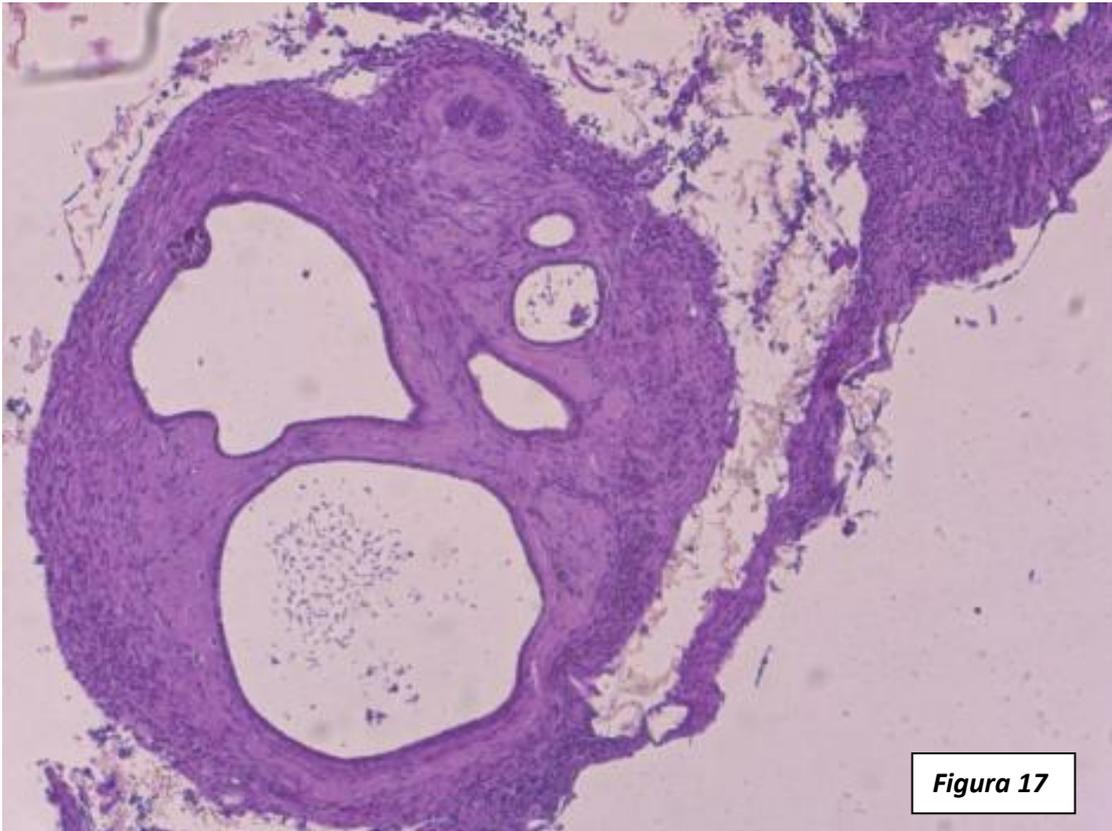
---



---

**Figura 14. Estudio histológico.** Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, donde se observa desestructuración de la organización típica en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control, con un estroma más laxo, pérdida de la celularidad y de estructuras glandulares.





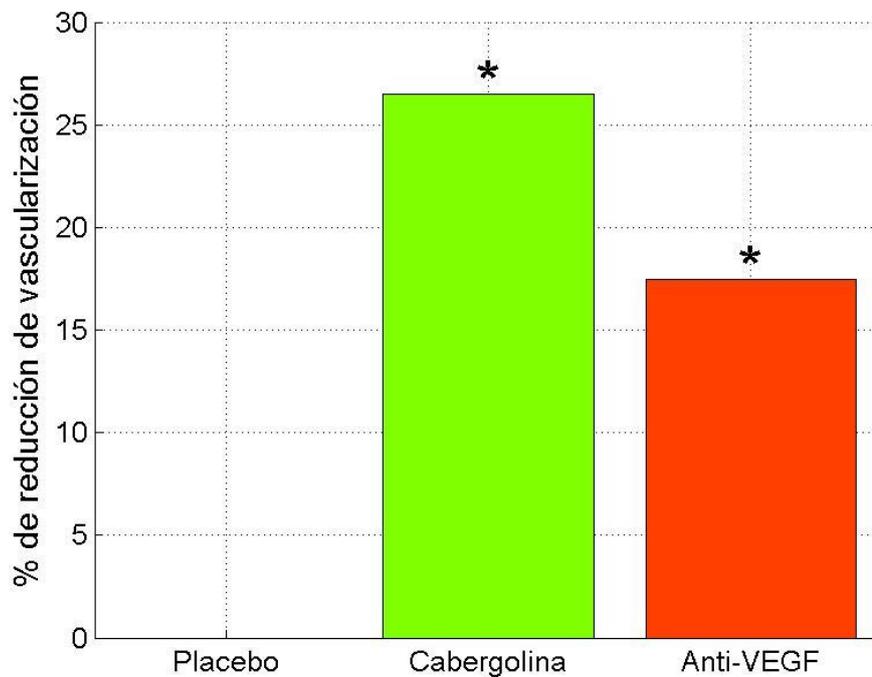
**Figuras 15, 16, 17. Estudio histológico.** Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. La imagen 5 corresponde al grupo control. Se observa conservación de la estructura típica endometrial; las imágenes 6 y 7 corresponden a los grupos de tratamiento, con Cabergolina y anti VEGF, respectivamente. En éstas se observa desestructuración de la organización típica endometrial, con un estroma más laxo, pérdida de celularidad y de estructuras glandulares.

### 5.3 Vascularización

La presencia de vascularización se detectó mediante técnicas de inmunofluorescencia. Este parámetro se expresó, en cada animal, como la proporción media de zonas vascularizadas (reconocidas por el Ac CD-31), calculado dividiendo el área de vascularización de cada zona específica de interés (SSAI) entre el área total de interés (TSAI), mediante la siguiente fórmula:  $(SSAI \text{ reconocido por CD31}/TSAI) \times 100$ .

Los datos se normalizaron con los resultados obtenidos en el grupo control utilizando la siguiente fórmula:  $100 - ([(SSAI/TSAI)_{\text{grupo tratado}}]/[(SSAI/TSAI)_{\text{grupo control}}]) \times 100$

Al finalizar el periodo de tratamiento se objetivó un descenso de las áreas vascularizadas cercano al 20% en los grupos de tratamiento con Cabergolina (27%) y anti VEGF (18%) con respecto al grupo control.





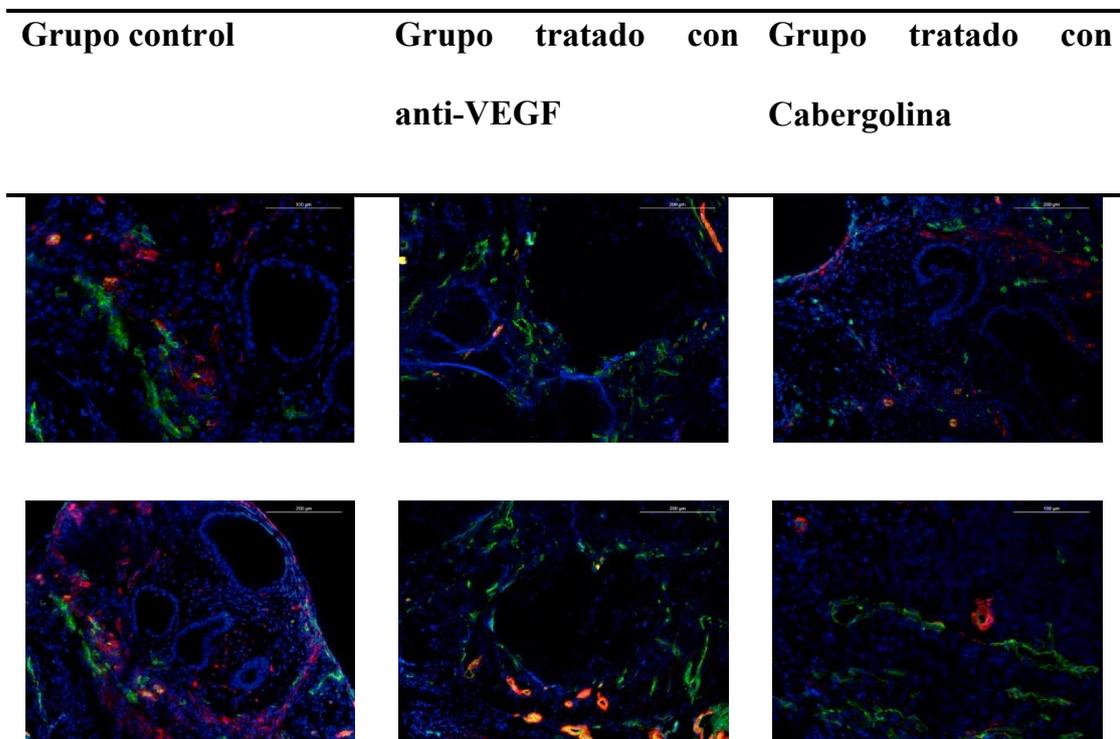
**Figura 18. Reducción de la vascularización.** Gráfico de barras que muestra la reducción en los porcentajes de vascularización en los grupos tratados con Cabergolina y anti-VEGF con respecto al grupo control. Los datos se muestran normalizados respecto al grupo control (placebo), que representa el 0%.

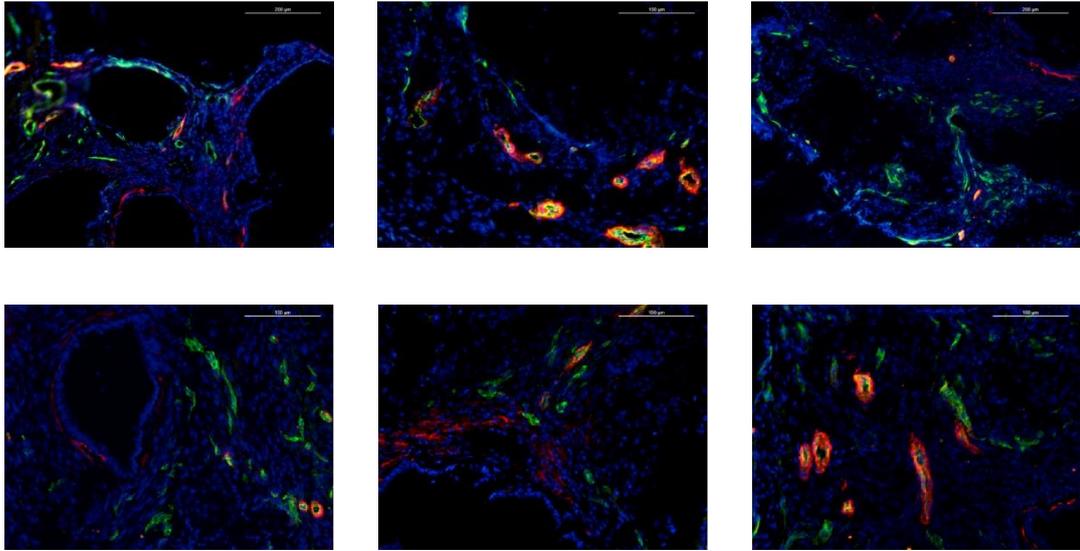
(\*Indica diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0.05$ ).

## 5.4 Madurez vascular

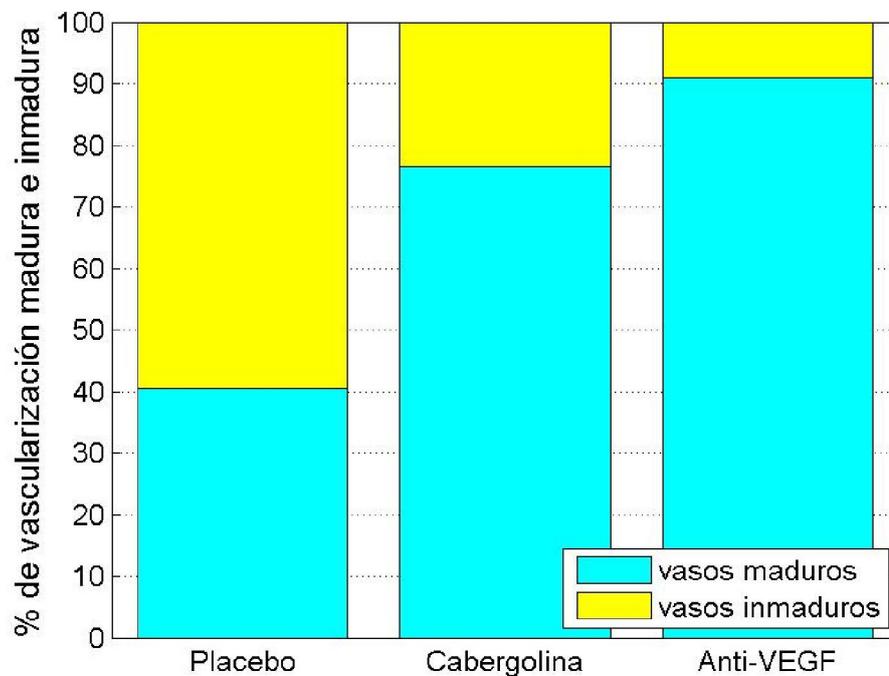
La madurez vascular se determinó mediante la detección de inmunofluorescencia, usando un doble marcaje. Por un lado, se utilizó un Ac murino policlonal contra CD-31, con unión específica a las células endoteliales, marcando por tanto el total de vascularización de los implantes endometriósicos; simultáneamente, se usó el Ac monoclonal murino anti  $\alpha$ -SMA para detectar los vasos maduros.

Este parámetro se expresó, en cada animal, como la proporción media de áreas conteniendo vasos maduros e inmaduros en las muestras obtenidas. La proporción de zonas con vasos maduros se calculó con la siguiente fórmula:  $[(\text{SSAI reconocido por CD31/TSAI}) / (\text{SSAI reconocido por } \alpha\text{-SMA/TSAI})] \times 100$ . La proporción de zonas con vasos inmaduros se calculó con la siguiente fórmula:  $100 - ([(\text{SSAI reconocido por CD31/TSAI}) / (\text{SSAI reconocido por } \alpha\text{-SMA/TSAI})] \times 100)$ .





**Figura 19. Madurez vascular.** Imágenes representativas de doble inmunofluorescencia para CD-31 (verde) y  $\alpha$ -SMA (rojo) de implantes endometriales en el grupo control, grupo tratado con anti VEGF y grupo tratado con Cabergolina. Los vasos inmaduros emiten fluorescencia verde, mientras que los maduros aparecen marcados con doble fluorescencia, verde y roja. La florescencia amarilla corresponde al solapamiento de ambas señales.





**Figura 20. Madurez vascular.** Gráfico de barras que representa el porcentaje de vascularización madura e inmadura de los implantes endometriósicos en cada uno de los grupos de estudio: grupo control (placebo), tratado con Cabergolina y tratado con anti VEGF.

Los resultados mostraron que, mientras el porcentaje de madurez vascular rondaba el 40% en el grupo control, alcanzaba valores de hasta el 90% en el grupo tratado con anti VEGF, y del 76% en el tratado con Cabergolina.

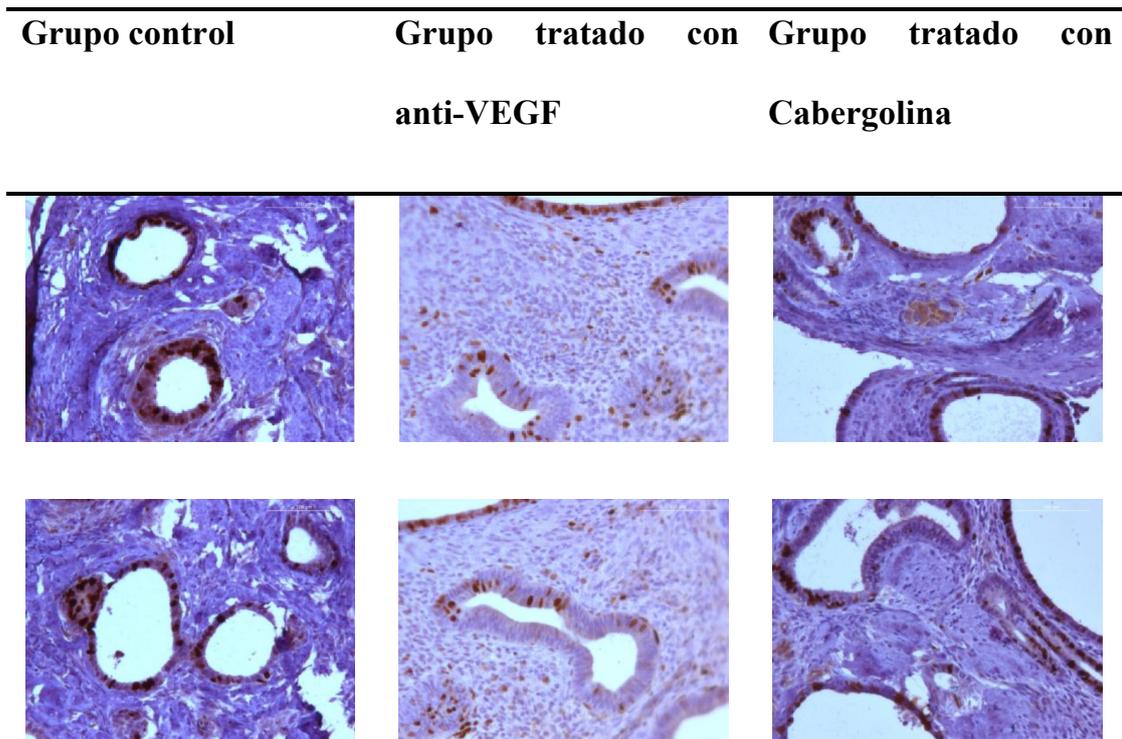
Al analizar el tipo de vascularización en los diferentes grupos de tratamiento, se observó, por tanto, un claro efecto de los tratamientos en la inducción de la maduración vascular.

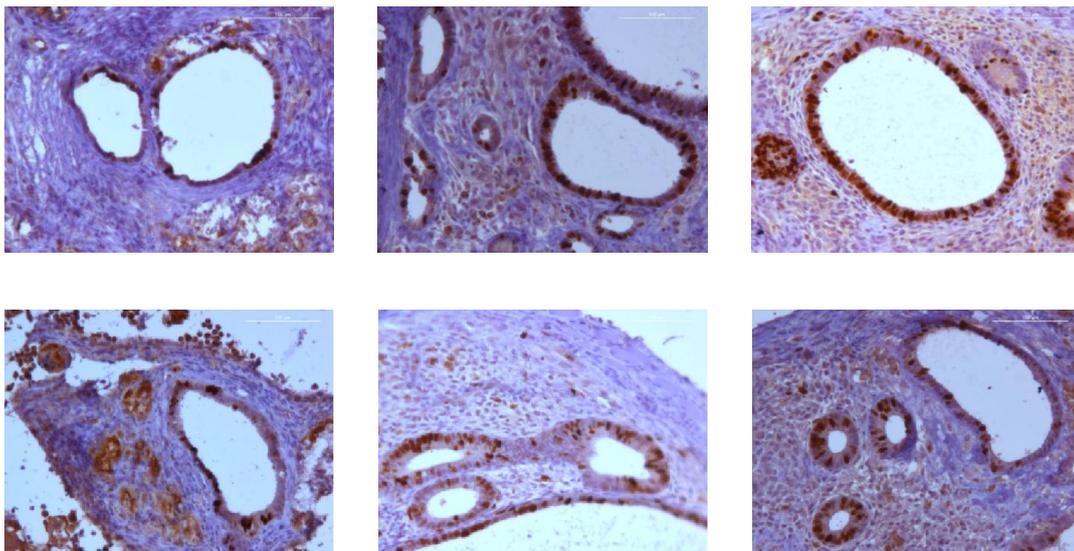
Dado que sólo el 60% de la vascularización del grupo control es de tipo inmaduro, y por lo tanto sensible a los tratamientos anti angiogénicos, es probable que los tratamientos con Cabergolina y anti VEGF interrumpan el desarrollo de hasta un 40-50% de vasos inmaduros de nueva formación.

## 5.5 Proliferación

La proliferación celular se determinó mediante técnicas de inmunohistoquímica, utilizando el Ac anti-Ki67 para la detección del pool de células en fase de división celular.

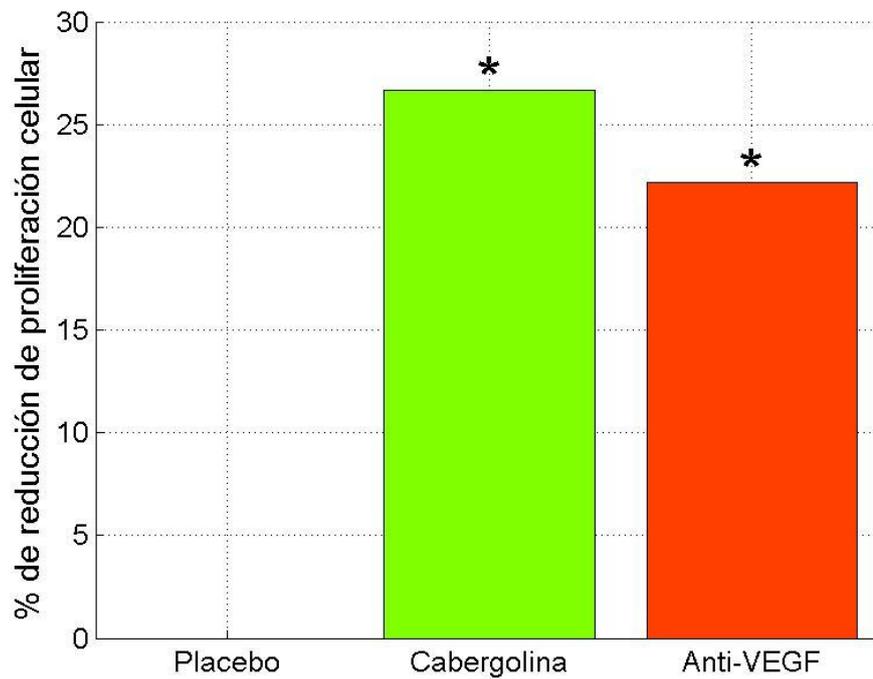
Dicho parámetro se expresó como el porcentaje de área de interés (SSAI, siglas en inglés de 'specific stained area of interest') reconocida por el Ac anti-ki67 con respecto al área total de tejido (TSAI, siglas en inglés de 'total specific area of interest'). Los datos se normalizaron con los resultados obtenidos en el grupo control utilizando la siguiente fórmula  $100 - \left( \frac{[(SSAI/TSAI)_{\text{grupo tratado}}]}{[(SSAI/TSAI)_{\text{grupo control}}]} \times 100 \right)$ .





**Figura 21. Proliferación celular.** La proliferación celular en los implantes endometriósicos se estudió mediante el anticuerpo Ki67 (depósito marrón). Imágenes de inmunohistoquímica representativas de cada uno de los grupos (control, tratado con antiVEGF y tratado con Cabergolina).

Al finalizar el periodo de tratamiento se observó un claro efecto en la reducción de la proliferación en los grupos tratados con Cabergolina y anti VEGF al ser comparados con el grupo control. En este sentido, se objetivó una reducción en el índice de proliferación celular de 22.2% en el grupo tratado con Anti VEGF y de 26.7% en el grupo tratado con cabergolina, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. Estos resultados se muestran a continuación en la figura 22.

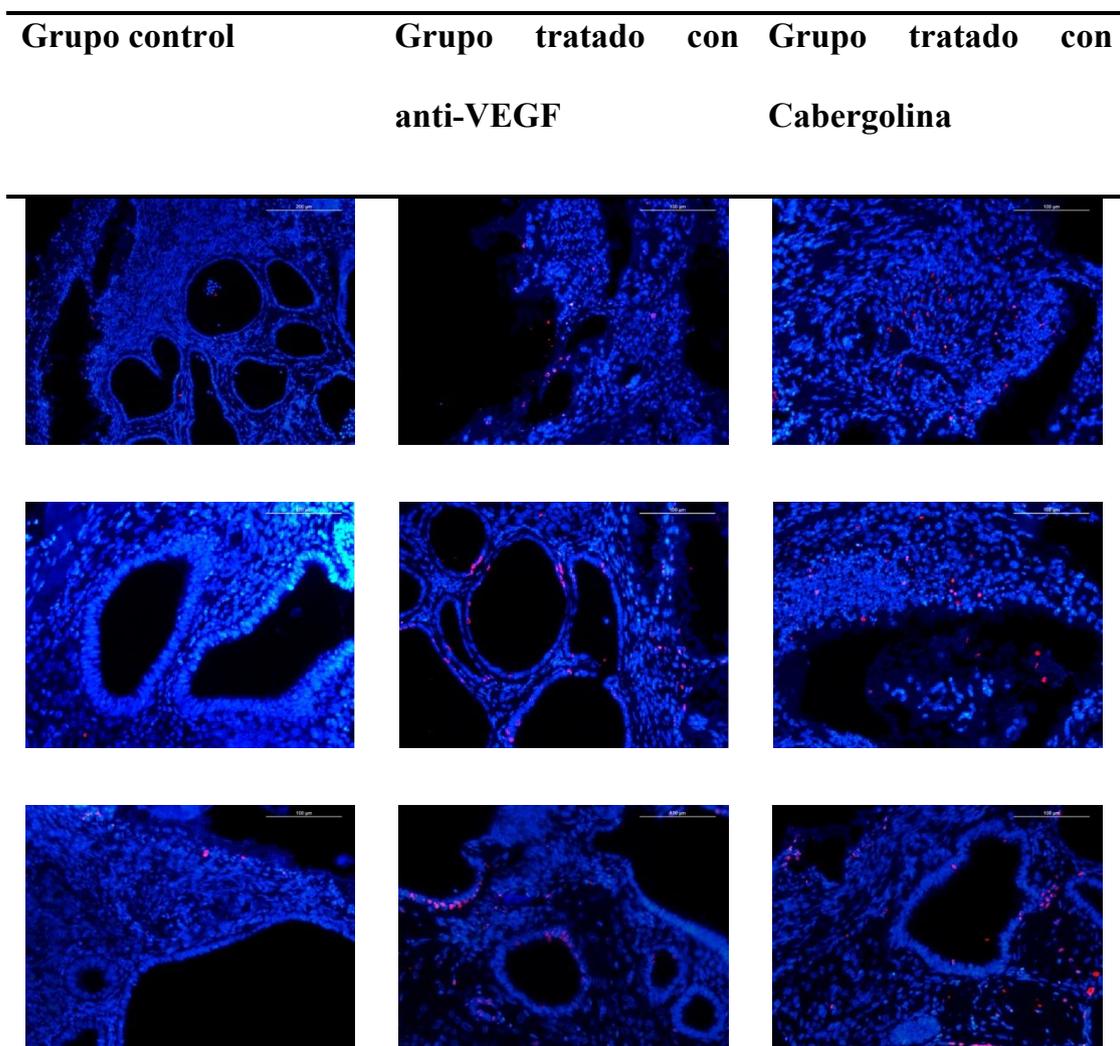


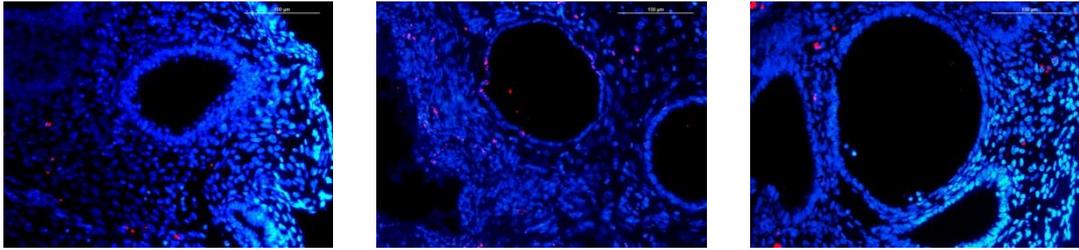
**Figura 22. Porcentaje de reducción de proliferación celular.** Gráfico de barras que representa el porcentaje de reducción de proliferación celular en los implantes endometriósicos en cada uno de los grupos de tratamiento (Cabergolina y anti VEGF), normalizados respecto al grupo control, que representa el 0% (eje Y). (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).

Se objetivó, por tanto, un claro efecto en la reducción de la proliferación celular en los grupos tratados con Cabergolina y anti VEGF al ser comparados con el grupo control.

## 5.6 Apoptosis

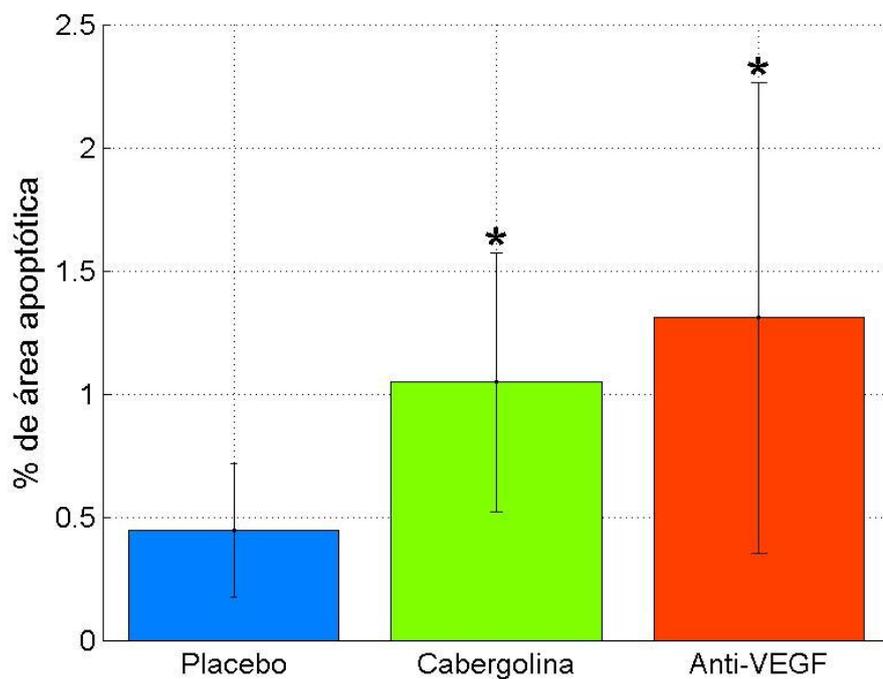
La apoptosis celular se detectó mediante técnicas de inmunofluorescencia. El marcaje celular se realizó mediante la técnica TUNEL, que detecta la fragmentación del ADN consecuencia de las cascadas de señalización apoptótica, marcando las células de color rojo-rosa.





**Figura 23. Apoptosis celular.** Imágenes representativas de cada uno de los grupos. Para la detección de la apoptosis celular se recurrió al marcaje de las células apoptóticas mediante TUNEL (color rojo-rosa); el resto de las células se marcan en azul con el reactivo DAPI.

Este parámetro se expresó como el porcentaje de área de interés (SSAI, siglas en inglés de 'specific stained area of interest') reconocida por la DNAasa I con respecto al área total de tejido (TSAI, siglas en inglés de 'total specific area of interest'). El porcentaje de área de apoptosis de cada uno de los grupos se representa en la figura 24.



**Figura 24. Apoptosis celular.** Gráfico de barras que representa el porcentaje de área apoptótica en cada uno de los grupos: control (placebo), tratado con agonista dopaminérgico (Cabergolina) y tratado con anti-VEGF. (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).

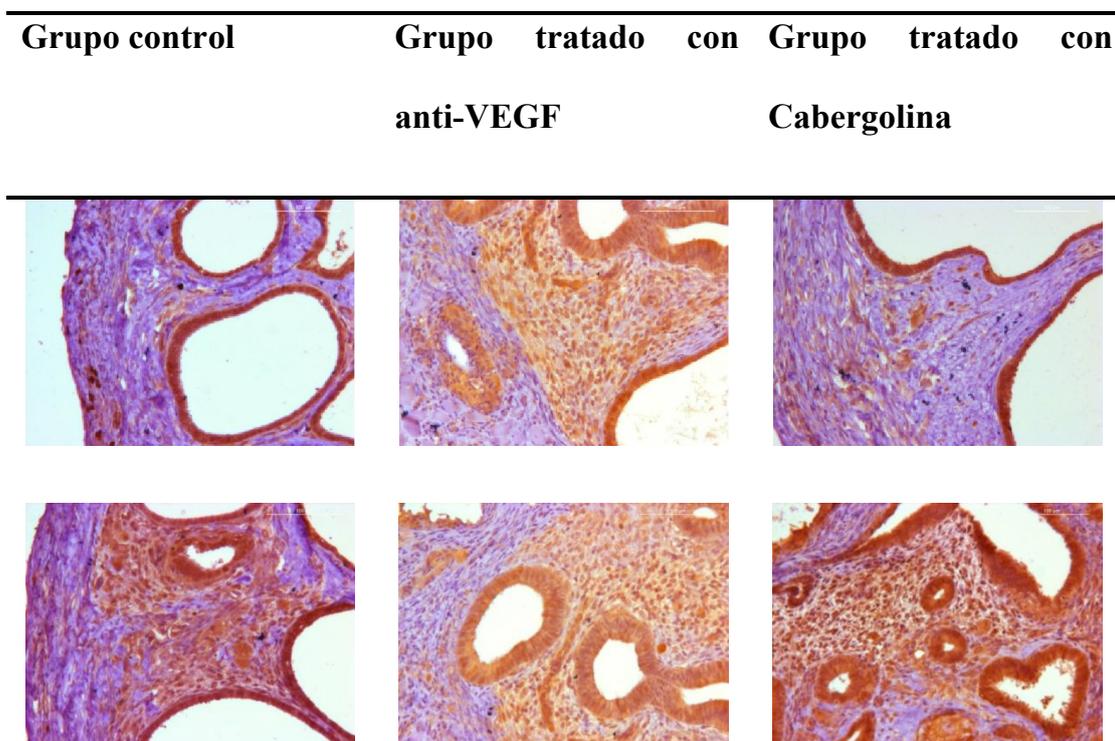


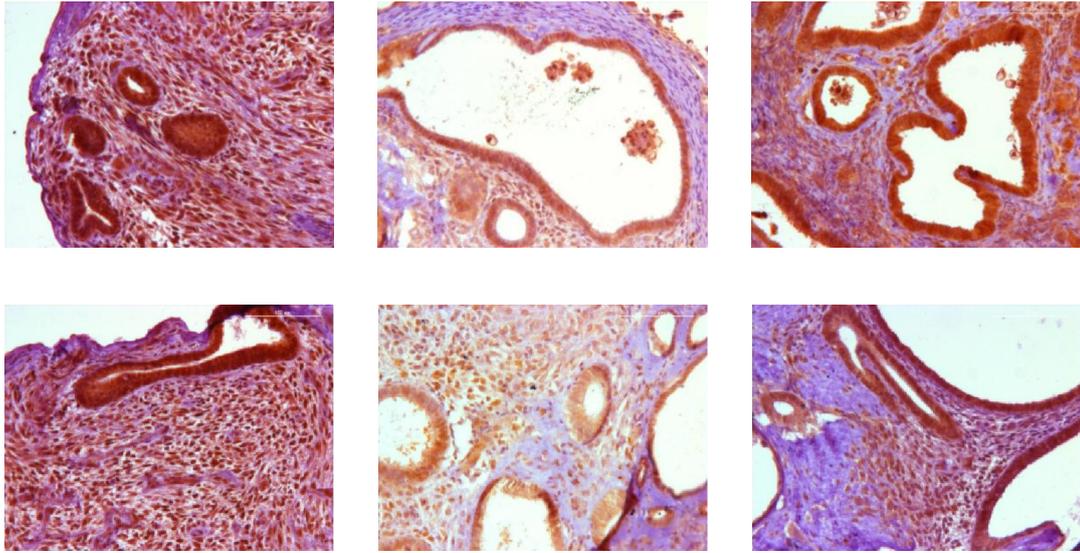
Al finalizar el periodo de tratamiento se objetivó, por tanto, un claro efecto de incremento de la apoptosis en los grupos tratados con Cabergolina y anti VEGF con respecto al grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

## 5.7 Determinación de VEGFR2

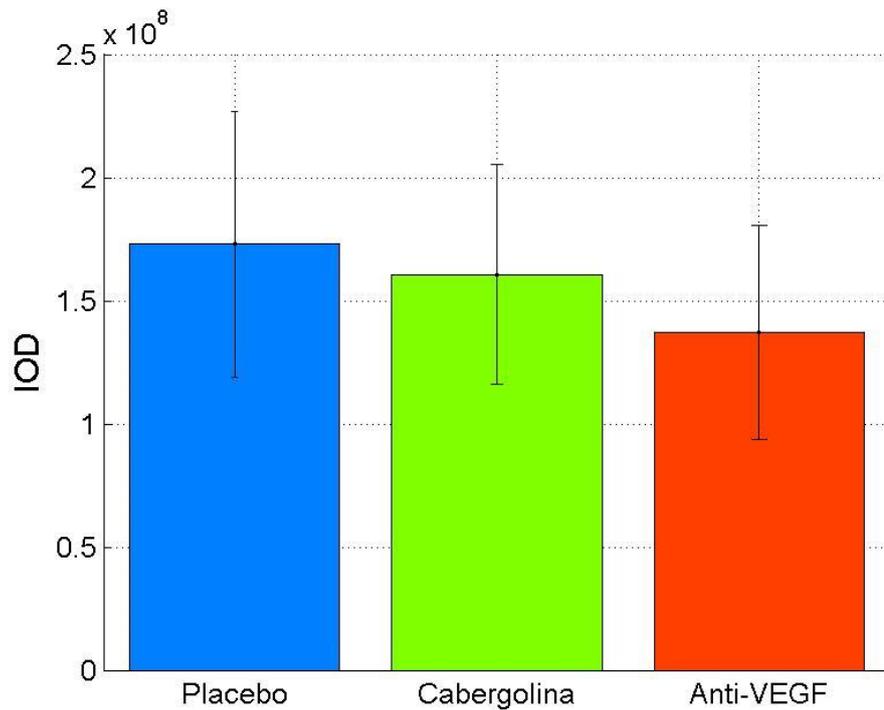
La determinación de VEGFR2 se realizó mediante técnicas de inmunohistoquímica; para la detección de dicho parámetro se utilizó el marcaje con el Ac Flk, con unión específica al parámetro de interés.

El incremento en la intensidad de tinción del parámetro de interés en cada imagen se expresó como promedio de la intensidad relativa de tinción de VEGFR2 en muestras representativas de cada animal, y calculado usando la siguiente fórmula: (SSAI marcado por VEGFR2 x “actual IOD” VEGFR2). De esta forma se obtuvo una IOD de cada una de las imágenes analizadas, que recoge la intensidad de tinción del área de interés de cada una de esas imágenes.





**Figura 25. Determinación de VEGFR2.** Imágenes de inmunohistoquímica representativas de cada uno de los grupos (control, tratado con antiVEGF y tratado con Cabergolina). La detección de la expresión de VEGFR2 se realizó mediante el anticuerpo Flk (depósito marrón).



**Figura 26. Cuantificación de VEGFR2.** Gráfica de barras que representa la intensidad de expresión de la proteína VEGFR2 en los implantes endometriósicos en cada uno de los grupos de estudio:



control (placebo), tratado con agonista dopaminérgico (Cabergolina) y tratado con anti-VEGF. El eje Y muestra la intensidad de expresión de VEGFR2 en unidades de Densidad Óptica Integrada.

Los valores finales medios de cada grupo se expresaron como la media de IOD de cada imagen, sin evidenciarse diferencias significativas entre los grupos de tratamiento con respecto al grupo control.

## 5.8 Determinación de los niveles de VEGF, VEGFR2 y Ang 1 normalizados por el gen constitutivo 18S

En primer lugar, se calculó la diferencia entre los valores de Ct entre el gen constitutivo 18S y los genes diana (VEGF, VEGFR, Ang 1) en las muestras de cada animal, de los grupos tratados y no tratados:

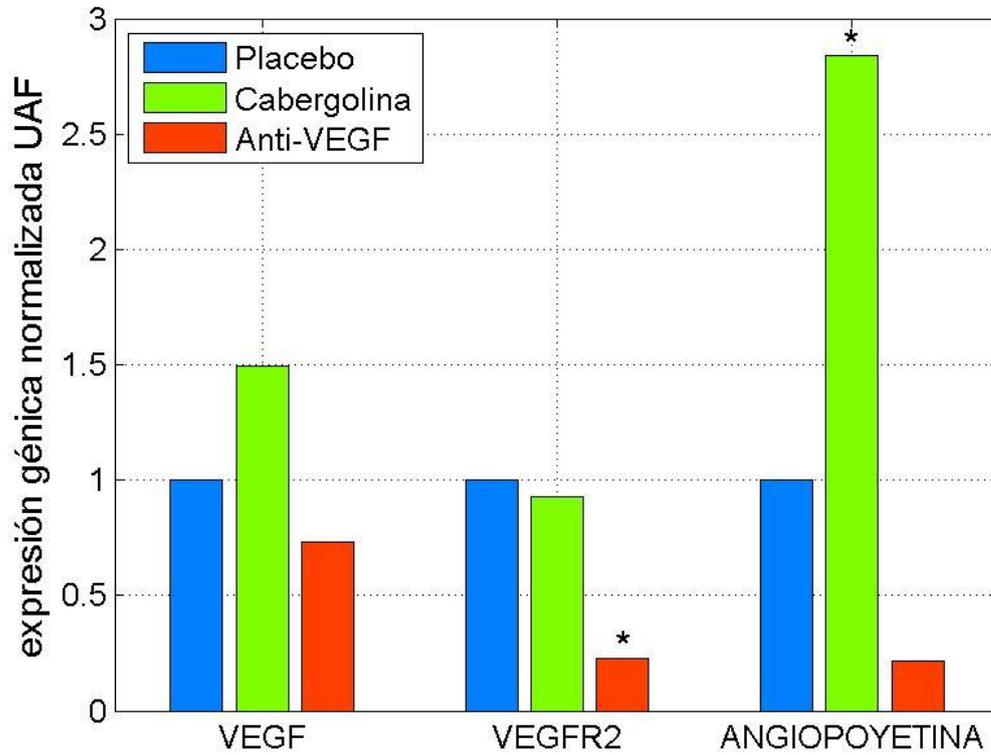
$$\Delta Ct_{\text{grupo tratado}} - \Delta Ct_{\text{grupo NO tratado}} = (\Delta Ct_{\text{gen 18S.gen diana}})_{\text{grupo tratado}} - (\Delta Ct_{\text{gen 18S.gen diana}})_{\text{grupo NO tratado}}$$

Para determinar la relación entre los niveles de expresión en las muestras de los animales tratados vs no tratados, se usó la siguiente fórmula:

$$Q_r = 2^{Ct(\text{grupo tratado} - \text{no tratado})}$$

Para cada uno de los genes diana de interés (VEGF, VEGFR, Ang 1), se comparó el nivel de expresión entre las muestras del grupo tratado vs no tratado, obteniendo un valor  $Q_r$  para cada uno de ellos. Se consideró que había inducción en la expresión de un determinado gen cuando el  $Q_r$  fue  $>2$ .

Tal y como se muestra representado gráficamente en la siguiente figura, se objetivó una clara reducción en la expresión de VEGFR2 en el grupo de animales tratados con anti VEGF, así como una llamativa sobre expresión de Ang 1 en el grupo tratado con Cabergolina.



**Figura 27. Expresión génica normalizada respecto al gen 18S.** Gráfico de barras que muestra los valores de expresión génica de VEGF, VEGFR2 y Angiopoyetina 1 normalizados respecto al gen constitutivo 18S. El eje Y muestra la expresión génica normalizada en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).



## 5.9 Determinación de los niveles de VEGF, VEGFR2 y Ang 1 normalizado por el gen constitutivo $\beta$ -actina

En primer lugar, se calculó la diferencia entre los valores de Ct entre el gen constitutivo  $\beta$ -actina y los genes diana (VEGF, VEGFR, Ang 1) en las muestras de cada animal, de los grupos tratados y no tratados:

$$\Delta Ct_{\text{grupo tratado}} - \Delta Ct_{\text{grupo NO tratado}} = (\Delta Ct_{\text{gen } \beta\text{-actina.gen diana}})_{\text{grupo tratado}} - (\Delta Ct_{\text{gen } \beta\text{-actina.gen diana}})_{\text{grupo NO tratado}}$$

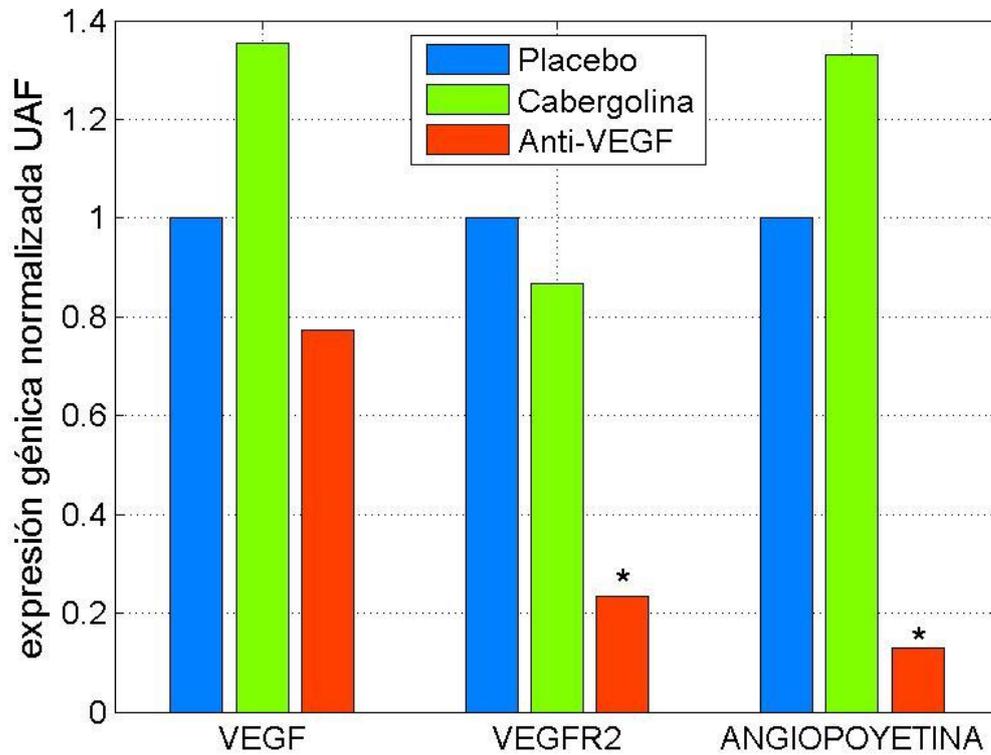
Para determinar la relación entre los niveles de expresión en las muestras de los animales tratados vs no tratados, se usó la siguiente fórmula:

$$Q_r = 2^{Ct(\text{grupo tratado} - \text{no tratado})}$$

Para cada uno de los genes diana de interés (VEGF, VEGFR, Ang 1), se comparó el nivel de expresión entre las muestras del grupo tratado vs no tratado, obteniendo un valor  $Q_r$  para cada uno de ellos. Se consideró que había inducción en la expresión de un determinado gen cuando el  $Q_r$  fue  $>2$ .

Los resultados mostraron una reducción en la expresión tanto de VEGFR2 como de Ang 1 en el grupo tratado con anti-VEGF respecto al grupo control, siendo estas diferencias significativas.

Así mismo, se detectó una sobre expresión de Ang 1 en el grupo tratado con cabergolina, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.



**Figura 28. Expresión génica normalizada respecto al gen  $\beta$ -actina.** Gráfico de barras que muestra los valores de expresión génica de VEGF, VEGFR2 y Angiopoyetina 1 normalizados respecto al gen constitutivo  $\beta$ -actina. El eje Y muestra la expresión génica normalizada en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). (\*Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control,  $p < 0.05$ ).



## 6 DISCUSIÓN

---

La endometriosis es una enfermedad crónica, de elevada prevalencia y etiopatogenia no claramente establecida, para la que no se dispone, actualmente, de un tratamiento seguro y eficaz a largo plazo.

El establecimiento de la angiogénesis como uno de los requisitos fundamentales en la implantación y desarrollo de la enfermedad ha llevado a considerar los fármacos antiangiogénicos como una potencial diana terapéutica. Estos compuestos antiangiogénicos han demostrado, en modelos animales, reducir el tamaño de las lesiones endometriales; sin embargo, el uso de estos compuestos en humanos se ve limitado por el intolerable perfil de efectos secundarios que presentan.

Los agonistas dopaminérgicos (fármacos con un perfil de tolerabilidad aceptable) han demostrado, en modelos animales, reducir el tamaño de los implantes endometriósicos mediante un mecanismo inhibitor de la angiogénesis (Delgado Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009). Si bien en estudios en humanos estos fármacos han demostrado reducir el tamaño de las lesiones endometriósicas de forma significativa, no se ha replicado la observación de disminución de la angiogénesis, lo cual plantea dudas razonables respecto al mecanismo de acción de los mismos (Gómez et al, 2011a).

Si, además, consideramos que la metodología empleada en los estudios en modelo animal (Delgado Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) para valorar el tamaño de las lesiones endometriales pudiera no ser lo suficientemente precisa, estamos poniendo en entredicho el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la reducción de tamaño de las lesiones endometriales; en caso de que realmente los agonistas dopaminérgicos no ejercieran un efecto sobre el tamaño de las lesiones endometriales en



animales, posiblemente este efecto tampoco se produciría en humanos.

Los resultados discordantes señalados nos llevan a replantearnos hasta qué punto el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre los implantes endometriósicos está mediado por sus efectos antiangiogénicos, si estos efectos antiangiogénicos se traducen en una reducción de tamaño de las lesiones endometriales, o si, por contra, existen otras vías a través de las cuales ejercen su efecto.

Se plantearon diversas posibilidades que explicaran porqué los agonistas dopaminérgicos no produjeron cambios en los parámetros de angiogénesis en el estudio en humanos (Gómez et al, 2011a). Una posibilidad es que estos cambios se produjeran, pero no se detectaran, bien por el bajo número de pacientes que se estudiaron, o porque las lesiones en las que realmente se produjeron estos fenómenos redujeron tanto su tamaño que no pudieron ser recuperadas para su análisis posterior.

Otra opción es que realmente estos cambios no se detectaran porque no se hubieran producido en humanos, o se produjeran en mucha menor cuantía, bien porque intervengan otros posibles mecanismos de acción (reducción de la inflamación secundaria a la cirugía, aumento de la fibrinolisis, etc) o por el importante papel que el sistema inmunológico tiene en la patogenia de la endometriosis, que podría ser el responsable de enmascarar los fenómenos antiangiogénicos que sí se observaron en modelos animales inmunocomprometidos.

Por último, otra posibilidad a tener en consideración es la relevancia biológica de los hallazgos en los estudios en modelos animales. Al ser comparados los agonistas dopaminérgicos únicamente con un grupo control, no queda claro si la reducción que se constata en los parámetros de angiogénesis, a pesar de ser estadísticamente significativa, tiene una relevancia biológica real.



Con la finalidad de esclarecer la importancia del efecto antiangiogénico en la reducción de tamaño de las lesiones endometriales, nos planteamos realizar el presente estudio experimental en un modelo animal de endometriosis inmunocomprometido, comparando un agonista dopaminérgico, la Cabergolina, con un compuesto estándar anti VEGF y un grupo placebo.

Con la realización de este estudio pretendíamos corroborar el efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos sobre la endometriosis, si efectivamente estos efectos se traducen en una reducción de tamaño de las lesiones endometriales, así como determinar la importancia biológica de estos efectos. Para ello era necesario realizar un estudio comparativo con un compuesto estándar anti VEGF con el objeto de poder valorar si estos efectos antiangiogénicos se traducían en una reducción significativa del tamaño de las lesiones endometriales.

A este respecto, los agonistas dopaminérgicos, representados en nuestro caso por la cabergolina, demostraron una reducción del tamaño de la lesión endometriósica similar al producido por el compuesto anti VEGF, así como un efecto antiangiogénico, antiproliferativo e inductor de la apoptosis equiparable a dicho compuesto.

Vamos a analizar los resultados obtenidos en nuestro trabajo, de forma desglosada, de acuerdo con los objetivos marcados previamente al desarrollo del proyecto.

En primer lugar, por lo que respecta al desarrollo del modelo animal, se logra desarrollar exitosamente un modelo animal murino que permite una reproducción fiel de una enfermedad humana, la endometriosis; el ensayo de diferentes tratamientos y, la monitorización in vivo, fiable y no invasiva, de la evolución de los implantes endometriósicos durante el tiempo de estudio.



El modelo animal elegido, modelo murino heterólogo, presenta una serie de peculiaridades a destacar. Se trata de un modelo animal inmunocomprometido, en el que se implantan porciones de endometrio humano a fin de desarrollar la enfermedad endometriósica. El hecho de que se trate de animales inmunodeprimidos nos permite el desarrollo de los implantes endometriósicos durante más tiempo, pudiendo realizar estudios más o menos largos, y nos permite evaluar el papel del efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos no enmascarado por el efecto de la inflamación mediada por el sistema inmune del propio animal, ni por el propio efecto inmunomodulador de los agonistas dopaminérgicos.

En estos modelos animales es muy importante valorar correctamente la tasa de implantación de los fragmentos endometriales, ya que si hubiera diferencias entre los grupos los resultados no serían valorables. En este sentido, recurrimos a la fijación de los implantes de endometrio mediante adhesivo tisular, lo que eleva la tasa de implantación de un 30% a un 100%. En nuestro estudio, al realizar una monitorización no invasiva del tamaño de la lesión pudimos corroborar de forma fiable la correcta implantación de todos los fragmentos, sin diferencias iniciales entre los grupos de estudio.

Los modelos animales presentan limitaciones. En primer lugar, se trata de un modelo animal para estudiar una enfermedad humana; al carecer de sistema inmune completo no permiten evaluar en su total complejidad el papel que el sistema inmunitario pudiera tener sobre la endometriosis, aunque esto nos permite, al mismo tiempo, valorar el efecto antiangiogénico de la cabergolina no enmascarado por otros mecanismos. Además, existe la posibilidad de que los fármacos evaluados tengan diferentes efectos en roedores que en humanos.



Con respecto a los siguientes objetivos marcado al inicio, corroborar el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre los parámetros de proliferación y angiogénesis, se valoraron en el estudio los siguientes parámetros: índice de proliferación y apoptosis, presencia y tipo de vascularización, así como la presencia de VEGFR2 y expresión de ARN<sub>m</sub> de VEGF, VEGFR2 y Ang 1.

Procederemos a comentar, en primer lugar, los efectos de los agonistas dopaminérgicos sobre los parámetros histológicos, de proliferación celular y apoptosis, todos ellos indicadores de un efecto regresivo sobre los implantes endometriales, para desarrollar a continuación los resultados obtenidos en los parámetros relacionados con la angiogénesis propiamente dicha.

A nivel histológico se observó una desestructuración de la organización típica en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control, con un estroma más laxo, con pérdida de la celularidad y de estructuras glandulares, signos todos ellos de destrucción celular.

Tal y como se había realizado en estudios previos (Delgado-Rosas et al 2011; Gómez et al, 2006; Novella-Maestre et al, 2009), se analizó la proliferación celular mediante el marcador de proliferación celular Ki67, objetivándose un descenso de esta en las muestras procedentes de los ratones tratados con anti VEGF y agonista dopaminérgico, lo que apoyaba el efecto antiproliferativo del agonista dopaminérgico sobre los implantes endometriósicos.

Por lo que respecta a la apoptosis, ésta se analizó mediante la detección de la fragmentación del ADN (TUNEL). El incremento significativo de la misma en los grupos de animales tratados con respecto al grupo control refuerza la importancia de la inducción de esta en la reducción del tamaño de las lesiones endometriósicas.



Por tanto, podemos afirmar que los agonistas dopaminérgicos, representados por la cabergolina en nuestro caso, produjeron una reducción en los índices de proliferación celular y en la inducción de apoptosis similar a la producida por el compuesto anti VEGF y significativa respecto al grupo control.

Al analizar el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la vascularización, se evidenció una moderada reducción de la misma en los dos grupos de tratamiento respecto al control, con un llamativo efecto incrementando la madurez vascular.

El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia con doble marcaje (CD31 y  $\alpha$ -actina), marcadores de vascularización y madurez vascular, respectivamente, reveló una reducción de la vascularización cercana al 20% en los grupos tratados, tanto con anti VEGF como con agonista dopaminérgico, respecto al grupo control. Los resultados mostraron que, mientras el porcentaje de madurez vascular rondaba el 40% en el grupo control, alcanzaba valores de hasta el 90% en el grupo tratado con anti VEGF, y del 76% en el tratado con Cabergolina.

A pesar de que ambos tratamientos produjeron una reducción significativa del área total de vascularización respecto al grupo control, ésta fue moderada (cercana al 20%) y no explicaría la elevada proporción de vasos maduros, que se explicaría más bien por un efecto inductor de la maduración de los vasos neoformados en los implantes endometriósicos.

Este resultado podría sugerir que el tratamiento con anti VEGF indujo también una maduración en aquellos vasos que no destruyó. Tendríamos, por tanto, un doble efecto (destrucción vascular e inducción de maduración en los restantes vasos) que nos explicaría las amplias áreas de vascularización halladas en este grupo.



Probablemente, la Cabergolina ejerciera un efecto similar al descrito, que explicaría, así mismo, el alto porcentaje de vasos maduros en los implantes endometriósicos. Esta sospecha se sustenta en el hecho de que los niveles de RNA<sub>m</sub> de Ang 1, un marcador de madurez vascular, se encontrasen especialmente elevados en el grupo tratado con Cabergolina.

En estudio previos realizados en modelos animales (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) se observó, de forma congruente con nuestros resultados, una reducción en la proporción de vasos inmaduros, que se justifica por la mayor sensibilidad a las señales angiogénicas de los vasos inmaduros o de nueva formación, no cubiertos por pericitos, que crecen bajo la acción de VEGF y sufren fenómenos de apoptosis en su ausencia.

En cuanto a la determinación de la presencia de VEGFR2 mediante inmunohistoquímica en los implantes endometriósicos, no se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Esto podría deberse a que el efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos estaría mediado por inhibición de la activación, mediante reducción de la fosforilación de VEGF-VEGFR2 (Gómez et al, 2006). Esta afirmación se ve respaldada por el hecho de que no se hallaron diferencias entre el grupo de tratamiento con el agonista dopaminérgico y con el compuesto anti VEGF.

Se determinó, por último, mediante RT-QF-PCR la expresión génica de VEGF, VEGFR2 y Ang 1 mediante la detección de los niveles de ARN<sub>m</sub>. En el grupo tratado con el compuesto anti VEGF se detectó una regulación a la baja de la expresión de VEGFR2 tras normalizar los resultados con respecto a los genes constitutivos 18S y  $\beta$ -



actina, que no se observó en el grupo tratado con Cabergolina. Por lo que respecta a la expresión de VEGF no se detectaron diferencias entre los tres grupos de estudio.

Con estos hallazgos podríamos decir que la Cabergolina no parece ejercer efectos de regulación a nivel de ARN<sub>m</sub> sobre VEGF y VEGFR2. El mecanismo de acción de los agonistas dopaminérgicos probablemente viene mediado, tal y como se recoge en los estudios de Gómez y Novella-Maestre (Gómez et al, 2006; Novella- Maestre et al, 2009), por una activación y regulación al alza de los receptores dopaminérgicos D2R en las células endoteliales, lo cual produciría mediante un mecanismo autocrino o paracrino, una disminución en la fosforilación del VEGFR2. Como resultado de la inhibición del VEGFR2 se produciría una inhibición de la vascularización y neovascularización de las lesiones endometriósicas que explicaría los hallazgos obtenidos en cuanto a reducción de la proliferación celular y densidad vascular, así como al incremento de la apoptosis.

Estudios previos han sugerido que los agonistas dopaminérgicos, como la Cabergolina, no ejercen una inhibición sobre VEGF a nivel transcripcional (Rey-Ares et al, 2007; Gómez et al, 2006). Posteriormente, el grupo de Ferrero et al confirma estos hallazgos y postula un posible mecanismo de acción de la cabergolina interfiriendo en el proceso de producción y secreción de VEGF, en un estudio in vitro que valora los mecanismos de acción de la Cabergolina sobre células de la granulosa (Ferrero et al, 2015).

En este sentido, en los trabajos publicados por Novella-Maestre en 2009 y Delgado-Rosas en 2011, se postula, así mismo, que los agonistas dopaminérgicos podrían ejercer su acción antiangiogénica de forma paralela, al inhibir la secreción de Prolactina, sustancia con potente acción angiogénica (Novella-Maestre et al, 2009).

En cualquier caso, no forma parte de los objetivos del presente estudio esclarecer el mecanismo bioquímico intrínseco por el que se inhibe la angiogénesis, constituyendo ésto una de las tareas pendientes a afrontar en próximos estudios.

En nuestro trabajo encontramos una regulación al alza en los niveles de Ang 1 (sustancia anti angiogénica) en el grupo de animales tratado con Cabergolina, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control y al grupo tratado con anti VEGF. Estos resultados son congruentes con los descritos previamente en estudios similares (Novella-Maestre et al, 2009) y apoyan el efecto antiangiogénico y de remodelado vascular ejercido por la cabergolina.

Llegados a este punto, queda pendiente demostrar la significancia biológica de los efectos antiangiogénicos de los agonistas dopaminérgicos previamente descritos. En los estudios previos publicados en modelos animales (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) se objetivó un efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos, pero al ser comparados con un grupo control, no podíamos establecer si estas diferencias eran anecdóticas o reales, ya que carecíamos de patrón de referencia con el que comparar.

Fue ésta una de las principales razones por las que se planteó la realización de este estudio; al comparar los efectos del agonista dopaminérgico Cabergolina con un compuesto estándar anti VEGF, y objetivar que los cambios que se produjeron en términos de marcadores de angiogénesis y proliferación fueron similares en ambos grupos y significativos respecto al grupo placebo, podemos afirmar que los efectos antiangiogénicos observados no son sólo estadísticamente significativos, sino biológicamente relevantes.

En este sentido, tiene importancia no sólo el realizar la comparación con un compuesto estándar anti VEGF, en nuestro caso CBO-PO11, a dosis de 0.5mg/Kg/día, sino en el uso de la mínima dosis eficaz para ejercer el máximo efecto inhibitorio de la angiogénesis, sin aparición de efectos tóxicos, similar a la empleada en estudios de cáncer (Bello et al, 2004; Kraeber-Boderé et al, 2010; Shin et al, 2005; Zilberberg et al, 2003).

En cuanto a la dosis de cabergolina, se usó igualmente la dosis óptima que se puede administrar (50 µg/kg) sin que empiecen a aparecer efectos tóxicos (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) a largo plazo; además se ha visto que administrar dosis 4 veces mayores (200 ug/kg) no produce efectos antiangiogénicos superiores a la dosis de 50 µg/kg aquí ensayada (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009).

Por tanto, una vez corroborado el efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos sobre las lesiones endometriósicas, y determinada la significancia no sólo estadística sino también biológica de estos efectos al comparar el efecto de la cabergolina con un compuesto estándar anti VEGF, queda por determinar si estos efectos descritos se traducen efectivamente en una reducción del tamaño de los implantes endometriósicos.

Durante el desarrollo del proyecto de estudio nos planteamos valorar el efecto de los compuestos sobre el tamaño de las lesiones endometriales realizando una monitorización no invasiva del tamaño de estas mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida. Tal y como habíamos previsto, la medición de las lesiones endometriales mediante callipers, técnica utilizada en los estudios previos en animales (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) no era adecuada, dado el

tamaño milimétrico de los implantes endometriósicos, la forma irregular, el diferente grado de invasión y la consistencia blanda de los mismos, características que no permitían una medición adecuada, fiable, y por tanto reproducible.

Como estimador del tamaño de la lesión disponemos, por tanto, de la cuantificación de la fluorescencia emitida por los fragmentos endometriales implantados. Tal y como se ha descrito previamente en el apartado de resultados, la emisión de fluorescencia se analizó de forma independiente para cada lesión (por grupo de tratamiento) y de forma conjunta para cada individuo (la fluorescencia media de las dos lesiones de cada individuo). En ambos casos, la variación de la fluorescencia fue similar, observándose una pendiente decreciente más marcada en los grupos de tratamiento respecto al control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas sólo al final del estudio.

Por tanto, y respondiendo al objetivo principal que nos marcábamos al inicio del proyecto, los agonistas dopaminérgicos, representados en nuestro caso por la cabergolina, ejercen un efecto reduciendo el tamaño de los implantes endometriósicos similar al producido por el compuesto anti VEGF. Postulamos que estas diferencias podrían ser más marcadas si se hubiera alargado el período de estudio.

Al plantearnos la realización de este estudio barajábamos varias hipótesis que podrían explicar la inconsistencia de los resultados en los estudios publicados en modelos animales y en humanos respecto al potencial efecto antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos. A este respecto, nos planteábamos varias opciones: que los fenómenos antiangiogénicos no se produjeran en humanos o se produjeran en menor cuantía, que se produjeran pero que no hubiera sido posible detectarlos por diferentes causas (no recuperación de todas las lesiones), o que estos fenómenos no tuvieran relevancia



biológica real al haber sido comparados sólo con un placebo, y nunca con un compuesto con probado efecto antiangiogénico.

El hecho de haber demostrado la potencia antiangiogénica de los agonistas dopaminérgicos al compararlos con un compuesto estándar anti VEGF nos permite corroborar la **relevancia significativa estadística y biológica** de estos compuestos en su efecto inhibitor de la angiogénesis en modelos animales. Esto nos lleva a sospechar que el motivo por el que no se detectaron cambios a nivel de vascularización en el estudio piloto en humanos (Gómez et al, 2011a) pudiera ser secundario a la destrucción masiva de implantes endometriósicos provocada por el tratamiento con el agonista dopaminérgico con la consiguiente falta de recuperación de las lesiones.

En este sentido, no debemos olvidar que nuestro estudio se ha realizado en un modelo animal inmunocomprometido, lo que nos ha permitido valorar el efecto antiangiogénico sin verse interferido por otros mecanismos inflamatorios e inmunes que sabemos que se encuentran asimismo implicados en la etiopatogenia, y, por tanto, tratamiento de la enfermedad. Por este mismo motivo (haber utilizado un modelo inmunocomprometido) no podemos descartar que otros posibles mecanismos de acción, fundamentalmente el papel de la inmunomodulación, hayan contribuido a la reducción de tamaño y actividad de los implantes endometriósicos en el estudio en humanos.

Podemos concluir, por tanto, que la incongruencia de los resultados obtenidos en estudios previos en modelos animales (Delgado-Rosas et al, 2011; Novella-Maestre et al, 2009) y en el estudio piloto en humanos (Gómez et al, 2011a) con respecto al efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la angiogénesis que nos llevó a plantearnos el presente estudio, podría explicarse, a la luz de los resultados obtenidos, por la



destrucción masiva de lesiones endometriales secundaria al efecto antiproliferativo y antiangiogénico de los agonistas dopaminérgicos sobre las lesiones endometriales.



## 7 CONCLUSIONES

---

1. El marcaje fluorescente y posterior implantación de tejido endometrial humano en ratones hembra inmunodeprimidos y ooforectomizados permite la reproducción de lesiones endometriósicas.
2. Las lesiones generadas son susceptibles de monitorización no invasiva y permiten la valoración de la respuesta a diferentes tratamientos.
3. La administración de un agonista dopaminérgico, la cabergolina, a animales con implantes endometriósicos produce una reducción en la vascularización y proliferación celular, así como un incremento en la madurez vascular.
4. La administración de un agonista dopaminérgico, la cabergolina, a animales con implantes endometriósicos produce un incremento en los índices de apoptosis.
5. Los efectos antiangiogénicos producidos por la cabergolina sobre los implantes endometriósicos en un modelo animal de endometriosis son similares a los producidos por el compuesto anti VEGF de referencia.
6. La acción de la cabergolina sobre los implantes endometriósicos se traduce en una reducción de su tamaño, y este efecto resulta equiparable al conseguido por el compuesto antiangiogénico.



## 8 BIBLIOGRAFÍA

---

A, B., H, F., J, M., N, P., A, P., & R, G. (2018). Evaluation of PAI-1 in endometriosis using a homologous immunocompetent mouse model. *Biology of Reproduction*, 10.1093/biolre/i0y057

Abou-Setta, A. M., Houston, B., Al-Inany, H. G., & Farquhar, C. (2013).

Levonorgestrel-releasing intrauterine device (LNG-IUD) for symptomatic endometriosis following surgery. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), CD005072. 10.1002/14651858.CD005072.pub3

Abrão, Mauricio Simões, M.D., Ph. D, Dias, J. A., M.D, Rodini, G. P., M.D, Podgaec,

Sergio, M.D., Ph.D, Bassi, M. A., M.D, & Averbach, Marcelo, M.D., Ph.D. (2010). Endometriosis at several sites, cyclic bowel symptoms, and the likelihood of the appendix being affected. *Fertility and Sterility*, 94(3), 1099-1101.

10.1016/j.fertnstert.2009.10.031 Retrieved

from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S001502820903951X>

Abrão, M. S., Dias, J. A., Rodini, G. P., Podgaec, S., Bassi, M. A., & Averbach, M.

(2010). Endometriosis at several sites, cyclic bowel symptoms, and the likelihood of the appendix being affected. *Fertility and Sterility*, 94(3), 1099-1101.

10.1016/j.fertnstert.2009.10.031

Adamson, G. D., M.D, & Pasta, D. J., M.S. (2010). Endometriosis fertility index: The

new, validated endometriosis staging system. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1609-1615. 10.1016/j.fertnstert.2009.09.035 Retrieved

from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028209037145>



Alvarez, C., Martí-Bonmatí, L., Novella-Maestre, E., Sanz, R., Gómez, R., Fernández-Sánchez, M., Pellicer, A. (2007). Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(8), 2931-2937. 10.1210/jc.2007-0409

Álvarez, C., Martí-Bonmatí, L., Novella-Maestre, E., Sanz, R., Gómez, R., Fernández-Sánchez, M., Pellicer, A. (2007). Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(8), 2931-2937. 10.1210/jc.2007-0409 Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-0409>

Armitage, J. (2007). The safety of statins in clinical practice. *Lancet (London, England)*, 370(9601), 1781-1790. 10.1016/S0140-6736(07)60716-8

Asante, A., & Taylor, R. N. (2011). Endometriosis: The role of neuroangiogenesis. *Annual Review of Physiology*, 73, 163-182. 10.1146/annurev-physiol-012110-142158

Attar, E., Tokunaga, H., Imir, G., Yilmaz, M. B., Redwine, D., Putman, M., Bulun, S. E. (2009). Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(2), 623-631. 10.1210/jc.2008-1180 Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2646521/>

Attia, G. R., Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B. R., & Bulun, S. E. (2000). Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *The*



*Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(8), 2897-2902.

10.1210/jcem.85.8.6739

Balasz, J., Creus, M., Fábregues, F., Carmona, F., Martínez-Román, S., Manau, D., & Vanrell, J. A. (1997). Pentoxifylline versus placebo in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: A pilot randomized clinical trial. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 12(9), 2046-2050.

Banerjee, S. K., Ballard, K. D., & Wright, J. T. (2008). Endometriomas as a marker of disease severity. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 15(5), 538-540.

10.1016/j.jmig.2008.05.004 Retrieved from [https://www.jmig.org/article/S1553-4650\(08\)00215-X/abstract](https://www.jmig.org/article/S1553-4650(08)00215-X/abstract)

Barbeito, C. G., & Andrés Laube, P. F. *Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas.* &nbsp;

Barbieri, R. L. (1990). Etiology and epidemiology of endometriosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 162(2), 565-567. 10.1016/0002-9378(90)90430-F Retrieved from [https://www.ajog.org/article/0002-9378\(90\)90430-F/fulltext](https://www.ajog.org/article/0002-9378(90)90430-F/fulltext)

Barbieri, R. L., Niloff, J. M., Bast, R. C., Schaeztl, E., Kistner, R. W., & Knapp, R. C. (1986). Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis. *Fertility and Sterility*, 45(5), 630-634. 10.1016/S0015-0282(16)49333-7 Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028216493337>

Basini, G., Bianco, F., & Grasselli, F. (2005). EGCG, a major component of green tea, inhibits VEGF production by swine granulosa cells. *BioFactors (Oxford, England)*, 23(1), 25-33.



- Basu, S., Nagy, J. A., Pal, S., Vasile, E., Eckelhoefer, I. A., Bliss, V. S., Mukhopadhyay, D. (2001). The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine*, 7(5), 569-574. 10.1038/87895
- Batzer, F. R. (2006). GnRH analogs: Options for endometriosis-associated pain treatment. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 13(6), 539-545. 10.1016/j.jmig.2006.07.007
- Bazot, M., Detchev, R., Cortez, A., Amouyal, P., Uzan, S., & Daraï, E. (2003). Transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography for the assessment of pelvic endometriosis: A preliminary comparison. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(8), 1686-1692.
- Becker, C. M., Wright, R. D., Satchi-Fainaro, R., Funakoshi, T., Folkman, J., Kung, A. L., & D'Amato, R. J. (2006). A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *The American Journal of Pathology*, 168(6), 2074-2084. 10.2353/ajpath.2006.051133
- Berne R.M, Levy M.N, Koeppen B.M, Stanton.B.A. Physiology. 4<sup>a</sup> ed. Mosby. 1998.
- Bergqvist, A., Ljungberg, O., & Myhre, E. (1984). Human endometrium and endometriotic tissue obtained simultaneously: A comparative histological study. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 3(2), 135-145.
- Black, D. M., Delmas, P. D., Eastell, R., Reid, I. R., Boonen, S., Cauley, J. A., HORIZON Pivotal Fracture Trial. (2007). Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of*



*Medicine*, 356(18), 1809-1822. 10.1056/NEJMoa067312 Retrieved  
from <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/356/18/1809>

- Blumenthal, N. J. (1981). Umbilical endometriosis. A case report. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 59(6), 198-199.
- Bonte, H., Chapron, C., Vieira, M., Fauconnier, A., Barakat, H., Fritel, X., Dubuisson, J. (2002). Histologic appearance of endometriosis infiltrating uterosacral ligaments in women with painful symptoms. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 9(4), 519-524.
- Borghese, B., Santulli, P., Streuli, I., Lafay-Pillet, M. -, de Ziegler, D., & Chapron, C. (2014). [Recurrence of pain after surgery for deeply infiltrating endometriosis: How does it happen? how to manage?]. *Journal De Gynecologie, Obstetrique Et Biologie De La Reproduction*, 43(1), 12-18. 10.1016/j.jgyn.2012.11.009
- Bourlev, V., Volkov, N., Pavlovitch, S., Lets, N., Larsson, A., & Olovsson, M. (2006). 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 (Cambridge, England)*, 132(3), 501-509. 10.1530/rep.1.01110
- Boyle, D. P., & McCluggage, W. G. (2009). Peritoneal stromal endometriosis: A detailed morphological analysis of a large series of cases of a common and under-recognised form of endometriosis. *Journal of Clinical Pathology*, 62(6), 530-533. 10.1136/jcp.2008.064261 Retrieved from <http://jcp.bmj.com/content/62/6/530>
- Bruner-Tran, K. L., Osteen, K. G., & Duleba, A. J. (2009). Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *The Journal of Clinical*



- Endocrinology & Metabolism*, 94(7), 2489-2494. 10.1210/jc.2008-2802 Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2008-2802>
- Bulun, S. E. (2009a). Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 360(3), 268-279. 10.1056/NEJMra0804690 Retrieved from <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804690>
- Bulun, S. E. (2009b). Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, 360(3), 268-279. 10.1056/NEJMra0804690
- Bulun, S. E., Cheng, Y., Yin, P., Imir, G., Utsunomiya, H., Attar, E., Julie Kim, J. (2006). Progesterone resistance in endometriosis: Link to failure to metabolize estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1-2), 94-103. 10.1016/j.mce.2005.11.041
- Bulun, S. E., Gurates, B., Fang, Z., Tamura, M., Sebastian, S., Zhou, J., Yang, S. (2002). Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology*, 55(1-2), 21-33.
- Bunzow, J. R., Van Tol, H. H., Grandy, D. K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Civelli, O. (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336(6201), 783-787. 10.1038/336783a0
- Burney, R. O., & Giudice, L. C. (2012). Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(3), 511-519. 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029
- Busso, C., Fernández-Sánchez, M., García-Velasco, J. A., Landeras, J., Ballesteros, A., Muñoz, E., Pellicer, A. (2010). The non-ergot derived dopamine agonist quinagolide in prevention of early ovarian hyperstimulation syndrome in IVF



patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Human*

*Reproduction (Oxford, England)*, 25(4), 995-1004. 10.1093/humrep/deq005

Buzdar, A. U. (2004). The ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial:

An update. *Clinical Breast Cancer*, 5 Suppl 1, S12.

Cakmak, H., Basar, M., Seval-Celik, Y., Osteen, K. G., Duleba, A. J., Taylor, H. S.,

Arıcı, A. (2012). Statins inhibit monocyte chemotactic protein 1 expression in endometriosis. *Reproductive Sciences*, 19(6), 572-579.

10.1177/1933719111430998 Retrieved

from <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1933719111430998>

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature*

*Medicine*, 6(4), 389-395. 10.1038/74651

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. *Journal of Spinal Disorders & Techniques*, 24(7), 474-478.

10.1097/BSD.0b013e31820fc53b

Ceccaroni, M., Clarizia, R., Roviglione, G., Bruni, F., Ruffo, G., Peters, I., Minelli, L.

(2010). Deep rectal and parametrial infiltrating endometriosis with monolateral pudendal nerve involvement: Case report and laparoscopic nerve-sparing

approach. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive*

*Biology*, 153(2), 227-229. 10.1016/j.ejogrb.2010.07.032

Celik, O., Hascalik, S., Elter, K., Tagluk, M. E., Gurates, B., & Aydin, N. E. (2008).

Combating endometriosis by blocking proteasome and nuclear factor- $\kappa$ B

pathways. *Human Reproduction*, 23(11), 2458-2465. 10.1093/humrep/den246



- Chapro, C., Fauconnier, A., Dubuisson, J. B., Vieira, M., Bonte, H., & Vacher-Lavenu, M. C. (2001). Does deep endometriosis infiltrating the uterosacral ligaments present an asymmetric lateral distribution? *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 108(10), 1021-1024.
- Chapron, C., Chiodo, I., Leconte, M., Amsellem-Ouazana, D., Chopin, N., Borghese, B., & Dousset, B. (2010). Severe ureteral endometriosis: The intrinsic type is not so rare after complete surgical exeresis of deep endometriotic lesions. *Fertility and Sterility*, 93(7), 2115-2120. 10.1016/j.fertnstert.2009.01.102
- Chapron, C., & Dubuisson, J. (2001). Management of deep endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 943(1), 276-280. 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03808.x Retrieved from <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03808.x>
- Chapron, C., Dubuisson, J., Pansini, V., Vieira, M., Fauconnier, A., Barakat, H., & Dousset, B. (2002). Routine clinical examination is not sufficient for diagnosing and locating deeply infiltrating endometriosis. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 9(2), 115-119.
- Chapron, C., Fauconnier, A., Dubuisson, J., Barakat, H., Vieira, M., & Bréart, G. (2003). Deep infiltrating endometriosis: Relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(4), 760-766.
- Chapron, C., Fauconnier, A., Dubuisson, J., Vieira, M., Bonte, H., & Vacher-Lavenu, M. (2001). Does deep endometriosis infiltrating the uterosacral ligaments present



an asymmetric lateral distribution? *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 108(10), 1021-1024. 10.1016/S0306-5456(01)00236-4 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306545601002364>

Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., Rajput-Williams, J., Burch, D., Schofield, J. P., Fountain, S. A., Smith, S. K. (1993). Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biology of Reproduction*, 48(5), 1120-1128.

Chen, D. B., Yang, Z. M., Hilsenrath, R., Le, S. P., & Harper, M. J. (1995). Stimulation of prostaglandin (PG) F2 alpha and PGE2 release by tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha in cultured human luteal phase endometrial cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(10), 2773-2780.

Cheng, C., Licence, D., Cook, E., Luo, F., Arends, M. J., Smith, S. K., Charnock-Jones, D. S. (2011). Activation of mutated K-ras in donor endometrial epithelium and stroma promotes lesion growth in an intact immunocompetent murine model of endometriosis. *The Journal of Pathology*, 224(2), 261-269. 10.1002/path.2852

Cho, M. K., Kim, C. H., & Oh, S. T. (2009). Endometriosis in a patient with rokitansky-kuster-hauser syndrome. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 35(5), 994-996. 10.1111/j.1447-0756.2009.01025.x

Chwalisz, K., Lee, M., Elger, W., Edmonds, A., & Mattia-Goldberg, C. (2004). Treatment of endometriosis with the novel selective progesterone receptor modulator (SPRM) asoprisnil. *Fertility and Sterility*, 82, S84.



10.1016/j.fertnstert.2004.07.212 Retrieved

from [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(04\)01512-2/abstract](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(04)01512-2/abstract)

Chwalisz, K., Perez, M. C., DeManno, D., Winkel, C., Schubert, G., & Elger, W. (2005). Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocrine Reviews*, 26(3), 423-438.

10.1210/er.2005-0001 Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/er.2005-0001>

Cirillo, F., Vismarra, M., Buononato, M., Magnani, E., Vergoni, F., & Martinotti, M. (2008). Endometriosis of the caecum and ileo-caecal valve. A case report and review of the literature. *Chirurgia Italiana*, 60(4), 603-606.

Coffee, A. L., Sulak, P. J., & Kuehl, T. J. (2007). Long-term assessment of symptomatology and satisfaction of an extended oral contraceptive regimen.

*Contraception*, 75(6), 444-449. 10.1016/j.contraception.2007.01.014

Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J. J., Feder, J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(5), 1470-1478. 10.1172/JCII14322 Retrieved

from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2478587>

Creus, M., Fábregues, F., Carmona, F., del Pino, M., Manau, D., & Balasch, J. (2008).

Combined laparoscopic surgery and pentoxifylline therapy for treatment of endometriosis-associated infertility: A preliminary trial. *Human*

*Reproduction*, 23(8), 1910-1916. 10.1093/humrep/den167 Retrieved

from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487215>



- Crispi, C. P., de Souza, Caroline Alexandra Pereira, Oliveira, M. A. P., Dibi, R. P., Cardeman, L., Sato, H., & Schor, E. (2012). Endometriosis of the round ligament of the uterus. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, *19*(1), 46-51.  
10.1016/j.jmig.2011.09.006
- Crosignani, P., Olive, D., Bergqvist, A., & Luciano, A. (2006). Advances in the management of endometriosis: An update for clinicians. *Human Reproduction Update*, *12*(2), 179-189. 10.1093/humupd/dmi049 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280355>
- Cullen, T. S. (1896). Adenomyoma of the round ligament. *Bull John Hopkins Hosp*, *7*, 112.
- Dadhwal, V., Deka, D., Mathur, S., Kaushal, S., Sharma, A. K., & Mittal, S. (2012). Vaginal polypoid endometriosis simulating neoplasia in a young woman. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, *16*(3), 318-321. 10.1097/LGT.0b013e318241052b
- Daftary, G. S., & Taylor, H. S. (2004). EMX2 gene expression in the female reproductive tract and aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(5), 2390-2396. 10.1210/jc.2003-031389
- Danenberg, H. D., Fishbein, I., Gao, J., Monkkonen, J., Reich, R., Gati, I., Golomb, G. (2002). Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation*, *106*(5), 599-605. 10.1161/01.CIR.0000023532.98469.48 Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/106/5/599>



de Santiago, J., Carmona, F., García, J. A., López, A., Martínez, M. Á., & Martínez, B. (2014). *DOCUMENTOS DE CONSENSO SEGO: Endometriosis* (Jun 2015 ed.)

de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., & Williams, L. T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5047), 989-991.

Delgado-Rosas, F., Gómez, R., Ferrero, H., Gaytan, F., Garcia-Velasco, J., Simón, C., & Pellicer, A. (2011). The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(5), 745-755. 10.1530/REP-11-0223

Den Hondt, M., Vanaudenaerde, B., & Vranckx, J. J. (2017a). Abstract. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*, 5, 8.  
10.1097/01.GOX.0000512411.04866.52 Retrieved  
from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295134/>

Den Hondt, M., Vanaudenaerde, B., & Vranckx, J. J. (2017b). Abstract. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*, 5, 8.  
10.1097/01.GOX.0000512411.04866.52 Retrieved  
from <https://www.jci.org/articles/view/117461>

Den Hondt, M., Vanaudenaerde, B., & Vranckx, J. J. (2017c). Abstract. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*, 5, 8.  
10.1097/01.GOX.0000512411.04866.52 Retrieved  
from <https://www.jci.org/articles/view/117461>

D'Hooghe, T. M., Bamba, C. S., Raeymaekers, B. M., De Jonge, I., Lauweryns, J. M., & Koninckx, P. R. (1995). Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes



- endometriosis in baboons (*papio cynocephalus* and *papio anubis*). *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(1), 125-134.
- Dmowski, W. P., & Radwanska, E. (1984). Current concepts on pathology, histogenesis and etiology of endometriosis. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica. Supplement*, 123, 29-33.
- Donnez, J., Nisolle, M., & Casanas-Roux, F. (1992). Three-dimensional architectures of peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility*, 57(5), 980-983.
- Donnez, J., Smoes, P., Gillerot, S., Casanas-Roux, F., & Nisolle, M. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(6), 1686-1690.
- Donnez, J., Spada, F., Squifflet, J., & Nisolle, M. (2000). Bladder endometriosis must be considered as bladder adenomyosis. *Fertility and Sterility*, 74(6), 1175-1181.  
10.1016/S0015-0282(00)01584-3 Retrieved  
from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028200015843>
- Duffy, J. M. N., Arambage, K., Correa, F. J. S., Olive, D., Farquhar, C., Garry, R., Jacobson, T. Z. (2014). Laparoscopic surgery for endometriosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), CD011031. Retrieved  
from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696265>
- Dunselman, G. A., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., Bie, B. D., Nelen, W L D M. (2014). ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Human Reproduction*, 29(3), 400-412. 10.1093/humrep/det457  
Retrieved



from <http://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:repository.ubn.ru.nl:2066%2F137859>

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., & Dvorak, A. M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 146(5), 1029-1039. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1869291/>

El-Mahgoub, S., & Yaseen, S. (1980). A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 137(1), 137-140. 10.1016/0002-9378(80)90399-3 Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002937880903993>

Epstein, H., Berger, V., Levi, I., Eisenberg, G., Koroukhov, N., Gao, J., & Golomb, G. (2007). Nanosuspensions of alendronate with gallium or gadolinium attenuate neointimal hyperplasia in rats. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 117(3), 322-332. 10.1016/j.jconrel.2006.10.030

Etminan, M., Forooghian, F., & Maberley, D. (2009). Inflammatory ocular adverse events with the use of oral bisphosphonates: A retrospective cohort study. *Canadian Medical Association Journal*, , 127-143. 10.1007/978-3-540-79527-8\_15

Exacoustos, C., Manganaro, L., & Zupi, E. (2014). Imaging for the evaluation of endometriosis and adenomyosis. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 28(5), 655-681. 10.1016/j.bpobgyn.2014.04.010



- Fassina, G., Venè, R., Morini, M., Minghelli, S., Benelli, R., Noonan, D. M., & Albini, A. (2004). Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(14), 4865-4873. 10.1158/1078-0432.CCR-03-0672
- Fedele, L., & Berlanda, N. (2004). Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 9(1), 167-177. 10.1517/eoed.9.1.167.32945
- Fedele, L., Bianchi, S., Zanconato, G., Portuese, A., & Raffaelli, R. (2001). Use of a levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertility and Sterility*, 75(3), 485-488. 10.1016/S0015-0282(00)01759-3 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028200017593>
- Fernández-Rey, C. L., Alvarez-González, S. A., Díaz-Solís, P., Blanco-González, A., & Costilla-García, S. (2009). Small bowel obstruction secondary to ileal endometriosis: Multisection computer tomography evaluation. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas: Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Patologia Digestiva*, 101(12), 872-874.
- Ferrara, N. (1999). Vascular endothelial growth factor: Molecular and biological aspects. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 237, 1-30.
- Ferrara, N., & Henzel, W. J. (1989a). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2), 851-858.



- Ferrara, N., & Henzel, W. J. (1989b). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2), 851-858.
- Ferrara, N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: Therapeutic implications. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 10-14. 10.1053/sonc.2002.37264
- Ferrero, H., García-Pascual, C. M., Pellicer, N., Simón, C., Pellicer, A., & Gómez, R. (2015). Dopamine agonist inhibits vascular endothelial growth factor protein production and secretion in granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13, 104. 10.1186/s12958-015-0102-4 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26377185>
- Folkman, J. (2002a). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 15-18. 10.1053/sonc.2002.37263
- Folkman, J. (2002b). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 15-18. 10.1053/sonc.2002.37263
- Folkman, J., & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*, 57(1), 1-18. 10.1146/annurev.med.57.121304.131306 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409133>
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., & Breitman, M. L. (1995). Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), 66-70. 10.1038/376066a0
- Fong, T. A., Shawver, L. K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T. J., McMahon, G. (1999). SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial



growth factor receptor (flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Research*, 59(1), 99-106.

Fortin, M., Lépine, M., Merlen, Y., Thibeault, I., Rancourt, C., Gosselin, D., Steff, A. (2004). Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of endometriosis. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 9(4), 540-547.  
10.1016/j.ymthe.2003.12.012

Fortin, M., Lépine, M., Pagé, M., Osteen, K., Massie, B., Hugo, P., & Steff, A. M. (2003). An improved mouse model for endometriosis allows noninvasive assessment of lesion implantation and development. *Fertility and Sterility*, 80 Suppl 2, 832-838.

Françoise Kraeber-Bodéré, Caroline Bodet-Milin, Colin Niaudet, Catherine Sai-Maurel, Anne Moreau, Alain Faivre-Chauvet, François Paris. (2010). Comparative toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy in carcinoembryonic antigen-expressing medullary thyroid cancer xenograft. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(4), 624-631. 10.2967/jnumed.109.070714 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351352>

García Manero, M., López García, G., Alcázar Zambrano, J. L., Aubá, M., & Olartecoechea, B. (2009). Angiogenesis y Endometriosis. *Revista de medicina*, N° 2, 2009, pags. 8-13, 53(2), 8-13. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=3663970>



García-Velasco J.A, Rízt B. Endometriosis: tratamiento actual y futuras tendencias.

Panamá. Jaypee-Highlights. 2010. Pp. 272-274.

Gargett, C., Weston, G., & Rogers, P. (2002a). Mechanisms and regulations of endometrial angiogenesis. *Reproductive Medicine Review*, 10(1), 45-61.

10.1017/S0962279902000133 Retrieved

from <https://www.cambridge.org/core/journals/reproductive-medicine-review/article/mechanisms-and-regulations-of-endometrial-angiogenesis/B3E2A41437BD859BAF3BE1BF58352CF6>

Gargett, C., Weston, G., & Rogers, P. a. W. (2002b). Mechanisms and regulations of endometrial angiogenesis. *Reproductive Medicine Review*, 10(1), 45-61.

10.1017/S0962279902000133 Retrieved

from <https://www.cambridge.org/core/journals/reproductive-medicine-review/article/mechanisms-and-regulations-of-endometrial-angiogenesis/B3E2A41437BD859BAF3BE1BF58352CF6>

Garrido, N., Navarro, J., Remohí, J., Simón, C., & Pellicer, A. (2000). Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Human Reproduction Update*, 6(1), 67-74.

Gille, H., Kowalski, J., Yu, L., Chen, H., Pisabarro, M. T., Davis-Smyth, T., & Ferrara, N. (2000). A repressor sequence in the juxtamembrane domain of flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *The EMBO Journal*, 19(15), 4064-4073. 10.1093/emboj/19.15.4064



Giudice, L. C., Evers, J. L. H., & Healy, D. L. (2012). *Collège national des gynécologues et obstétriciens français CNGOF guidelines for the management of endometriosis* (1. Aufl. ed.). Somerset: Wiley-Blackwell. Retrieved from [http://ebooks.ciando.com/book/index.cfm/bok\\_id/489199](http://ebooks.ciando.com/book/index.cfm/bok_id/489199)

Gómez, R., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2003). 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. *Biology of Reproduction*, 68(6), 2164-2171. 10.1095/biolreprod.102.010801

Gómez, R., Abad, A., Delgado, F., Tamarit, S., Simón, C., & Pellicer, A. (2011a). Effects of hyperprolactinemia treatment with the dopamine agonist quinagolide on endometriotic lesions in patients with endometriosis-associated hyperprolactinemia. *Fertility and Sterility*, 95(3), 888.e1. 10.1016/j.fertnstert.2010.10.024

Gómez, R., Ferrero, H., Delgado-Rosas, F., Gaytan, M., Morales, C., Zimmermann, R. C., Pellicer, A. (2011b). Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: Implications for OHSS development and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(8), 2484-2492. 10.1210/jc.2011-0075

Gómez, R., Gonzalez-Izquierdo, M., Zimmermann, R. C., Novella-Maestre, E., Alonso-Muriel, I., Sanchez-Criado, J., Pellicer, A. (2006). 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*, 147(11), 5400-5411. 10.1210/en.2006-0657

Gómez, R., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2002). Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*, 143(11), 4339-4348. 10.1210/en.2002-220204

Graham, D. Y., & Malaty, H. M. (2001). Alendronate and naproxen are synergistic for development of gastric ulcers. *Archives of Internal Medicine*, 161(1), 107-110.

Graham, D. Y., Malaty, H. M., & Goodgame, R. (1997). Primary amino-bisphosphonates: A new class of gastrotoxic drugs--comparison of alendronate and aspirin. *The American Journal of Gastroenterology*, 92(8), 1322-1325.

Greenberg, L. H., & Slayden, O. D. (2004). Human endometriotic xenografts in immunodeficient RAG-2/gamma(c)KO mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(6), 1796. 10.1016/j.ajog.2004.02.047

Griffioen, A. W., & Molema, G. (2000). Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, 52(2), 237-268.

Grümmer, R., Schwarzer, F., Bainsczyk, K., Hess-Stumpp, H., Regidor, P. A., Schindler, A. E., & Winterhager, E. (2001). Peritoneal endometriosis: Validation of an in-vivo model. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(8), 1736-1743.

Guo, S. (2007). Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): An unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 63(2), 71-97. 10.1159/000096047



- Guo, S. (2009). Recurrence of endometriosis and its control. *Human Reproduction Update*, 15(4), 441-461. 10.1093/humupd/dmp007 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279046>
- Haas, D., M.D, Chvatal, R., M.D, Habelsberger, A., M.D, Wurm, P., M.D, Schimetta, W., Ph.D, & Oppelt, P., M.D. (2011). Comparison of revised american fertility society and ENZIAN staging: A critical evaluation of classifications of endometriosis on the basis of our patient population. *Fertility and Sterility*, 95(5), 1574-1578. 10.1016/j.fertnstert.2011.01.135 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028211001695>
- Haber, E., Danenberg, H. D., Koroukhov, N., Ron-El, R., Golomb, G., & Schachter, M. (2009). Peritoneal macrophage depletion by liposomal bisphosphonate attenuates endometriosis in the rat model. *Human Reproduction*, 24(2), 398-407. 10.1093/humrep/den375 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948309>
- Hadfield, R. M., Mardon, H. J., Barlow, D. H., & Kennedy, S. H. (1997). Endometriosis in monozygotic twins. *Fertility and Sterility*, 68(5), 941-942.
- Halban, J. (1924). Metastasic histeroadenosis. *Wiwn Klin Wochenschr*, 37, 1205-1206.
- Hambrick, E., Abcarian, H., & Smith, D. (1979). Perineal endometrioma in episiotomy incisions: Clinical features and management. *Diseases of the Colon and Rectum*, 22(8), 550-552.
- Harada, T., Iwabe, T., & Terakawa, N. (2001). Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and Sterility*, 76(1), 1-10.



- Harada, T., M.D, Momoeda, M., M.D, Taketani, Y., MD, Hoshiai, H., M.D, & Terakawa, N., M.D. (2008). Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1583-1588. 10.1016/j.fertnstert.2007.08.051 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028207033948>
- Healy, D. L., Rogers, P. A., Hii, L., & Wingfield, M. (1998). Angiogenesis: A new theory for endometriosis. *Human Reproduction Update*, 4(5), 736-740.
- Helen L Henderson, Julie Townsend, & Domingo J Tortones. (2008). Direct effects of prolactin and dopamine on the gonadotroph response to GnRH. *Journal of Endocrinology*, 197(2), 343-350. 10.1677/JOE-07-0536 Retrieved from <http://joe.endocrinology-journals.org/content/197/2/343.abstract>
- Heryanto, B., Lipson, K. E., & Rogers, P. a. W. (2003). Effect of angiogenesis inhibitors on oestrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. *Reproduction (Cambridge, England)*, 125(3), 337-346.
- Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(5), 1011-1027. 10.1200/JCO.2005.06.081
- Hock, D. L., Sharafi, K., Dagostino, L., Kemmann, E., & Seifer, D. B. (2001). Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *The Journal of Reproductive Medicine*, 46(1), 7-10.



- Honoré, G. M. (1999). Extrapelvic endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 42(3), 699. Retrieved from [https://journals.lww.com/clinicalobgyn/Citation/1999/09000/Extrapelvic\\_Endometriosis.21.aspx](https://journals.lww.com/clinicalobgyn/Citation/1999/09000/Extrapelvic_Endometriosis.21.aspx)
- Hoshiai, H., Ishikawa, M., Sawatari, Y., Noda, K., & Fukaya, T. (1993). Laparoscopic evaluation of the onset and progression of endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 169(3), 714-719.
- Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., & Leung, D. W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(12), 1806-1814. 10.1210/mend-5-12-1806
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., & Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 26031-26037.
- Howard, F. M. (2009). Endometriosis and mechanisms of pelvic pain. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 16(5), 540-550. 10.1016/j.jmig.2009.06.017
- Hughesdon, P. E. (1957). The structure of endometrial cysts of the ovary. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Empire*, 64(4), 481-487.
- Hull, M. L., Charnock-Jones, D. S., Chan, C. L. K., Bruner-Tran, K. L., Osteen, K. G., Tom, B. D. M., Smith, S. K. (2003). Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(6), 2889-2899. 10.1210/jc.2002-021912



- Jelenc, F., Ribič-Pucelj, M., Juvan, R., Kobal, B., Sinkovec, J., & Salamun, V. (2012). Laparoscopic rectal resection of deep infiltrating endometriosis. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques. Part A*, 22(1), 66-69.  
10.1089/lap.2011.0307
- Jenkins, S., Olive, D. L., & Haney, A. F. (1986a). Endometriosis: Pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstetrics and Gynecology*, 67(3), 335-338.
- Jenkins, S., Olive, D. L., & Haney, A. F. (1986b). Endometriosis: Pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstetrics and Gynecology*, 67(3), 335-338.
- Jones, R. K., Searle, R. F., & Bulmer, J. N. (1998). Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(12), 3496-3502.
- Jubanyik, K. J., & Comite, F. (1997). Extrapelvic endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 24(2), 411-440. 10.1016/S0889-8545(05)70311-9 Retrieved from [https://www.obgyn.theclinics.com/article/S0889-8545\(05\)70311-9/abstract](https://www.obgyn.theclinics.com/article/S0889-8545(05)70311-9/abstract)
- Kajihara, H., Yamada, Y., Kanayama, S., Furukawa, N., Noguchi, T., Haruta, S., Kobayashi, H. (2011). New insights into the pathophysiology of endometriosis: From chronic inflammation to danger signal. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 27(2), 73-79. 10.3109/09513590.2010.507292
- Kashani, A., Phillips, C. O., Foody, J. M., Wang, Y., Mangalmurti, S., Ko, D. T., & Krumholz, H. M. (2006). Risks associated with statin therapy: A systematic



overview of randomized clinical trials. *Circulation*, 114(25), 2788-2797.

10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624890 Retrieved

from <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/114/25/2788>

Kebabian, J. W., & Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for

dopamine. *Nature*, 277(5692), 93-96.

Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., & Connolly, D. T.

(1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to

PDGF. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4935), 1309-1312.

Keettel, W. C., & Stein, R. J. (1951). The viability of the cast-off menstrual

endometrium. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 61(2), 440-442.

10.1016/0002-9378(51)90266-9 Retrieved from [http://www.ajog.org/article/0002-](http://www.ajog.org/article/0002-9378(51)90266-9)

[9378\(51\)90266-9/abstract](http://www.ajog.org/article/0002-9378(51)90266-9)

Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R.,

Saridogan, E. (2005a). ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of

endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(10), 2698-2704.

10.1093/humrep/dei135 Retrieved

from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980014>

Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R.,

Saridogan, E. (2005b). ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of

endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(10), 2698-2704.

10.1093/humrep/dei135 Retrieved

from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980014>



- Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D. W., Ebeling, P. R., Felsenberg, D., Shane, E. (2007). Bisphosphonate-Associated osteonecrosis of the jaw: Report of a task force of the american society for bone and mineral research. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(10), 1479-1491. 10.1359/jbmr.0707onj Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1359/jbmr.0707onj>
- Kikuchi, I., Takeuchi, H., Kuwatsuru, R., Kitade, M., Kumakiri, J., Kuroda, K., & Takeda, S. (2009). A novel technique using magnetic resonance imaging jelly for evaluation&nbsp; of rectovaginal endometriosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 29(2), 365-370. 10.1002/jmri.21618 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161189>
- King, S. S., Campbell, A. G., Dille, E. A., Roser, J. F., Murphy, L. L., & Jones, K. L. (2005). Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domestic Animal Endocrinology*, 28(4), 405-415. 10.1016/j.domaniend.2005.02.001
- Kitawaki, J., Kado, N., Ishihara, H., Koshiba, H., Kitaoka, Y., & Honjo, H. (2002). Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83(1-5), 149-155.
- Koks, C. A., Dunselman, G. A., de Goeij, A. F., Arends, J. W., & Evers, J. L. (1997). Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertility and Sterility*, 68(3), 560-564.
- Koninckx, P. R., Kennedy, S. H., & Barlow, D. H. (1998). Endometriotic disease: The role of peritoneal fluid. *Human Reproduction Update*, 4(5), 741-751.



- Koninckx, P. R., & Martin, D. C. (1992). Deep endometriosis: A consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertility and Sterility*, 58(5), 924-928.
- Koninckx, P. R., Meuleman, C., Demeyere, S., Lesaffre, E., & Cornillie, F. J. (1991). Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertility and Sterility*, 55(4), 759-765.
- Kovoor, E., Nassif, J., Miranda-Mendoza, I., & Wattiez, A. (2010). Endometriosis of bladder: Outcomes after laparoscopic surgery. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 17(5), 600-604. 10.1016/j.jmig.2010.05.008
- Kressin, P., Wolber, E. M., Wodrich, H., Meyhöfer-Malik, A., Buchweitz, O., Diedrich, K., & Malik, E. (2001). Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium. *Fertility and Sterility*, 76(6), 1220-1224.
- Kuohung, W., Jones, G. L., Vitonis, A. F., Cramer, D. W., Kennedy, S. H., Thomas, D., & Hornstein, M. D. (2002). Characteristics of patients with endometriosis in the united states and the united kingdom. *Fertility and Sterility*, 78(4), 767-772.
- Küpker, W., Felberbaum, R. E., Krapp, M., Schill, T., Malik, E., & Diedrich, K. (2002). Use of GnRH antagonists in the treatment of endometriosis. *Reproductive Biomedicine Online*, 5(1), 12-16.
- Kyama, C. M., Overbergh, L., Debrock, S., Valckx, D., Vander Perre, S., Meuleman, C., D'Hooghe, T. M. (2006). Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in



women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 85(6), 1667-1675.

10.1016/j.fertnstert.2005.11.060

Lama Herrera, C., Martín Jiménez, Á, Schneider Fontan, Bodega Frías, A., Carmona Herrera, F., Raga Baixauli, F., Castaño Castaño, H. (2013). *Guía de atención a las mujeres con endometriosis en el SNS*. Spain:10.1056/NEJMra0804690 Retrieved from <http://publicacionesoficiales.boe.es>

Lama, C., Martín, Á, Bodega, A., Carmona, F., Raga, F., Vieitez, M., Castaño, H. (2013). *Guía de atención a las mujeres con endometriosis en el sistema nacional de salud*. Madrid: Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad.

Larsen, W. J. (1993). *Human embriology*. England: Churchil Livingstone.

Laschke, M. W., & Menger, M. D. (2007a). In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Human Reproduction Update*, 13(4), 331-342. 10.1093/humupd/dmm006

Laschke, M. W., & Menger, M. D. (2007b). In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Human Reproduction Update*, 13(4), 331-342. 10.1093/humupd/dmm006

Lecarpentier, E., Morel, O., Fournier, T., Elefant, E., Chavatte-Palmer, P., & Tsatsaris, V. (2012). Statins and pregnancy: Between supposed risks and theoretical benefits. *Drugs*, 72(6), 773-788. 10.2165/11632010-000000000-00000

Levander, G., & Normann, P. (1955). The pathogenesis of endometriosis an experimental study. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 34(4), 366-398. 10.3109/00016345509158287 Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00016345509158287>



Levy, S., Fayez, I., Taguchi, N., Han, J., Aiello, J., Matsui, D., Ito, S. (2009). Pregnancy outcome following in utero exposure to bisphosphonates. *Bone*, 44(3), 428-430.

10.1016/j.bone.2008.11.001

Li, J., Shi, Y., Zhou, C., & Lin, J. (2015). Diagnosis and treatment of perineal endometriosis: Review of 17 cases. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 292(6),

1295-1299. 10.1007/s00404-015-3756-4

Lior Zilberberg, Svetlana Shinkaruk, Olivier Lequin, Benoit Rousseau, Martin

Hagedorn, Francesco Costa, Andreas Bikfalvi. (2003). Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35564-35573.

10.1074/jbc.M304435200 Retrieved

from <http://www.jbc.org/content/278/37/35564.abstract>

Lorenzo Bello, Valeria Lucini, Francesco Costa, Mauro Pluderi, Carlo Giussani,

Francesco Acerbi, Andreas Bikfalvi. (2004). Combinatorial administration of molecules that simultaneously inhibit angiogenesis and invasion leads to increased therapeutic efficacy in mouse models of malignant glioma. *Clinical Cancer Research*, 10(13), 4527-4537. 10.1158/1078-0432.CCR-04-0194 Retrieved

from <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/13/4527.abstract>

Lucidi, R. S., Witz, C. A., Chrisco, M., Binkley, P. A., Shain, S. A., & Schenken, R. S.

(2005). A novel in vitro model of the early endometriotic lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells. *Fertility and Sterility*, 84(1), 16-21.

10.1016/j.fertnstert.2004.10.058 Retrieved

from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028205006643>



- Maas, J. W., Calhaz-Jorge, C., ter Riet, G., Dunselman, G. A., de Goeij, A. F., & Struijker-Boudier, H. A. (2001). 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. *Fertility and Sterility*, 75(1), 180-185.
- Machado, D. E., M. Sc, Abrao, Mauricio Simões, M.D., Ph.D, Berardo, Plínio Tostes, M.D., Ph.D, Takiya, Christina Maeda, M.D., Ph.D, & Nasciutti, L. E., Ph.D. (2008). 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. *Fertility and Sterility*, 90(1), 148-155. 10.1016/j.fertnstert.2007.05.076 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028207012356>
- Machairiotis, N., Stylianaki, A., Dryllis, G., Zarogoulidis, P., Kouroutou, P., Tsiamis, N., Machairiotis, C. (2013). Extrapelvic endometriosis: A rare entity or an under diagnosed condition? *Diagnostic Pathology*, 8, 194. 10.1186/1746-1596-8-194 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294950>
- Mahmood, T. A., & Templeton, A. (1991). Prevalence and genesis of endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 6(4), 544-549.
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J. H., Bunzow, J. R., Civelli, O., Akil, H., & Watson, S. J. (1990). Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: An in situ hybridization- receptor autoradiographic analysis. *Journal of Neuroscience*, 10(8), 2587. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/10/8/2587>



- Mansour, G., M.D, Aziz, N., M.D, Sharma, R., Ph. D, Falcone, T., M.D, Goldberg, J., M.D, & Agarwal, Ashok, Ph.D., H.C.L.D. (2009). The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 92(1), 61-67. 10.1016/j.fertnstert.2008.05.048 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S001502820801159X>
- Mansour, G., M.D, Sharma, R. K., Ph. D, Agarwal, A., Ph.D, & Falcone, T., M.D. (2010). Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: A possible cause of infertility. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1894-1899. 10.1016/j.fertnstert.2009.09.043 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028209037923>
- Matsuura-Sawada, R., Murakami, T., Ozawa, Y., Nabeshima, H., Akahira, J., Sato, Y., Okamura, K. (2005). Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(6), 1477-1484. 10.1093/humrep/deh783
- Matsuzaki, S., Canis, M., Pouly, J., Wattiez, A., Okamura, K., & Mage, G. (2004). Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertility and Sterility*, 82(5), 1309-1315. 10.1016/j.fertnstert.2004.03.059 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028204022289>
- May, K. E., Villar, J., Kirtley, S., Kennedy, S. H., & Becker, C. M. (2011). Endometrial alterations in endometriosis: A systematic review of putative biomarkers. *Human Reproduction Update*, 17(5), 637-653. 10.1093/humupd/dmr013 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672902>



- McCarthy, M. (2003). Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet*, 361(9373), 1959. 10.1016/S0140-6736(03)13603-3
- McKay, L. I., & Cidlowski, J. A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: Interactions between nuclear factor- $\kappa$ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Reviews*, 20(4), 435-459. 10.1210/edrv.20.4.0375 Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.20.4.0375>
- McLaren, J. (2000a). Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Human Reproduction Update*, 6(1), 45-55. 10.1093/humupd/6.1.45 Retrieved from <https://academic.oup.com/humupd/article/6/1/45/606623>
- McLaren, J. (2000b). Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Human Reproduction Update*, 6(1), 45-55.
- McLaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, D. S., & Smith, S. K. (1996). Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 11(1), 220-223.
- Medeiros, L. R., Rosa, M. I., Silva, B. R., Reis, M. E., Simon, C. S., Dondossola, E. R., & da Cunha Filho, João Sabino. (2015). Accuracy of magnetic resonance in deeply infiltrating endometriosis: A systematic review and meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 291(3), 611-621. 10.1007/s00404-014-3470-7
- Merrill, J. A. (1966). Endometrial induction of endometriosis across millipore filters. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 94(6), 780-790.
- Meyer, R. (1903). Uber eine adenomatose wucherung der serosa in einer bauchnarbe. *Z Geburtsh Gynakol*, 49, 32-41.



- Michowitz, M., Baratz, M., & Stavorovsky, M. (1983). Endometriosis of the umbilicus. *Dermatologica*, 167(6), 326-330.
- Mihalyi, A., Simsa, P., Mutinda, K. C., Meuleman, C., Mwenda, J. M., & D'Hooghe, T. M. (2006). Emerging drugs in endometriosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 11(3), 503-524. 10.1517/14728214.11.3.503
- Milsom, I., & Korver, T. (2008). *Ovulation incidence with oral contraceptives: A literature review*. England: Faculty of Sexual and Reproductive Healthcare.10.1783/147118908786000451 Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/ffp/jfp/2008/00000034/00000004/art00011>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189-225. 10.1152/physrev.1998.78.1.189
- Missmer, S. A., Hankinson, S. E., Spiegelman, D., Barbieri, R. L., Michels, K. B., & Hunter, D. J. (2004). In utero exposures and the incidence of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 82(6), 1501-1508. 10.1016/j.fertnstert.2004.04.065
- Moghissi, K. S. (1999). Medical treatment of endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 42(3), 620-632.
- Molema, G., & Griffioen, A. W. (1998). Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply. *Immunology Today*, 19(9), 392-394. 10.1016/S0167-5699(98)01314-0 Retrieved from [https://www.cell.com/immunology/abstract/S0167-5699\(98\)01314-0](https://www.cell.com/immunology/abstract/S0167-5699(98)01314-0)



- Moreno-Rojas, A., Salinas-Parra, C., & Andres Torres-Rincon, R. (2017). Endometriosis en el ciego de una mujer posmenopausica. Reporte del caso. *Iatreia*, 30(3), 333.
- Nap, A. W., Griffioen, A. W., Dunselman, G. A. J., Bouma-Ter Steege, Jessica C A, Thijssen, Victor L J L, Evers, J. L. H., & Groothuis, P. G. (2004). Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(3), 1089-1095. 10.1210/jc.2003-031406 Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-031406>
- Nap, A. W., Groothuis, P. G., Demir, A. Y., Maas, J. W. M., Dunselman, G. A. J., de Goeij, Anton F P M, & Evers, J. L. H. (2003). Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(1), 30-34.
- Nassif, J., Trompoukis, P., Barata, S., Furtado, A., Gabriel, B., & Wattiez, A. (2010). Management of deep endometriosis. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(1), 25-33. 10.1016/j.rbmo.2010.08.012 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S1472648310005687>
- Netsu, S., M.D, Konno, Ryo, M.D., Ph.D, Odagiri, K., M.D, Soma, M., Ph.D, Fujiwara, Hiroyuki, M.D., Ph.D, & Suzuki, Mitsuaki, M.D., Ph.D. (2008). Oral eicosapentaenoic acid supplementation as possible therapy for endometriosis. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1496-1502. 10.1016/j.fertnstert.2007.08.014 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028207031573>

- Ngo, C., Chereau, C., Nicco, C., Weill, B., Chapron, C., & Batteux, F. (2009). Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *American Journal of Pathology*, 175(1), 225-234. 10.2353/ajpath.2009.080804 Retrieved from <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S000294401060538X>
- Ngô, C., Chéreau, C., Nicco, C., Weill, B., Chapron, C., & Batteux, F. (2009). Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *The American Journal of Pathology*, 175(1), 225-234. 10.2353/ajpath.2009.080804 Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708809/>
- Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Anaf, V., Mine, J. M., & Donnez, J. (1993). Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility*, 59(3), 681-684.
- Nisolle, M., & Donnez, J. (1997). Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and Sterility*, 68(4), 585-596.
- Noble, L. S., Takayama, K., Zeitoun, K. M., Putman, J. M., Johns, D. A., Hinshelwood, M. M., Bulun, S. E. (1997). Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(2), 600-606. 10.1210/jcem.82.2.3783
- Nothnick, W. B. (2001). Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertility and Sterility*, 76(2), 223-231. 10.1016/S0015-0282(01)01878-7 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028201018787>
- Novella-Maestre, E., Carda, C., Noguera, I., Ruiz-Saurí, A., García-Velasco, J. A., Simón, C., & Pellicer, A. (2009). Dopamine agonist administration causes a



reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 24(5), 1025-1035. 10.1093/humrep/den499

Novella-Maestre, E., Carda, C., Ruiz-Sauri, A., Garcia-Velasco, J. A., Simon, C., & Pellicer, A. (2010). Identification and quantification of dopamine receptor 2 in human eutopic and ectopic endometrium: A novel molecular target for endometriosis therapy. *Biology of Reproduction*, 83(5), 866-873. 10.1095/biolreprod.110.084392

Olivares, C., Bilotas, M., Buquet, R., Borghi, M., Sueldo, C., Tesone, M., & Meresman, G. (2008). Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Human Reproduction*, 23(12), 2701-2708. 10.1093/humrep/den315 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18716040>

Olive, D. L., Lindheim, S. R., & Pritts, E. A. (2004). New medical treatments for endometriosis. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(2), 319-328. 10.1016/j.bpobgyn.2004.03.005

Oosterlynck, D. J., Cornillie, F. J., Waer, M., Vandeputte, M., & Koninckx, P. R. (1991). Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertility and Sterility*, 56(1), 45-51.

Oosterlynck, D. J., Meuleman, C., Sobis, H., Vandeputte, M., & Koninckx, P. R. (1993a). Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 59(4), 778-782.



- Oosterlynck, D. J., Meuleman, C., Sobis, H., Vandeputte, M., & Koninckx, P. R. (1993b). Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 59(4), 778-782.
- Oosterlynck, D. J., Meuleman, C., Sobis, H., Vandeputte, M., & Koninckx, P. R. (1993c). Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 59(4), 778-782.
- Orlowski, R. Z., Stinchcombe, T. E., Mitchell, B. S., Shea, T. C., Baldwin, A. S., Stahl, S., Soignet, S. L. (2002). Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(22), 4420-4427.  
10.1200/JCO.2002.01.133
- Osteen, K. G., Bruner, K. L., & Sharpe-Timms, K. L. (1996). Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 14(3), 247-255. 10.1055/s-2007-1016334
- Ozer, H., Boztosun, A., Açmaz, G., Atilgan, R., Akkar, O. B., & Kosar, M. I. (2013). The efficacy of bevacizumab, sorafenib, and retinoic acid on rat endometriosis model. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20(1), 26-32.  
10.1177/1933719112452941
- Painter, J. N., Anderson, C. A., Nyholt, D. R., Macgregor, S., Lin, J., Lee, S. H., Zondervan, K. T. (2011). Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nature Genetics*, 43(1), 51-54.  
10.1038/ng.731



- Pamela Stratton, Ninet Sinaii, James Segars, Deloris Koziol, Robert Wesley, Carolyn Zimmer, Lynnette K Nieman. (2008). Return of chronic pelvic pain from endometriosis after raloxifene treatment: A randomized controlled trial. *Obstetrics and Gynecology*, 111(1), 88-96. 10.1097/01.AOG.0000297307.35024.b5 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165396>
- Park, J. E., Keller, G. A., & Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell*, 4(12), 1317-1326. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275767/>
- Patwardhan, Nawathe, Yates, Harrison, & Khan. (2008). Systematic review of the effects of aromatase inhibitors on pain associated with endometriosis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115(7), 818-822. 10.1111/j.1471-0528.2008.01740.x Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/bsc/bjo/2008/00000115/00000007/art00006>
- Pauli, S. A., Tang, H., Wang, J., Bohlen, P., Posser, R., Hartman, T., Zimmermann, R. C. (2005). 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*, 146(3), 1301-1311. 10.1210/en.2004-0765 Retrieved from <https://academic.oup.com/endo/article/146/3/1301/2500648>
- Pellicer, A., Oliveira, N., Ruiz, A., Remohí, J., & Simón, C. (1995). Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: An analysis of embryo



development and implantation in assisted reproduction. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10 Suppl 2, 91-97.

Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohí, J., & Simón, C. (1998). The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: Local and systemic cytokine production. *Fertility and Sterility*, 70(3), 425-431. 10.1016/S0015-0282(98)00204-0 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028298002040>

Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., & Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(2), 824-831.

Petta, C. A., Ferriani, R. A., Abrao, M. S., Hassan, D., Rosa E Silva, Julio C, Podgaec, S., & Bahamondes, L. (2005). Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(7), 1993-1998. 10.1093/humrep/deh869 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790607>

Plate, K. (2001). From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nature Medicine*, 7(2), 151-152. 10.1038/84579

Prentice, A., Deary, A. J., Goldbeck-Wood, S., Farquhar, C., & Smith, S. K. (2000). Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), CD000346. 10.1002/14651858.CD000346



- Prentice, A., Thomas, E. J., Weddell, A., McGill, A., Randall, B. J., & Horne, C. H. (1992). Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: An immunohistochemical study. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *99*(5), 395-398.
- Ramey, J. W., & Archer, D. F. (1993). Peritoneal fluid: Its relevance to the development of endometriosis. *Fertility and Sterility*, *60*(1), 1-14.
- Rana, N., Braun, D. P., House, R., Gebel, H., Rotman, C., & Dmowski, W. P. (1996). Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, *65*(5), 925-930.
- Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2007a). Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *5*(1), 40. 10.1186/1477-7827-5-40 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961240>
- Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2007b). Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *5*(1), 40. 10.1186/1477-7827-5-40 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961240>
- Ricci, A. G., Olivares, C. N., Bilotas, M. A., Meresman, G. F., & Barañao, R. I. (2011). Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *18*(7), 614-622. 10.1177/19337191110395406
- Rier, S., & Foster, W. G. (2003). Environmental dioxins and endometriosis. *Seminars in Reproductive Medicine*, *21*(2), 145-154. 10.1055/s-2003-41321



- Rockwell, L. C., Pillai, S., Olson, C. E., & Koos, R. D. (2002). Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1804-1810.
- Rodgers, W. H., Matrisian, L. M., Giudice, L. C., Dsupin, B., Cannon, P., Svitek, C., Osteen, K. G. (1994). Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *Journal of Clinical Investigation*, 94(3), 946-953. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295134/>
- Rogers, P. A. W., D'Hooghe, T. M., Fazleabas, A., Gargett, C. E., Giudice, L. C., Montgomery, G. W., Zondervan, K. T. (2009). Priorities for endometriosis research: Recommendations from an international consensus workshop. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 16(4), 335-346. 10.1177/1933719108330568
- Rosenfeld, D. L., & Lecher, B. D. (1981). Endometriosis in a patient with rokitansky-kuster-hauser syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 139(1), 105.
- Ruffo, G., Sartori, A., Crippa, S., Partelli, S., Barugola, G., Manzoni, A., Falconi, M. (2012). Laparoscopic rectal resection for severe endometriosis of the mid and low rectum: Technique and operative results. *Surgical Endoscopy*, 26(4), 1035-1040. 10.1007/s00464-011-1991-8
- Russell-Edu, W. (1899). Aberrant portions of müllerian duct found in ovary. ovarian cysts of müllerian origin. *Bull Hopkins Hosp*, Retrieved



from <https://www.scienceopen.com/document?vid=35075f05-b7d5-407b-8dd4-77c4dbe360ef>

Rychlik, D. F., & Bieber, E. J. (2001). Thoracic endometriosis syndrome resembling pulmonary embolism. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 8(3), 445-448. 10.1016/S1074-3804(05)60348-9 Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074380405603489>

S E Bulun, K Zeitoun, K Takayama, L Noble, D Michael, E Simpson, H Sasano. (1999). Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis. *Endocrine-Related Cancer*, 6(2), 293-301. 10.1677/erc.0.0060293 Retrieved from <http://erc.endocrinology-journals.org/content/6/2/293.abstract>

Sampson, J. A. (1921a). Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2(5), 526-533. 10.1016/S0002-9378(21)90294-1 Retrieved from [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(21\)90294-1/abstract](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(21)90294-1/abstract)

Sampson, J. A. (1921b). Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary: Their importance and especially their relation to pelvic adenomas of endometrial type (adenomyoma of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid, etc.). *Archives of Surgery*, 3(2), 245-323. 10.1001/archsurg.1921.01110080003001 Retrieved from <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/536143>

Sampson, J. A. (1927). Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics &*



*Gynecology*, 14(4), 422-429. 10.1016/S0002-9378(15)30003-X Retrieved  
from [http://www.ajog.org/article/S0002-9378\(15\)30003-X/abstract](http://www.ajog.org/article/S0002-9378(15)30003-X/abstract)

Sánchez-Fernández, P., & Cristóbal-García, I. (2011). Tratamiento médico del dolor por endometriosis. In J. A. García-Velasco (Ed.), *Endometriosis en el siglo XXI* (1ª ed., pp. 61-70). Madrid: Cuadernos de Medicina Reproductiva.

Sanfilippo, J. S., Wakim, N. G., Schikler, K. N., & Yussman, M. A. (1986).

Endometriosis in association with uterine anomaly. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 154(1), 39-43.

Sangi-Haghpeykar, H., & Poindexter, A. N. (1995). Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstetrics and Gynecology*, 85(6), 983-992. 10.1016/0029-7844(95)00074-2

Sasson, I. E., & Taylor, H. S. (2008). Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 106-115.  
10.1196/annals.1434.014

Schmidt, H. H. (1961). [Artificial endometriosis for therapeutic purposes]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 21, 679-85.

Schrodt, G. R., Alcorn, M. O., & Ibanez, J. (1980). Endometriosis of the male urinary system: A case report. *The Journal of Urology*, 124(5), 722-723.

Sebastian, S., & Bulun, S. E. (2001). A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10), 4600-4602.  
10.1210/jcem.86.10.7947 Retrieved

from <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.10.7947>





- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., & Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62-66. 10.1038/376062a0
- Sharkwy, Ibrahim Abd Elgafor el. (2013). Combination of non-invasive and semi-invasive tests for diagnosis of minimal to mild endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 288(4), 793-797. 10.1007/s00404-013-2822-z  
Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00404-013-2822-z>
- Shifren, J. L., Tseng, J. F., Zaloudek, C. J., Ryan, I. P., Meng, Y. G., Ferrara, N., Taylor, R. N. (1996). Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: Implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8), 3112-3118. 10.1210/jcem.81.8.8768883
- Simpson, J. L., Elias, S., Malinak, L. R., & Buttram, V. C. (1980). Heritable aspects of endometriosis. I. genetic studies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 137(3), 327-331.
- Sinaii, N., Cleary, S. D., Ballweg, M. L., Nieman, L. K., & Stratton, P. (2002). High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: A survey analysis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(10), 2715-2724.
- Speroff, L., & Darney, P. (2005). *A clinical guide for contraception*. &nbsp;(4<sup>a</sup> ed.). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Speroff L, Fritz M.A. Endometriosis. En su: Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad. 2<sup>a</sup> ed. Madrid, Lippincott Williams & Wilkins. 2006. pp. 1103-1133.



- Speroff L, Glass R.H. y N.G.K. Endometriosis. Endocrinología ginecológica e infertilidad. L. W. a. Wilkins. Madrid, España, Waverly Hispánica S.A. 1999; 1058-1073.
- Stroup, P. E. (1976). Endometriosis in laparotomy scars. *The Journal of Reproductive Medicine*, 16(2), 85-86.
- Surrey, E. S. (2006). The role of progestins in treating the pain of endometriosis. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 13(6), 528-534.  
10.1016/j.jmig.2006.06.008
- Surrey, E. S. (2010). Gonadotropin-releasing hormone agonist and add-back therapy: What do the data show? *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 22(4), 283-288. 10.1097/GCO.0b013e32833b35a7
- Taff, L., & Jones, S. (2002). Cesarean scar endometriosis. A report of two cases. *The Journal of Reproductive Medicine*, 47(1), 50-52.
- Tan, X., Lang, J., Liu, D., Shen, K., Leng, J., & Zhu, L. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 78(1), 148-153.
- Tang, F. Y., & Meydani, M. (2001). Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. *Nutrition and Cancer*, 41(1-2), 119-125.  
10.1080/01635581.2001.9680622
- Tasuku, H., Tomio, I., & Naoki, T. (2001). Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and Sterility*, 76(1), 1-10. 10.1016/S0015-0282(01)01816-7 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028201018167>



Te Linde, R. W., & Scott, R. B. (1950). Experimental endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 60(5), 1147-1173. 10.1016/0002-9378(50)90517-5

Retrieved

from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002937850905175>

Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., & Abraham, J. A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(18), 11947-11954.

Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: A committee opinion.

(2014a). *Fertility and Sterility*, 101(4), 927-935. 10.1016/j.fertnstert.2014.02.012

Retrieved from [https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-](https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028214001502)

[S0015028214001502](https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028214001502)

Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: A committee opinion.

(2014b). *Fertility and Sterility*, 101(4), 927-935. 10.1016/j.fertnstert.2014.02.012

Retrieved from [https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-](https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028214001502)

[S0015028214001502](https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0015028214001502)

Treloar, S. A., Wicks, J., Nyholt, D. R., Montgomery, G. W., Bahlo, M., Smith, V., Kennedy, S. H. (2005). Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *American Journal of Human Genetics*, 77(3), 365-376. 10.1086/432960

Tseng, J. F., Ryan, I. P., Milam, T. D., Murai, J. T., Schriock, E. D., Landers, D. V., & Taylor, R. N. (1996). Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and



eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(3), 1118-1122.

10.1210/jcem.81.3.8772585

Umezawa, M., Saito, Y., Tanaka-Hattori, N., Takeda, K., Ihara, T., & Sugamata, M. (2012). Expression profile of extracellular matrix and adhesion molecules in the development of endometriosis in a mouse model. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 19(12), 1365-1372. 10.1177/1933719112450340

Vercellini, P., Aimi, G., De Giorgi, O., Maddalena, S., Carinelli, S., & Crosignani, P. G. (1998). Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 105(9), 1018-1021.

Vercellini, P., Frontino, G., De Giorgi, O., Pietropaolo, G., Pasin, R., & Crosignani, P. G. (2003). Continuous use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhea that does not respond to a cyclic pill regimen. *Fertility and Sterility*, 80(3), 560-563. 10.1016/S0015-0282(03)00794-5 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028203007945>

Vercellini, P., Somigliana, E., Daguati, R., Viganò, P., Meroni, F., & Crosignani, P. G. (2008). Postoperative oral contraceptive exposure and risk of endometrioma recurrence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(5), 5. 10.1016/j.ajog.2007.11.010

Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E., & Fedele, L. (2014). Endometriosis: Pathogenesis and treatment. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(5), 261-275. 10.1038/nrendo.2013.255



- Vernon, M. W., & Wilson, E. A. (1985). Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertility and Sterility*, 44(5), 684-694.
- Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., & Persico, G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93(8), 1493-1495.
- Vivian Y. Shin, William K.K. Wu, Kent-Man Chu, Helen P.S. Wong, Emily K.Y. Lam, Emily K.K. Tai, Chi-Hin Cho. (2005). Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. *Molecular Cancer Research*, 3(11), 607-615. 10.1158/1541-7786.MCR-05-0106 Retrieved from <http://mcr.aacrjournals.org/content/3/11/607.abstract>
- von Rokitsansky, C. F. (1860). Ueber uterusdrüsen-neubildung in uterus- und ovarial-sarcomen. *Royal College of Surgeons of England*, 577-581. Retrieved from <https://archive.org/details/b22326558>
- Waller, K. G., Lindsay, P., Curtis, P., & Shaw, R. W. (1993a). The prevalence of endometriosis in women with infertile partners. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 48(2), 135-139.
- Waller, K. G., Lindsay, P., Curtis, P., & Shaw, R. W. (1993b). The prevalence of endometriosis in women with infertile partners. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 48(2), 135-139.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., & Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for



vascular endothelial growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26988-26995.

Wang, N., Hong, S., Tan, J., Ke, P., Liang, L., Fei, H., Yu, B. (2014). A red fluorescent nude mouse model of human endometriosis: Advantages of a non-invasive imaging method. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 176, 25-30. 10.1016/j.ejogrb.2014.02.012

Wilkins, S. B., Bell-Thomson, J., & Tyras, D. H. (1985). Hemothorax associated with endometriosis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 89(4), 636-638.

Wingfield, M., Macpherson, A., Healy, D. L., & Rogers, P. A. (1995). Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 64(2), 340-346.

Witz, C. A., Thomas, M. R., Montoya-Rodriguez, I. A., Nair, A. S., Centonze, V. E., & Schenken, R. S. (2001). Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. *Fertility and Sterility*, 75(2), 385-390.

Wolf, G. C., & Singh, K. B. (1989). Cesarean scar endometriosis: A review. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 44(2), 89-95.

Wood, D. H., Yochmowitz, M. G., Salmon, Y. L., Eason, R. L., & Boster, R. A. (1983). Proton irradiation and endometriosis. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 54(8), 718-724.

Wulff, C., Wilson, H., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., Lunn, S. F., & Fraser, H. M. (2001). Luteal angiogenesis: Prevention and intervention by treatment with vascular



endothelial growth factor trap(A40). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(7), 3377-3386. 10.1210/jcem.86.7.7662

Wykes, C. B., Clark, T. J., & Khan, K. S. (2004). Accuracy of laparoscopy in the diagnosis of endometriosis: A systematic quantitative review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 111(11), 1204-1212. 10.1111/j.1471-0528.2004.00433.x Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/bsc/bjo/2004/00000111/00000011/art00008>

Wysowski, D. K., & Chang, J. T. (2005). Alendronate and risedronate: Reports of severe bone, joint, and muscle pain. *Archives of Internal Medicine*, 165(3), 346-347. 10.1001/archinte.165.3.346-b

Yamauchi, N., Harada, T., Taniguchi, F., Yoshida, S., Iwabe, T., & Terakawa, N. (2004). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced the release of interleukin-6 from endometriotic stromal cells by the nuclear factor- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase pathways. *Fertility and Sterility*, 82, 1023-1028. 10.1016/j.fertnstert.2004.02.134 Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028204011057>

Yantiss, R. K., Clement, P. B., & Young, R. H. (2001). Endometriosis of the intestinal tract: A study of 44 cases of a disease that may cause diverse challenges in clinical and pathologic evaluation. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(4), 445-454.

Ylikorkala, O., & Mäkilä, U. -. (1985). Prostacyclin and thromboxane in gynecology and obstetrics. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 152(3), 318-329.



10.1016/S0002-9378(85)80221-0 Retrieved

from [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(85\)80221-0/abstract](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(85)80221-0/abstract)

Zeitoun, K., Takayama, K., Sasano, H., Suzuki, T., Moghrabi, N., Andersson, S., Bulun, S. E. (1998). Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: Failure to metabolize 17beta-estradiol. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(12), 4474-4480. 10.1210/jcem.83.12.5301

Zimmermann, R. C., Hartman, T., Bohlen, P., Sauer, M. V., & Kitajewski, J. (2001). Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. *Microvascular Research*, 62(1), 15-25. 10.1006/mvre.2001.2312

Zimmermann, R. C., Xiao, E., Husami, N., Sauer, M. V., Lobo, R., Kitajewski, J., & Ferin, M. (2001). Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), 768-772. 10.1210/jcem.86.2.7181

Zimmermann, R. C., Hartman, T., Kavic, S., Pauli, S. A., Bohlen, P., Sauer, M. V., & Kitajewski, J. (2003). Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(5), 659-669. 10.1172/JCI18740